

EFEKTIVITAS POLIETILENA GLIKOL SEBAGAI BAHAN PENYELEKSI KALUS NILAM YANG DIIRADIASI SINAR GAMMA UNTUK TOLERANSI TERHADAP CEKAMAN KEKERINGAN

EFFECTIVENESS OF POLYETHYLENE GLYCOL AS A SELECTIVE AGENT ON GAMMA IRRADIATED PATCHOULI CALLI FOR TOLERANCE TO DROUGHT STRESS

Surjono H.Sutjahjo¹⁾, Abdul Kadir²⁾ dan Ika Mariska³⁾

¹⁾Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian IPB

²⁾Fakultas Pertanian Universitas Islam Makassar

³⁾Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor
suryono@yahoo.com

ABSTRACT

The objective of this research was to study the effectiveness of PEG in simulating drought *in vitro* on gamma irradiated embryogenic calli. The research was conducted at The Tissue Culture Lab. of Center of Biotechnology and Agriculture Genetic Resource Institute, Bogor and gamma irradiation was done at Isotope and Radiation Lab. of BATAN, Jakarta. The result indicated that increasing PEG concentration of *in vitro* selective media increased callus death, decreased callus quality index, and percentage and number of regenerating calli. PEG concentration of 20% and gamma irradiation of 10, 15, or 20 Gy killed more than 80% calli, prevented callus regeneration and shoot formation. PEG concentration of 20% can be determined as a sub lethal concentration to select drought tolerant in further study. Gamma irradiated calli produced variability on callus death, callus quality index, callus regeneration and plantlet growth.

Key words : PEG, Pogostemon cablin, gamma irradiation, drought stress.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas PEG dalam mensimulasikan kekeringan secara *in vitro* terhadap kalus embriogenik yang diiradiasi sinar gamma. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium kultur jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor. Iradiasi sinar gamma di Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Atom Nasional (BATAN) Jakarta. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi Polietilena Glikol dalam media seleksi *in vitro*, meningkatkan persentase kematian kalus, menurunkan nilai indeks kualitas kalus, persentase kalus dan jumlah kalus beregenerasi. Konsentrasi 20% PEG dan dosis iradiasi 10, 15 atau 20 mematikan kalus > 80%, menghambat daya regenerasi dan jumlah tunas yang terbentuk. Konsentrasi PEG 20% dapat dijadikan sebagai konsentrasi sub lethal untuk melakukan seleksi kekeringan berikutnya. Penggunaan kalus yang diiradiasi sinar gamma menimbulkan keragaman terhadap persentase kematian kalus, nilai indeks kualitas kalus, daya regenerasi dan pertumbuhan planlet.

Kata kunci : PEG, Pogostemon cablin, iradiasi sinar gamma, cekaman kekeringan

PENDAHULUAN

Tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) merupakan salah satu tanaman penghasil minyak atsiri yang dikenal dengan minyak nilam (*patchouly oil*). Minyak tersebut banyak dipergunakan dalam industri kosmetik, parfum, sabun, anti septik, dan insektisida. Keunggulan minyak nilam dalam industri parfum yakni bersifat fiksatif yaitu kemampuannya dalam mengikat minyak lainnya sehingga harumnya dapat bertahan lama dan hingga kini belum dapat dibuat secara sintetik.

Tanaman nilam umumnya dibudayakan pada lahan kering. Tanaman tersebut sangat peka terhadap cekaman kekeringan. Tanaman nilam yang mengalami cekaman kekeringan nyata menurunkan komponen produksi Emmyzar *et al.* (2000). Terbatasnya klon dan rendahnya variabilitas genetik tanaman nilam menyebabkan sulitnya mendapatkan klon yang toleran cekaman kekeringan dan hingga kini belum ada klon yang secara genetik relatif toleran terhadap cekaman kekeringan.

Teknik *in vitro* melalui variasi somaklonal dan perlakuan mutasi fisik seperti iradiasi sinar gamma pada jaringan atau sekelompok sel (kalus) merupakan alternatif untuk mendapatkan varian yang diinginkan. Melalui seleksi *in vitro* varian tersebut dapat diseleksi untuk mendapatkan varian tanaman nilam yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

Seleksi *in vitro* untuk mencari varian yang toleran terhadap kekeringan dapat dilakukan dengan menggunakan agen penyeleksi (*selective agent*). berupa senyawa osmotikum. Senyawa osmotikum yang paling banyak digunakan untuk mensimulasikan cekaman kekeringan akhir-akhir ini adalah senyawa *polyethylene glycol* (PEG) (Santos-Diaz and Ochoa-Alejo 1994; Dami and Hughes, 1995, 1997). Penggunaan PEG dalam melakukan simulasi kekeringan digunakan sejak lama, karena senyawa ini bersifat stabil, polimer panjang, non ionik dan larut dalam air (Lawyer, 1970).

Senyawa PEG bersifat larut dalam air dan dapat menyebabkan penurunan potensial air yang

homogen. Besarnya penurunan air sangat tergantung pada konsentrasi dan berat molekul PEG. Keadaan seperti ini dapat dimanfaatkan untuk melakukan simulasi penurunan potensial air. Potensial air dalam media yang mengandung PEG dapat digunakan untuk meniru besarnya potensial air tanah (Michel and Kaufmann, 1973).

Tersedianya agen selektif untuk simulasi kekeringan yaitu PEG serta tersedianya standar baku untuk menginduksi kalus dan meregenerasi kannya menjadi planlet, memungkinkan seleksi *in vitro* dapat dilakukan untuk mendapatkan varian tanaman nilam yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan PEG dalam mensimulasikan kekeringan yang berdasarkan respon kalus embriogenik pada berbagai level konsentrasi PEG.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium kultur jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Penyinaran iradiasi sinar gamma dilaksanakan di Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi (P3TIR), Badan Tenaga Atom Nasional (BATAN) Jakarta, berlangsung dari bulan Agustus 2004 sampai bulan Januari 2006.

Bahan yang tanaman yang digunakan meliputi klon nilam Tapak Tuan hasil perbanyakan secara *in-vitro* (merupakan salah klon harapan yang dikoleksi oleh Baltibiogen), Media dasar Murashige dan Skoog (MS), auksin, sitokinin, vitamin, bahan sterilisasi, kertas aluminium, dan zat kimia lainnya yang diperlukan.

Alat yang digunakan botol kultur, erlenmeyer, petridis, labu ukur, corong, saringan, timbangan analitik, autotoklaf, oven, pH meter, kompor listrik, alat diseksi (pisau, pinset dan gunting), Laminar air flow cabinet, lampu spritus, rak kultur, dan alat lainnya yang dibutuhkan.

Perbanyakan sumber eksplan dan induksi kalus

Sumber eksplan diperoleh dari biakan yang sudah steril. Untuk mencukupi jumlah eksplan yang

dibutuhkan, dilakukan perbanyakannya secara *in vitro*, yaitu eksplan batang satu buku berukuran 1-2 cm ditanam pada media MS yang telah diberi vitamin dari grup vitamin B, sukrosa 30 g L⁻¹ dan phytagel 2.5 g L⁻¹. Untuk poliriferasi tunas dan akar digunakan BA 0.1 mg L⁻¹. Kultur dipindahkan dalam ruang inkubasi dengan suhu konstan 26 °C.

Kalus dikembangkan dari eksplan daun hasil biakan secara *in-vitro*. Daun di iris-iris tipis ukuran 0.6 x 0.6 mm, selanjutnya ditanam dalam media dasar MS ditambahkan gula sukrosa 30 g L⁻¹ dan agar 8 g L⁻¹ yang diperkaya dengan BA 0.1 mg L⁻¹ dan 2.4 D 0.5 mg L⁻¹ (Mariska *et al.*, 1997). Setiap botol kultur diisi sebanyak 6 eksplan. Kalus yang terbentuk disubkultur 3 minggu sekali sebanyak 3 kali subkultur, hal ini dimaksudkan untuk memperoleh populasi kalus yang lebih banyak.

Iradiasi sinar gamma

Sebelum Kalus diradiasi, terlebih dahulu dibiakkan pada media yang baru dengan komposisi media yang sama pada media induksi kalus, namun menggunakan 2.4D 0.5 mL⁻¹. Setiap botol diisi sebanyak 25 – 30 kalus per botol. Kalus tersebut selanjutnya diiradiasi sinar gamma dengan dosis berdasarkan perlakuan. Setelah diradiasi selanjutnya dipindahkan pada media yang baru dengan komposisi media yang sama.

Seleksi in vitro menggunakan PEG

Kalus embriogenik yang dihasilkan dari hasil perbanyakannya pada percobaan sebelumnya dipindahkan ke dalam media seleksi yaitu media yang dipakai untuk induksi kalus dengan penambahan PEG (BM 6000) konsentrasi kontrol 5, 10, 15, atau 20%. Konsentrasi tersebut setara dengan tekanan osmotik sebesar : 0, -0.03 (5% PEG), -0.19 (10% PEG), -0.41 (15% PEG) dan -0.67 MPa (20% PEG) (Mexal *et al.*, 1975). Penambahan PEG dalam media, menyebabkan media akan menjadi cair (*medium cair*), sehingga untuk mencegah agar kalus tidak tenggelam dalam media tersebut, digunakan busa sintetik yang dilapisi dengan kertas saring. Kalus yang telah dipindahkan ke dalam medium, disimpan dalam ruang kultur (ruang inkubasi) dengan temperatur ruang bersuhu 26 °C. Setelah kultur berumur 4

minggu kalus embriogenik yang tahan selanjutnya diproliferasi kembali dalam media yang sama yakni media dasar MS, gula sukrosa 30 g L⁻¹ dan phytagel 2.5 g L⁻¹ yang diperkaya dengan BA dan 2.4 D.

Setiap 4 minggu sekali dilakukan pemindahan eksplan pada media yang baru (*segar*) atau disubkulturkan dengan menggunakan media yang sama untuk masing-masing perlakuan. Subkultur dilakukan sebanyak 3 kali.

Peubah yang diamati meliputi kualitas kalus, persentase kalus mati, diameter kalus, volume kalus, bobot segar dan kering kalus, persentase kalus yang bergenerasi, jumlah tunas dan pertumbuhan planlet. Kualitas kalus dinyatakan dalam nilai indeks kualitas kalus, yaitu skor nilai perubahan warna kalus yaitu kalus warna putih bening/putih kehijauan = nilai 5, putih kekuningan = nilai 4, kuning kecoklatan = nilai 3, coklat = nilai 2, hitam = nilai 1 dan mati = 0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon kalus embriogenik terhadap radiasi sinar gamma

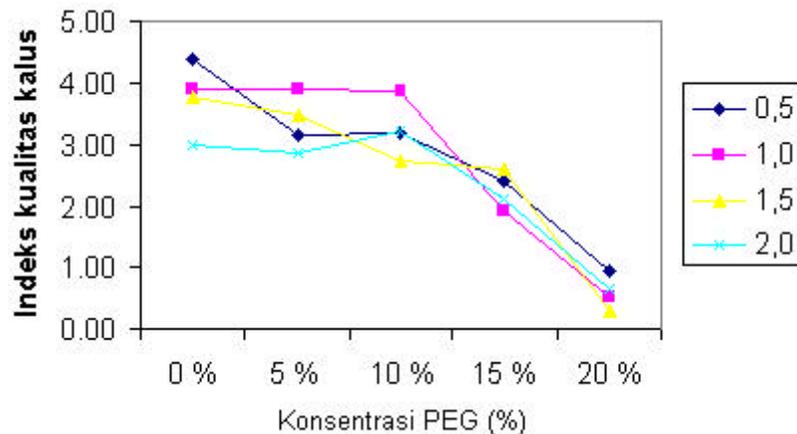
Efek iradiasi sinar gamma 4 minggu setelah iradiasi dapat diamati dari perubahan warna kalus. Kalus sebelum diiradiasi berwarna putih bening, kompak (kalus embriogenik), namun setelah iradiasi beberapa individu kalus mengalami perubahan warna seperti putih kekuningan, kuning kecoklatan, kecoklatan dan hitam. Kalus yang mengalami perubahan warna coklat atau kehitaman diindikasikan sebagai kalus non embriogenik. Semakin tinggi dosis iradiasi semakin meningkatkan kalus non embriogenik (Tabel 1). Dosis iradiasi 25 Gy menyebabkan persentase kalus mati yang tertinggi yakni 27.5%, sedangkan dosis 20 Gy persentase kematian kalus 13.82% dan dosis yang lebih rendah berturut 7.98%, 4.16, 2.49 dan 1.23% pada dosis 15 Gy, 10 Gy dan 5 Gy. Hasil yang sama dilaporkan Mariska *et al.* (1997), yaitu dosis iradiasi sinar gamma 2 dan 3 krad (20 dan 25 Gy) menyebabkan peningkatan jumlah kalus yang mengalami perubahan warna coklat dan hitam, warna kalus tersebut sangat sulit beregenerasi. Berdasarkan pertimbangan

persentase kematian kalus yang lebih dari 20% pada perlakuan 25 Gy, maka perlakuan seleksi menggunakan PEG hanya dilakukan hingga dosis

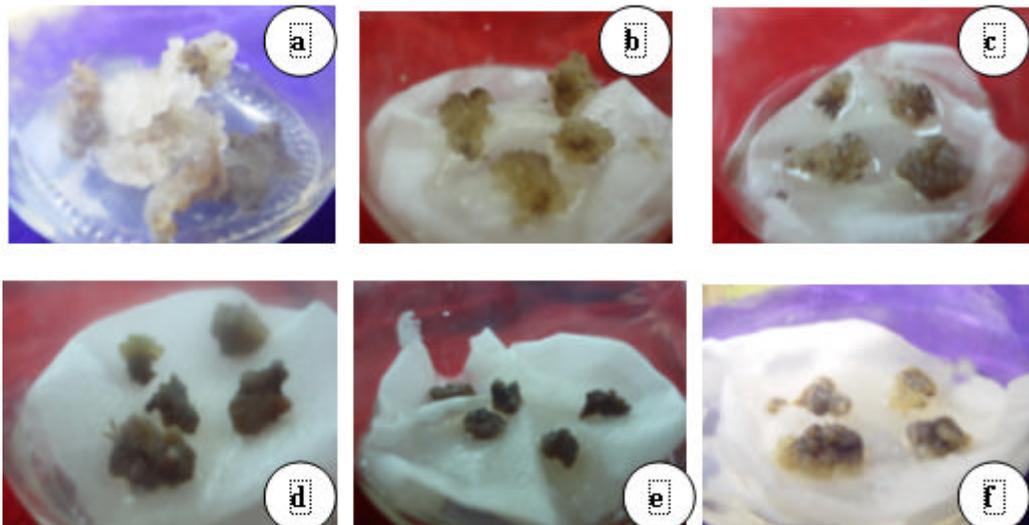
20 Gy. Penggunaan dosis 25 Gy dikawatirkan akan menyulitkan mendapatkan kalus yang bertahan hidup pada akhir seleksi.

Tabel 1. Persentase kematian kalus empat minggu setelah perlakuan iradiasi sinar gamma

Dosis sinar.gamma (Gy)	Persentase kematian kalus	Keterangan
0	1.23 a	
5	2.49 ab	
10	4.16 b	
15	7.98 b	
20	13.82 c	Batas dosis untuk seleksi <i>in vitro</i>
25	27.03 d	Tidak digunakan dalam seleksi <i>in vitro</i>



Gambar 1. Diagram indeks kualitas kalus pada berbagai konsentrasi PEG dan Dosis iradiasi sinar gamma



Gambar 2. Keadaan pertumbuhan kalus (a) tanpa seleksi PEG (kontrol), kalus umumnya berwarna putih dan pertumbuhannya lebih cepat. (b) 5 % PEG, umumnya berwarna putih kuning, (d) 10 % PEG, umumnya berwanah kuning kecoklatan, (d) 15 % PEG, umumnya berwarna kecoklatan dan kehitaman, (e) dan 20 % PEG, umumnya kalus berwarna coklat dan hitam.(f) kalus yang dapat bertahan pada 20 % PEG kelihatan berwarna putih

Tabel 2. Persentase kalus yang mati dan indeks kualitas kalus pada akhir seleksi menggunakan PEG

Dosis iradiasi sinar gama (Gy)	Konsentrasi PEG (%)	Persentase kalus yang mati	Indeks kualitas kalus
5	0	0	4.38
	5	0	3.16
	10	4.2	3.19
	15	7.89	2.42
	20	66.87	0.92
10	0	5.7	3.90
	5	8.33	3.92
	10	0.00	3.88
	15	50.0	1.94
	20	90.48	0.51
15	0	11.1	3.77
	5	12.5	3.50
	10	25.9	2.75
	15	25.0	2.63
	20	100	0.30
20	0	19.4	3.00
	5	18.3	2.88
	10	19.8	3.22
	15	20.3	2.12
	20	85.0	0.65

Respon kalus yang telah diradiasi terhadap media seleksi menggunakan PEG

Respon kalus terhadap media selektif PEG dapat diamati dari perubahan warna dan pertumbuhan kalus. Perubahan warna kalus yang lebih ekstrim adalah menjadi hitam dan pertumbuhannya lambat, bahkan tidak mengalami pertumbuhan sama sekali, dan hal ini sebagai indikasi bahwa kalus tersebut telah mati.

Persentase kalus yang mati dalam medium PEG meningkat sejalan peningkatan konsentrasi PEG. Konsentrasi 20% dapat menyebabkan persentase kematian kalus 85.84%. Peningkatannya hampir 3 kali lipat dibandingkan dengan PEG 15% yang hanya 22.6%. Bahkan pada konsentrasi 5% dan 10% persentase kematian kalus hanya 5.21% dan 6.25% (Tabel 2). Semakan tinggi konsentrasi PEG dalam media akan menyebabkan terhambatnya proses osmosis dalam sel sehingga menghambat masuknya air ke dalam sel. Sel atau sekelompok sel (kalus) yang rentan terhadap proses ini akan mati. Sel yang mampu melakukan

penyesuaian osmotik dalam kondisi tercekam diyakini sebagai varian yang membawa sifat toleransi terhadap cekaman kekeringan.

Hasil penelitian serupa dilakukan oleh Husni *et al.* (2002) dan Widoretno (2003), menunjukkan bahwa persentase kematian embrio somatik (ES) yang diperoleh dari embrio zigotik kedelai meningkat sejalan pertambahan konsentrasi PEG. Konsentrasi 20% menurunkan jumlah ES per eksplan kalus kedelai sebesar 90%, konsentrasi 20% merupakan konsentrasi sub letal pada kedelai (Widoretno, 2003).

Konsentrasi *sub lethal* adalah konsentrasi PEG yang dapat menghambat jumlah total ES 95% (Nabors and Dyker 1985). Persentase kematian kalus nilam mencapai 90% pada konsentrasi 20% PEG sehingga konsentrasi tersebut dapat dijadikan sebagai konsentrasi sub letal untuk seleksi kalus tanaman nilam, dengan alasan masih terjadi hambatan dalam proses regenerasi, artinya sisa 10% yang diregenerasikan belum tentu semuanya beregenerasi.

Tabel 3. Pertumbuhan kalus yang diiradiasi sinar gamma pada akhir seleksi menggunakan PEG

Perlakuan	Diameter kalus (cm)	Volume (mm ³)	Bobot segar (g)	Bobot kering (g)
Pengaruh PEG				
0	1.81 a	5.29 a	3.164 a	0.0443 a
5	1.99 a	3.83 b	2.891 ab	0.0376 a
10	1.97 a	3.77 b	2.426 bc	0.0299 a
15	1.87 a	3.49 b	2.294 bc	0.0245 a
20	0.76 b	0.73 c	0.413 d	0.0086 b
Pengaruh iradiasi sinar gamma				
0.5	1.94 a	3.60 a	2.439 a	0.0355 a
1.0	1.70 a	3.57 a	2.129 a	0.0269 b
1.5	1.68 a	3.21 a	1.970 b	0.0265 b
2.0	1.64 a	3.41 a	2.291 a	0.0252 b



Gambar 3. Regenerasi kalus menjadi tunas/planlet. (a) tidak semua kalus menghasilkan tunas, (b) pertumbuhan tunas setelah dipisahkan dari kalus yang tidak bergenerasi (c) pertumbuhan planlet hasil subkultur dari gambar b

Perubahan warna kalus sebagai respon kalus terhadap PEG tercermin pada nilai indeks kualitas kalus. Indeks kualitas kalus semakin menurun sejalan dengan meningkatnya konsentrasi PEG pada semua level dosis iradiasi. Penurunan yang sangat drastis pada konsentrasi 20% pada semua dosis iradiasi. Rendahnya kualitas indeks kalus disebabkan banyaknya jumlah kalus yang mengalami perubahan warna kalus menjadi coklat dan hitam, sehingga semakin tinggi persentase jumlah kalus yang berwarna coklat dan hitam (umumnya kalus sudah mati), semakin rendah nilai indeks kualitas kalus. Gambar 2 memperlihatkan keadaan kalus pada akhir seleksi.

Pengaruh PEG dapat diamati dari karakter kuantitatif seperti diameter, volume, bobot segar dan bobot kering kalus. Karakter tersebut berpengaruh signifikan terhadap konsentrasi PEG sedangkan iradiasi sinar gamma hanya berpengaruh signifikan terhadap bobot kering kalus (Tabel 3). Meningkatnya konsentrasi PEG akan menurunkan

semua komponen yang diamati. Kalus yang dikulturkan pada konsentrasi 20% PEG umumnya menghambat pertumbuhan kalus. Kalus yang dapat bertahan terhadap konsentrasi PEG 20% berpotensi membawa sifat toleran terhadap cekaman kekeringan.

Regenerasi kalus dan pertumbuhan planlet hasil seleksi in vitro

Kemampuan kalus yang dapat bergenerasi paling tinggi pada kalus yang tidak mengalami tekanan seleksi PEG (kontrol) yakni mencapai 50% pada kalus yang diiradiasi 5 Gy dan relatif menurun pada dosis yang lebih tinggi, yaitu berturut-turut 43,8% (10 Gy), 41,7 (15 Gy) dan 45,5 (20 Gy). Namun pada kalus yang mengalami seleksi PEG kemampuan regenerasinya menurun. Penurunan persentase regenerasi sejalan dengan semakin meningkatnya konsentrasi PEG pada semua level dosis iradiasi sinar gamma (Tabel 4).

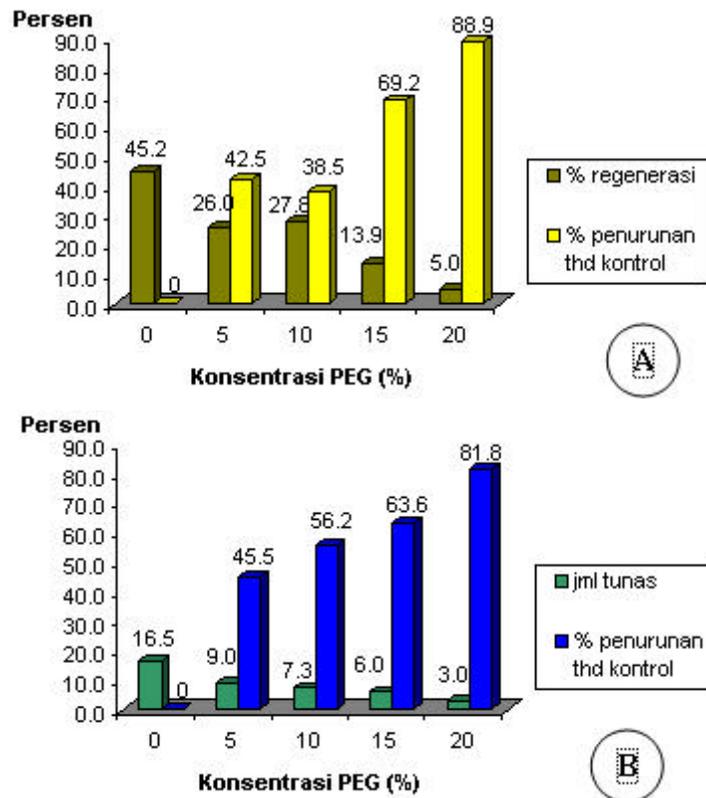
Tabel 4. Kemampuan kalus bergenerasi membentuk tunas pada akhir seleksi menggunakan PEG

Dosis iradiasi (Gy)	PEG (%)	Jumlah kalus yg diregenerasikan	Persentase kalus bergenerasi	Jumlah tunas	Rata-2 jumlah tunas per kalus
5	0	16	50.0	28	3.5
	5	21	33.3	14	2.0
	10	20	25.0	14	2.8
	15	10	-	-	0
	20	5	20.0	3	3.0
10	0	16	43.8	20	2.9
	5	12	33.3	7	1.8
	10	8	25.0	4	2.0
	15	8	25.0	5	2.5
	20	2	0.0	-	0
15	0	12	41.7	8	1.5
	5	7	0.0	0	0
	10	9	44.4	5	1.3
	15	13	30.8	7	1.8
	20	3	0.0	0	0
20	0	11	45.5	10	2.0
	5	8	37.5	6	2.0
	10	12	16.7	6	3.0
	15	10	0.0	-	-
	20	0	0.0	-	-

Tabel 5. Pertumbuhan planlet pada berbagai dosis sinar gamma umur 8 minggu setelah regenerasi

Dosis	PEG	Tinggi Tunas (cm)	Jumlah Daun (helai)	Jumlah Akar	Panjang Akar (cm)
5	0	4.6 a	8.9 a	4.2 a	2.1 a
	5	4.1 a	8.4 a	3.8 a	1.7 a
	10	4.5 a	8.3 a	3.4 a	1.4 ab
	20	3.6 b	6.5 b	6.3 b	0.9 a
10	0	4.9 a	8.8 a	5.0 a	2.1 a
	5	4.5 ab	8.2 a	4.3 a	1.5 b
	10	4.3 ab	8.5 a	3.3 b	1.3 b
	15	3.9 b	8.2 a	3.4 b	1.5 b
15	0	4.3 a	8.5 a	5.4 a	1.9 a
	10	4.2 a	8.8 a	3.6 a	1.8 a
	15	4.1 a	8.9 a	3.9 a	1.4 a
20	0	4.3 a	8.5 a	4.0 a	1.6 a
	5	4.2 ab	8.7 a	4.5 a	1.8 a
	10	3.9 a	8.8 a	4.3 a	1.3 a

Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama pada dosis iradiasi yang sama berarti berbeda nyata berdasarkan uji t alfa 0.05.



Gambar 3. Histogram daya regenerasi kalus (A) Persentase kalus bergenerasi dan prosentase penurunan relatif kalus bergenerasi perlakuan PEG terhadap kontrol (B) Jumlah kalus bergenerasi dan prosentase penurunan relatif jumlah tunas perlakuan PEG terhadap kontrol.

Kemampuan kalus bergenerasi dipengaruhi oleh kondisi eksplan (kalus) dan komposisi media regenerasi (George, 1993). Kondisi kalus pada saat diregenerasikan telah mengalami tekanan dua kali yaitu tekanan pada iradiasi dan seleksi menggunakan PEG. Kalus yang mengalami tekanan seleksi yang lebih berat akan mengalami kerusakan fisiologi dan gangguan metabolime (Biswas *et al*, 2002). Ketidak mampuan kalus bergenerasi juga disebabkan ketidaksesuaian media regenerasi yang digunakan, yaitu ketidakseimbangan antara auksin dan sitokinin (Thorpe, 1994). Hal inilah yang menyebabkan sulitnya beregenerasi pada kalus yang mengalami tekanan seleksi 20% PEG. Duncan *et al*. (1995) melaporkan terjadinya penurunan persentase kalus bergenerasi sejalan meningkatnya konsentrasi PEG. Endang (2001) melaporkan tingginya

persentase kalus padi yang tidak dapat bergenerasi setelah mengalami tekanan seleksi 20 % PEG.

Kalus dikatakan bergenerasi apabila kalus telah menumbuhkan tunas, membentuk daun dan tetap berwarna hijau (Gambar 3). Tunas tersebut selanjutnya disebut planlet. Jumlah tunas yang dihasilkan berkurang sejalan meningkatnya konsentrasi. Nilai rata-rata persentase kalus bergenerasi dan jumlah tunas pada berbagai konsentrasi PEG, dapat menggambarkan persentase indeks penurunan secara relatif terhadap kontrol (Gambar 3). Rata-rata persentase kalus bergenerasi pada kontrol 45,2 %, sedangkan pada konsentrasi 5, 10, 15 dan 20% PEG berturut-turut 26,0, 27,8, 13,9 dan 5,0%. Berdasarkan persentase penurunan tersebut, diperoleh nilai indeks penurunan persentase kalus terhadap kontrol yang semakin meningkat. Pada konsentrasi

20% PEG sebesar 88.9%. Angka ini menggambarkan ketidak mampuan kalus bergenerasi sebesar 88.9% dan hanya mampu beregenerasi 8.1% yang diukur dari standar persentase kalus bergenerasi perlakuan kontrol. Demikian halnya indeks penurunan relatif jumlah tunas sebesar 81.8% terhadap kontrol, yang menggambarkan jumlah tunas dapat dihasilkan hanya 8.2% (3 tunas).

Jumlah tunas per eksplan beragam antar perlakuan (1.3 – 3.5 tunas), jumlah tunas lebih dari 3 tunas per eksplan hanya diperoleh pada perlakuan kontrol dan 20% PEG, 5 Gy serta 10% PEG, 20 Gy.

Pertumbuhan planlet 8 minggu setelah regenerasi menunjukkan adanya keragaman pada tinggi tunas, jumlah daun, jumlah akar dan panjang akar (Tabel 5). Efek iradiasi sinar gamma bersifat acak yakni dapat bersifat positif dengan sifat karakter yang baik sesuai karakter yang diinginkan, maupun bersifat negatif dengan munculnya karakter yang tidak dikehendaki. Tinggi tunas dan panjang akar pada perlakuan hasil seleksi 20% PEG dan iradiasi dosis 5 Gy nyata lebih pendek dibandingkan dengan kontrol, dan 5% PEG. Namun pada perlakuan tersebut jumlah akarnya lebih banyak. Banyaknya jumlah akar tidak dapat mendukung pertambahan tinggi tunas, hal ini disebabkan sulitnya akar mendapatkan hara yang jangkauannya lebih jauh.

KESIMPULAN

Penambahan konsentrasi Polyetilne Glycol dalam media seleksi *in vitro*, meningkatkan persentase kematian kalus, menurunkan nilai indeks kualitas kalus, persentase kalus dan jumlah kalus beregenerasi. Konsentrasi 20% PEG dan dosis iradiasi 10, 15 dan 20 mematikan kalus > 80 %, menghambat daya regenerasi dan jumlah tunas yang terbentuk. Penurunan persentase kalus bergenerasi dan persentase jumlah tunas terbentuk lebih dari 80 %. Konsentrasi 20 % dapat dijadikan sebagai konsentrasi sub lethal untuk melakukan seleksi kekeringan berikutnya.

Penggunaan kalus yang diiradiasi sinar gamma menimbulkan keragaman terhadap

persentase kematian kalus, nilai indeks kualitas kalus, daya regenerasi dan pertumbuhan planlet.

DAFTAR PUSTAKA

- Biswas, B., Chowdhury, A. Bhattacharya and B. Mandal. 2002. *In vitro* screening for increasing drought tolerance in rice. *In vitro Cell.Dev.Biol-Plant*. 38:525-530.
- Dami, I. and H. Hughes. 1997. Effect of PEG-induced water stress on *in-vitro* hardening of 'Valiant' grape. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 42:79 -184.
- Duncan R.R., R.M. Wascom and M.W. Nabors. 1995. *In vitro* screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated sorghum (*Sorghum bicolor* L.) for soil stress tolerance. *Euphytica*. 85:371–380.
- Emmyzar, Sukarman dan Suprpto, 1998. Seleksi Ketahanan Beberapa Kultivar Harapan Nilam Terhadap Cekaman Kekeringan. Laporan Penyelesaian DIP, Proyek Penelitian Tanaman Obat dan Rempah dan Obat tahun 1999/2000.
- Endang, G., I. Mariska, dan D. Sukmadjaja. 2001. Regenerasi kalus beberapa varietas padi setelah pemberian mutagen fisik dan seleksi *in vitro*. p. 1-14. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Bioteknologi Tanaman, Bogor 30-31 Januari.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part I the Technology Exegetic Lim. England.
- Husni, A., M.S. Hutami, Kasmiatin dan I. Mariska. 2002. Seleksi *in vitro* kedelai untuk meningkatkan sifat toleransi kekeringan. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 23(2):93-100
- Lawyer, D.W. 1970. Absorbtion of polyethylene glycol by plant effect on plant growth. *New Fisiol*. 69:501-513
- Mariska, I., E. Syamsuddin, P. Tjondronegoro, E. Gati, dan Seswita. 1997. Peningkatan Keragaman genetik tanaman nilam melalui kultur Jaringan Keragaman Somaklonal. Riset Unggulan Terpadu (RUT) II Tahun ke-III Laporan Akhir

- Michel, B.E and M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 57:914-916.
- Nabors, M.W. and T.A. Dykes. 1985. Tissue culture of cereal cultivar with increased salt, drought, and acid tolerance. *Biotechnology in Internasional Agricultural Research. In Proceeding of the Inter-center seminar on Internasional Agricultural Research Center and Biotechnology April 1984.*
- Santos_Diaz, M.S. and N. Ochoa-Alejo. 1994. PEG-tolerant cell clones of chili pepper growth, osmotic potential and solute accumulation. *Plant Sell Tiss and Org Cult.* 37:1-8.
- Thorpe, T.A. and R.R. Patel. 1984. Clonal Propagation Adventitious Buds. In Vasil IK (Ed) *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plant.* Acad Press Inc London Vol 1 p.49-58.
- Widoretno, W. 2003. Seleksi *in vitro* untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan pada kedelai (*Glycine max* [L.] Merr.) dan karakterisasi varian somaklonal yang toleran Disertasi. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor