

BAB VI

KERAGAMAN SOMAKLONAL

Kompetensi Dasar :

1. Mampu menjelaskan peranan kultur jaringan pada induksi variasi somaklonal sumber eksplan.
2. Mampu menerapkan prinsip kultur jaringan pada induksi variasi somaklonal.
3. Mampu menjabarkan mekanisme kerja perlakuan fisik (sinar gamma) pada induksi variasi somaklonal.
4. Mampu menjabarkan peran perlakuan zat pengatur tumbuh pada induksi variasi somaklonal.

Variasi somaklonal adalah variasi genetik tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan atau kultur sel, yang meliputi semua variasi genetik yang terjadi pada tanaman yang diregenerasikan dari sel yang tidak berdifrensiasi protoplas, kalus ataupun jaringan (Larkin dan Scowcroft, 1981).

Variasi genetik ini akan diekspresikan pada tanaman regeneran dalam bentuk karakter-karakter varian. Variasi ini merupakan manifestasi mutasi dan akan diturunkan kepada keturunannya melalui perbanyakan vegetatif ataupun generatif (Ignacimuthu *et al*, 1997)

Faktor-faktor yang mempengaruhi munculnya keragaman somaklonal adalah (Jacobsen, 1987 ; Peloquin, 1981) yaitu :

1. Komposisi zat kimia yang digunakan dalam media, zat kimia tertentu digunakan untuk menginduksi variasi somaklonal, misalnya : Kolkhisin, Asenapthen, dan lain lain.
2. Lamanya fase pertumbuhan kalus. Sub kultur yang berulang - ulang dapat menyebabkan terjadinya mutasi.
3. Zat pengatur tumbuh yang dipakai. ZPT tertentu dapat menginduksi terjadinya variasi somaklonal.

4. Tipe kultur yang digunakan atau sistem kultur (kultur kalus, suspensi sel, kultur protoplas). Atau jumlah perlakuan sub kultur yang berulang-ulang. Nursandi (2006), mendapatkan variasi somaklonal pada tanaman nenas dengan perlakuan sub kultur yang berulang pada kultur in vitro dan pengaruh ZPT BAP dan TDZ, setelah ditanam dilapang, perubahan tersebut menetap.
5. Genotif induk (homozigot atau heterozigot) dapat memungkinkan terjadinya benang - benang kromosom yang abnormal.
6. Perlakuan fisik lainnya (dengan cara buatan) seperti radiasi sinar gamma, beta, alpa, melukai, tumor dan lainnya. Penelitian telah dilakukan yaitu: Peningkatan variasi genetik tanaman manggis dengan Induksi radiasi sinar gamma (Harahap, 2003 ; Harahap, 2005a ; Harahap, 2005b), Induksi Variasi Genetik Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan Radiasi Sinar Gamma, yang meliputi respon pertumbuhan, perubahan morfologi, perubahan histologi, analisis perubahan genetik dengan marka isozim (Harahap, 2005a ; Harahap, 2006b, 2006c, 2006d).
7. Sumber eksplan. Keragaman pada eksplan dapat disebabkan adanya sel-sel yang bermuatan atau adanya polisomik dari jaringan tertentu. Contohnya: jika sumber eksplan yang digunakan adalah daun, dimana daun telah tersusun dari berbagai jaringan, jadi sumber selnya juga sudah heterogen, dan jika proses endomitosis terjadi, maka kemungkinan terjadi kelipatan ploidi sangat besar. Keragaman genetik yang terjadi di dalam kultur jaringan disebabkan oleh penggandaan jumlah kromosom (fusi, endomitosis), perubahan struktur kromosom (pindah silang), perubahan gen dan perubahan pada sitoplasma.

Variasi somaklonal dapat digunakan sebagai sumber keragaman genetik untuk sifat-sifat yang berguna (*useful traits*) untuk tujuan pemuliaan tanaman.

Variasi somaklonal juga merupakan sarana alternatif dalam pemuliaan tanaman untuk menciptakan varietas baru yang resisten terhadap penyakit, herbisida, toleran terhadap kondisi lingkungan ekstrim seperti kekeringan, pH rendah dan memperbaiki kualitas hasil (Larkin dan Scowcroft, 1981, Griga *et al*, 1995, Ignacimuthu *et al*, 1997, Kuksova *et al*, 1997).

Aplikasi tehnik ini telah banyak dilakukan pada tanaman budidaya, misalnya ; tebu yang resisten terhadap virus penyebab penyakit Fiji, tomat resisten terhadap *Fusarium oxysporum* dengan memperoleh variasi jumlah kromosom, pigmen daun dan buah, kentang dengan penggandaan kromosom, dan kedelai yang tahan lahan asam, kacang polong (Griga *et al*, 1995), anggur

(Kuskova *et al*, 1997), jagung (Moon *et al*, 1997), asparagus (Gavidia *et al*, 1999) dan sorgum (Maralappanavar *et al*, 2000).

Perkembangan tehnik invitro yang pesat memberi harapan untuk mencari sumber keragaman genetik baru melalui evaluasi dan seleksi variasi somaklonal. Untuk memperoleh regenerasi mutan yang akan diseleksi baik di tingkat sel atau jaringan (*in vitro*) maupun di tingkat plantlet, maka sel-sel atau jaringan mutan harus bisa diregenerasikan menjadi plantlet yang akan di transfer ke lapangan.

Melalui tehnik kultur jaringan terdapat dua hal yang berbeda kepentingan bagi pemulia tanaman yaitu: **mempertahankan kestabilan genetik dan merangsang keragaman genetik.**

Pembagian kelompok variasi genetik tanaman (variasi somaklonal) berdasarkan asal keragaman yaitu :

1. Perubahan jumlah kromosom (Gross caryoptic changes), contoh : aneuploid dan euploid (poliploid). Telah banyak dipelajari pada tanaman kentang, tebu, sorgum, pelargonium, tembakau. Harahap (1995), mendapatkan peningkatan kelipatan jumlah kromosom akar, kadar protein biji dan perubahan morfologi tanaman kacang hijau dengan perlakuan kolkhisin. Juga ditemukan kelainan – kelainan seperti sel yang mempunyai 2 inti, inti yang sangat membesar, daun yang jumlahnya mengalami penambahan. Penelitian juga dilakukan pada akar tanaman bawang merah yang mengalami kelipatan jumlah akibat perlakuan kolkhisin (Harahap, 1998), perubahan struktur anatomi tanaman kacang hijau (*Vigna radiata* L.) hasil perlakuan kolkhisin (Harahap, 2000),
2. Perubahan struktur dan susunan kromosom (Caryoptic changes associated with chromosome rearrangement). Pada umumnya terjadi pada kultur sel, seperti delesi, inverse dan translokasi.
3. Pindah silang somatik. Radio isotop disinyalir meningkatkan terjadinya proses pindah silang di dalam sel
4. Transposon (transposable element). Karena adanya elemen loncat ini, maka utas DNA dapat pindah dari satu lokus ke lokus gen lainnya, sehingga dapat menyebabkan delesi, inversi.
5. Penambahan dan pengurangan produk gen. Telah banyak diungkapkan bahwa gen yang spesifik dapat bertambah selama proses differensiasi sebagai respon terhadap lingkungan yang tidak menguntungkan.
6. Pembebasan terhadap virus. Dengan tehnik kultur meristem dan dipadu dengan menginduksi variasi somaklonalnya, maka beberapa tanaman bebas virus telah didapat.

Tehnik mendapatkan Somaklon:

1. Regenerasi langsung :
 - a. Eksplan → tunas → tanaman atau embrio somatik
 - b. Eksplan → kalus → tunas → tanaman
2. Kultur sel tunggal (pada bab sebelumnya)
3. Kultur protoplas (pada bab sebelumnya)

Variasi somaklonal juga dapat digolongkan berdasarkan sumbernya:

1. Variasi yang terbentuk dalam jaringan tumbuhan (preexisting variability)
 Lebih dari 90 % tumbuhan Angiospermae berkembang diiringi dengan perubahan secara langsung pada DNA dan Nukleus. Hasilnya adalah kebanyakan tumbuhan dengan jaringan yang matang dan terdiferensiasi seperti korteks dan pembuluh lainnya, menunjukkan adanya variasi kromosom dalam selnya. Pada meristem apeks (tudung akar dan pucuk) dimana sintesis DNA yang diikuti oleh kariokinesis dan sitokinesis lebih giat terjadi, pada umumnya kondisi selnya pada tingkat diploid yang seragam, tetapi kemudian derivat sel meristem tidak membelah secara mitosis normal, namun melalui duplikasi DNA dan endoreduplikasi. Bentuk dari poliploidisasi didalam sel yang terdiferensiasi, yaitu endopoliploidi dalam sel somatisnya
2. Variasi yang dipengaruhi oleh faktor *in vitro*
 - @ Media kultur
 Setengah dari komposisi media terutama dalam penambahan besar mempengaruhi variasi somaklonal. Suatu penelitian yang menggunakan akar kacang-kacangan, apabila media yang digunakan adalah 2,4 D, maka hanya sel diploid yang membelah, tetapi jika kinetin dan ekstrak yeast ditambahkan, setengah sel tetraploid akan membelah. Ada laporan yang mengatakan bahwa 2,4 D dapat merangsang terjadinya poliploid dan merangsang pembelahan sel poliploid, sitokinin dapat merangsang pertumbuhan poliploid pada kalus.
 - @ Pola pertumbuhan melalui regenerasi
 Kalus embrionik menunjukkan kemungkinan sel yang mempunyai gen yang lebih stabil, dibandingkan dengan kalus yang melalui difrensiasi organ. Pada organ, kasus-kasus tertentu contoh: kalus embriogenik cery dan jagung menghasilkan varian yang sangat rendah. Regenerasi secara langsung akan menghasilkan klon.
 - @ Jangka waktu kultur dan frekwensi subkultur
 Variasi kariotip dapat terjadi apabila umur kalus meningkat dan jumlah

sub kultur bertambah. Pada umumnya sub kultur dapat mengurangi variasi dengan perbandingan terhadap kalus yang tidak dipindahkan dalam jangka waktu lama.

@ Jumlah ploidi dan genotip

Genotif merupakan faktor yang penting, contoh : pada frekwensi pertumbuhan pelargonium dan flax berubah mengikuti genotip yang digunakan.

@ Faktor fisik

Faktor fisik dapat mempengaruhi perlakuan sitologis sel yang dikultur, misalnya, suhu dapat mempengaruhi proses mutasi. Pada kasus jumlah tanaman albino *Lolium longiflorum* yang meningkat pada embrio somatik yang dikultur pada **suhu 10 - 15' C**. Pada kalus tembakau, embrio somatik meningkat pada **suhu 35'C**. Sel diploid menjadi kariotip tidak stabil pada suhu 25 'C

@ Prosedur yang digunakan

Regenerasi protoplas dapat memberikan ratusan variasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan regenerasi yang menggunakan eksplan biasa, karena pada kultur protoplas terdiri dari berbagai prosedur yang memberikan tekanan kepada sel, yang dapat menginduksi perubahan, yang mana perubahan tersebut bukan dikarenakan penggunaan media kultur dalam waktu yang lama untuk regenerasi (yang cenderung dapat menghasilkan variasi)

Penilaian Variasi Somaklonal

Variasi yang berguna adalah variasi yang dapat menghasilkan ciri yang baik sebagai kultivar induk, dengan penambahan ciri yang dikehendaki. Oleh karena itu pemilihan perlu dilakukan sejak awal untuk menghindari permasalahan pada kultur jaringan.

Variasi somaklonal dapat dinilai dari ciri keseluruhan fenotip, genotip maupun biokimia tanaman. Untuk penilaian genotip, antara lain hal yang diukur adalah jumlah kromosom.

Analisis DNA dengan tehnik Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) sering digunakan untuk memperjelas perbedaan kecil pada tanaman. Analisis tanaman secara RFLP dapat mengenal dengan jelas perubahan pada jipola pita DNA yang menghasilkan varian.

Untuk memastikan variasi somaklonal dapat berguna, maka harus memiliki beberapa ciri:

- Melibatkan ciri yang penting
- Ciri yang berubah harus lebih baik dari yang ada pada induknya.
- Cirinya dapat berubah meski ciri pada induk sudah baik
- Variasi dapat diturunkan pada generasi berikutnya, dengan propagasi yang dipilih

Pemanfaatan dan penerapan keragaman Somaklonal

Pada tahap awal variasi somaklonal dapat memberikan kontribusi yang nyata pada pemuliaan tanaman. Regenerasi selanjutnya selalu menunjukkan variasi yang luas dalam morfologi tetapi sebagian besar akan hilang pada turunan I yang dihasilkan, walaupun variasi tidak mempengaruhi semua sifat dan tidak selalu menguntungkan dalam pertanian, tetapi dalam pelaksanaan penelitian selalu ada dengan nomor - nomor yang berguna dari sumber variasi tersebut, misalnya hasil penelitian pada induksi variasi somaklonal jagung, diperoleh peningkatan ketahanan terhadap herbisida pada tanaman tersebut, kenaikan toleransi imidazilinone pada jagung, ketahanan terhadap *Helminthosporium sativum* pada gandum dan barley, toleransi terhadap garam pada rami, juga peningkatan terhadap pembekuan, kualitas butir dan kandungan protein pada gandum, serta peningkatan ukuran biji dengan kandungan protein yang tinggi pada padi.

Beberapa contoh hasil pemanfaatan variasi somaklonal sebagai tanaman unggul baru diantaranya:

a. Mawar mini (*Rosa hibrida* L.)

Mawar yang banyak ditanam di Indonesia umumnya merupakan hasil introduksi. Untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman tersebut maka dilakukan keragaman somaklonal dengan cara melakukan perlakuan kombinasi radiasi sinar gamma 0-12 rad pada mata tunas *in vitro*. Setelah eksplan beregenerasi, mata tunas *in vitro* tersebut diisolasi dari biakan dalam botol. Hasil yang diperoleh :terjadinya perubahan pada warna kelopak bunga hal ini dapat terjadi karena adanya mutasi pada kumpulan sel somatik dan dapat terekspresi pada sel meristem dan akan membentuk suatu sektor yang stabil.

b. Panili (*Vanilla planifolia*)

Panili merupakan salah satu tanaman industri yang potensial untuk dikembangkan. Masalah utama dalam pengembangannya adalah serangan patogen *Fusarium oxysporum*. Untuk mendapatkan genotip baru yang tahan penyakit telah dilakukan seleksi invitro dengan komponen seleksi berupa toksin murni asam fusarat dan filtrat.

c. Nilam (*Pogostemo cablin*)

Nilam merupakan tanaman penghasil minyak atsiri yang penting. Indonesia sebagai pemasok utama dipasaran dunia. Peningkatan rendemen minyak dan varietas yang telah ada, sulit dilakukan karena nilam di Indonesia tidak berbunga. Salah satu teknologi yang dapat dimanfaatkan adalah melalui keragaman somaklonal. Perlakuan radiasi mengakibatkan nilai rata-rata menjadi lebih kecil atau bahkan tidak berpengaruh. Adanya keragaman diantara nomor-nomor yang diharapkan memiliki sifat-sifat yang lebih baik. Dari sekitar 411 somaklon yang berhasil ditanam dilapang, setelah dianalisis kadar minyaknya lebih tinggi dibandingkan tanaman induknya, yaitu nilam Aceh. Keanekaragaman yang timbul tidak hanya pada kadar minyaknya. Tetapi juga pada komponen pertumbuhan lainnya.

d. Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.)

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi adalah memanfaatkan lahan masam yang luasnya mencapai 101.519 juta Ha. Namun masalah yang dihadapi dalam usaha pengembangannya adalah terbatasnya varietas yang tahan lahan masam. Untuk mengatasi masalah tersebut dapat dilakukan dengan seleksi *in vitro*. Melalui seleksi *in vitro*, massa sel somatik dari varietas sindoro yang diinduksi dari embriozigotik muda diseleksi dengan Al dan pH rendah. Selain tahan Al dan pH rendah juga telah diperoleh nomor-nomor kedelai yang tahan kekeringan melalui seleksi *in vitro* dengan radiasi gamma 400 rad pada massa sel embriogenik (kalus) dan seleksi massa sel dengan Poly ethylen Glycol = PEG (0, 25, 50 dan 75 %) untuk memperoleh mutan yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Setelah diseleksi, dilakukan regenerasi sel yang toleran terhadap PEG untuk membentuk struktur embrio somatik dan benih somatik.

e. Padi (*Oryza sativa* L.)

Lestari dkk (2005) telah berhasil memperoleh somaklon padi yang menunjukkan keragaman genetik yang tinggi dan tahan kekeringan.

f. Pisang (*Musa* spp)

Peningkatan keragaman dapat diperoleh dari sel-sel somatik, yang pada dasarnya merupakan individu yang berkemampuan untuk beregenerasi membentuk tanaman lengkap. Hasil penelitian Mariska dkk (2006) menunjukkan bahwa radiasi sinar gamma 100 rad dapat menginduksi mutasi pada kalus pisang ambon kuning dengan bibit yang berasal dari kalus.

g. Bawang (*Allium* spp)

Kultur jaringan juga telah dilakukan pada berbagai *Allium* spp. Untuk produksi

massal secara *in vitro*, perkembangan poliploid dan konservasi secara *in vitro*.

h. Anggur (*Vitis vinifera*)

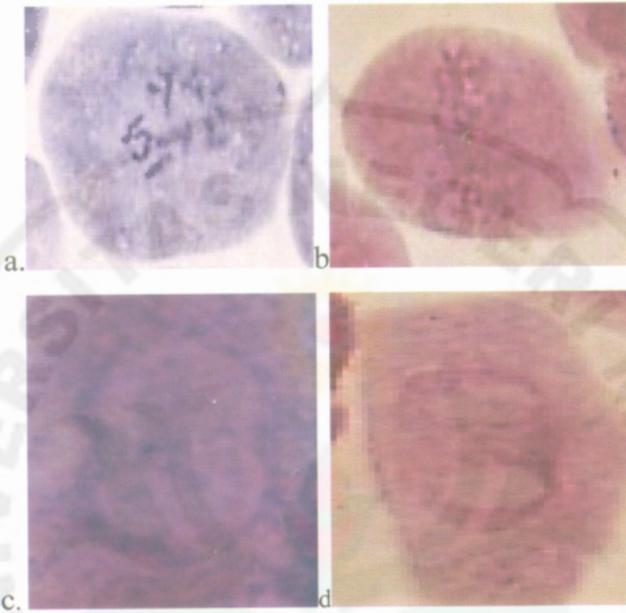
Variasi somaklonal dan mutasi yang diinduksi secara *invitro* juga telah diteliti pada tanaman anggur, yang diregenerasikan dari eksplan daun melalui somatik embriogenesis. Perhitungan kromosom ujung akar digunakan untuk menskrining tanaman yang diregenerasikan. Radiasi sinar gamma 5-100 Gy meningkatkan frekwensi pembentukan tanaman tetraploid, kalus embriogenik (7,6%) dan tanaman aneuploid.

Kendala dan Prospek

Variasi somaklonal mempunyai aspek positif dan negatif. Dalam propagasi *in vitro* yang tidak menyenangkan adalah progeni tidak true-type, biasanya bernilai rendah. Perubahan spontan kemungkinan juga merupakan problem dan percobaan transformasi sel tanaman. Frekwensi perubahan yang tinggi dan tidak berhubungan dengan perlakuan pada penelitian dapat menimbulkan interpretasi hasil yang membingungkan dan mengganggu hasil dibandingkan dengan keuntungan dalam transfer gen spesifik. Walaupun variabilitas diantara kultur sel mungkin menurunkan mutagen awal pada *seleksi in vitro*, dan dapat mengakibatkan variasi spesifik yang dapat diseleksi.

Prospek kultur *in vitro* untuk meningkatkan keragaman genetik terhadap perubahan sifat tertentu dan tipe tanaman yang beradaptasi dengan baik akan sangat baik untuk dikembangkan walaupun tanpa melalui hibridisasi. Variasi yang berasal dari kultur jaringan harus diperhatikan secara serius sebagai komponen program pemuliaan dengan syarat berikut:

- Perubahan harus stabil
- Perubahan harus merupakan sifat yang penting seperti vigour, hasil, kemasakan, tipe tanaman, fertilitas.
- Variasi somaklonal yang menarik pada umumnya meliputi sifat positif yang belum ada pada nomor - nomor galur yang dihasilkan pemulia tanaman.
- Kemampuan identifikasi dan karakterisasi variasi somaklonal tidak melebihi dari syarat - syarat yang diperlukan dalam pemuliaan secara konvensional.
- Variasi somaklonal yang nyata sebagai sumber bagi pemulia juga tergantung pada proses pembentukannya (pada galur - galur penting).



Gambar a. Kromosom kacang hijau (kontrol), b, Hasil perlakuan dosis 0,01 % kolkhisin menunjukkan jumlah kromosom berlipat. c dan d. Hasil perlakuan dosis 0,015 % kolkhisin menunjukkan sel yang akan membelah namun tidak terbentuk skat antara sel (Harahap, 2000)



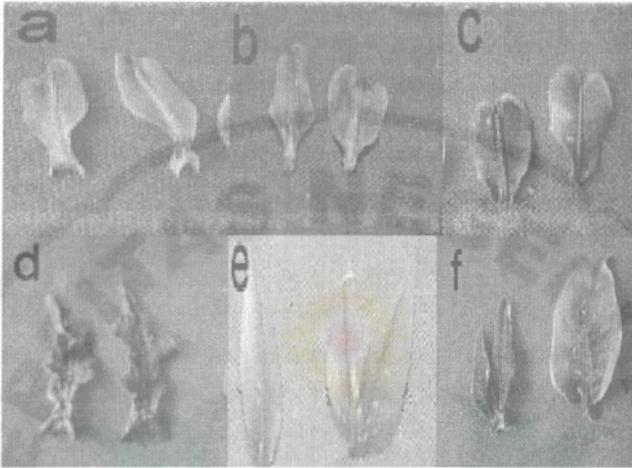


Gambar Tanaman Nenas Cv. Smoot Cayen yang mengalami variegata dengan perlakuan: sub kultur berulang-ulang dan beberapa kombinasi ZPT BAP dan TDZ(atas kebaikan Nursandi, F. 2006)

Hasil penelitian penulis pada induksi varisi genetik tanaman manggis *in vitro* menunjukkan bahwa terjadi perubahan pada level DNA, Isozim, anatomi dan sitologi maupun morfologi tanaman dengan perlakuan sinar gamma. Hal ini dapat terjadi karena sinar gamma, dalam mekanisme kerjanya merupakan pancaran gelombang elektromagnetik yang daya tembusnya tidak hanya pada bagian perifer saja namun gelombang elektromagnetik tersebut dapat menembus hingga ke materi genetik.



Gambar a. Tunas Manggis albino dan bersulur b. Tunas Manggis berakar di bagian atas, hasil perlakuan berbagai dosis radiasi sinar gamma (Harahap, 2005)



Gambar Morfologi daun tanaman manggis in vitro ini hasil perlakuan sinar gamma dengan berbagai dosis radiasi. Misalnya tanaman yang dikarakterisasi dengan nomor a. 13.40.1, b. 5.10.2 dan c. 13.35.2 dengan pangkal daun runcing dan tumpul, susunan daun bertangkai dan duduk dan ujung terbelah. d. 20.10.1. daun berwarna hijau tua, helai daun jorong, ujung daun meruncing, pangkal daun runcing, pinggir daun bergerigi. Susunan daun bertangkai, permukaan daun berkerut. e. 5.10.1. dan f. 15.45.1 memiliki dua daun dalam satu tangkai dengan warna daun hijau muda dan hijau tua.

Pertanyaan :

- Variasi genetik tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan dan kultur sel, yang meliputi semua variasi genetik yang terjadi pada tanaman yang diregenerasikan dari sel yang tidak berdiferensiasi protoplas, kalus ataupun jaringan. Hal tersebut merupakan pengertian dari :
 - Variasi genetik
 - Variasi somaklonal
 - Variasi protoplas
 - Variasi regenerasi
 (Kunci Jawaban : B, Tipe Soal C₂)
- Teknik untuk mendapatkan somaklon ialah dengan cara berikut ini, kecuali:
 - Regenerasi langsung
 - Kultur sel tunggal
 - Kultur protoplas
 - Kultur genetik
 (Kunci Jawaban : D, Tipe Soal C₁)

3. Perubahan jumlah kromosom, perubahan struktur dan susunan kromosom, pindah silang somatik, transposon, penambahan dan pengurangan produk gen, pembebasan terhadap virus. Hal diatas merupakan pembagian kelompok variasi genetic tanaman berdasarkan :
- Makanannya
 - Asal keragaman
 - Bentuk tanaman
 - Pembagian struktur
- (Kunci Jawaban : B, Tipe Soal C3)

GLOSARIUM

Variasi somaklonal:

Variasi genetik tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan atau kultur sel, yang meliputi semua variasi genetik yang terjadi pada tanaman yang diregenerasikan dari sel yang tidak berdiffrensiasi protoplas, kalus ataupun jaringan

Amitosis:

Reproduksi sel di mana sel membelah diri secara langsung tanpa melalui tahap-tahap pembelahan sel.

Kariokinesis:

Pembagian inti menjadi dua bagian

Sitokinesis:

Pembagian sitoplasma menjadi dua bagian, peristiwa pembelahan sel.

Mutan:

Individu yang mengalami perubahan materi genetic DNA maupun RNA, baik pada taraf urutan gen (disebut mutasi titik) maupun pada taraf kromosom

Fertilitas:

Subur, berpeluang untuk menghasilkan keturunan

Fragmentasi:

Reproduksi aseksual atau kloning di mana suatu organisme dibagi menjadi fragmen-fragmen

Biosintesis:

Proses penyusunan suatu molekul, senyawa.

Eksplorasi:

Tindakan mencari atau melakukan perjalanan dengan tujuan menemukan sesuatu

Viabilitas:

Kemampuan hidup (missal : benih)

Kriopreservasi:

Suatu proses pembekuan untuk menghentikan sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel, dimana proses hidup dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan

Aklimatisasi:

Suatu tahapan penyesuaian diri tanaman hasil kultur jaringan terhadap lingkungan sekitar

Polinisasi:

Proses penyerbukan (istilah yang biasanya dengan bantuan manusia)

Inisiasi:

Pengambilan eksplan dari bagian tanaman yang akan dikulturkan dan digunakan untuk proses pembentukan (misalnya tunas)