

**LAPORAN HASIL PENELITIAN  
HIBAH BERSAING TAHUN 2011**

**PENINGKATAN KERAGAMAN SOMAKLONAL MELALUI  
KULTUR IN VITRO DAN IRADIASI SINAR GAMMA KE  
ARAH KETENGGANGAN TERHADAP ALUMINIUM  
DAN pH RENDAH PADA TANAMAN PADI**

**Tim Peneliti :**

**Ir. Herkules, M.S (Ketua)**

**Dr. Syahmi Edi, M.Si (Anggota)**

**Drs. Lazuardi, M.Si (Anggota)**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Hibah Penugasan Penelitian Hibah Bersaing No. 036/SP2H/PL/Dit.Litabmas/IV/2011 tanggal 14 April 2011

**UNIVERSITAS NEGERI MEDAN  
2011**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Peningkatan Keragaman Somaklonal melalui Kultur *In Vitro* dan Iradiasi Sinar Gamma ke Arah Ketenggangan terhadap Aluminium dan pH Rendah pada Tanaman Padi

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : **Ir. Herkules, M.S**  
b. Jenis Kelamin : Laki-laki  
c. NIP : 19621019 198803 1 004  
d. Jabatan Struktural : -  
e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
f. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi  
g. Pusat Penelitian : Universitas Negeri Medan  
h. Alamat : Jl. Willem Iskandar, Pasar V, Medan  
i. Telepon/Faks : 0616625970/0616613319  
j. Alamat Rumah : Jl. Pandu II Blok F No 30 Perumahan Cendana  
Asri Batang Kuis, Medan  
k. Telepon/Faks/E-mail : 06177109019

3. Jangka Waktu Penelitian : 3 (tiga) Tahun

4. Pembiayaan

- a. Jumlah yang disetujui Dikti tahun ke-1 (2011) : Rp. 35.000.000,-  
b. Jumlah biaya yang diajukan tahun ke-2 (2012) : Rp. 50.000.000,-  
c. Jumlah biaya yang diajukan tahun ke-3 (2013) : Rp. 50.000.000,-  
d. Biaya dari Institusi Lain : Rp. -

Mengetahui,  
Dekan Fakultas MIPA

Medan, 25 Nopember 2011  
Ketua Peneliti,



Prof. Drs. Mottan, M.Sc., PhD.  
NIP. 195908051986011001

Ir. Herkules, M.S  
NIP. 196210191988031004



Direktur Penelitian  
Dr. Ridwan A. M. Sami, M.Si  
NIP. 196406101988031017

## RINGKASAN

Tujuan dari penelitian Hibah Bersaing tahun pertama adalah mendapatkan beberapa genotipe planlet (tanaman) padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro*.

Metode yang digunakan untuk mencapai tujuan tersebut adalah : 1) metode peningkatan keragaman somaklonal melalui kultur kalus iradiasi sinar gamma (Edi, 2004), 2) uji pada kultur *in vitro* menggunakan komposisi media MS yang dimodifikasi (Van Sint Jan *et al.*, 1997).

Kegiatan penelitian tahun pertama meliputi : induksi kalus selama 10 minggu, iradiasi sinar gamma selama 1 minggu, pengujian kalus pada media *in vitro* selama 12 minggu, regenerasi kalus menjadi tunas selama 8 minggu, induksi akar pada kalus yang sudah bertunas 6 minggu.

Hasil penelitian tahun pertama adalah : (1) Kultur kalus dan iradiasi sinar gamma dapat meningkatkan keragaman penampilan kalus yang terlihat dari warna kalus (mulai dari warna kuning, kuning keputihan, putih kekuningan, bening atau tidak), struktur kalus (kompak, kompak tidak merata, friable, nodul jelas atau tidak); (2) kalus dengan penampilan putih kekuningan, bening, friabel dan nodul yang jelas akan memberikan kalus bertunas lebih banyak; dan (3) didapat 68 genotipa tanaman padi dari 3 varietas yang digunakan, dengan rincian : 23 genotipa dari turunan varietas nias-1, 23 genotipa dari turunan varietas nias-2 dan 22 genotipa dari turunan varietas nias-3.

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmatNya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan membuat laporan hasil tahun I (tahun 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan planlet (tanaman) pada ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro*.

Selesainya penelitian ini tidak lepas dari bantuan dan arahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang tulus kepada :

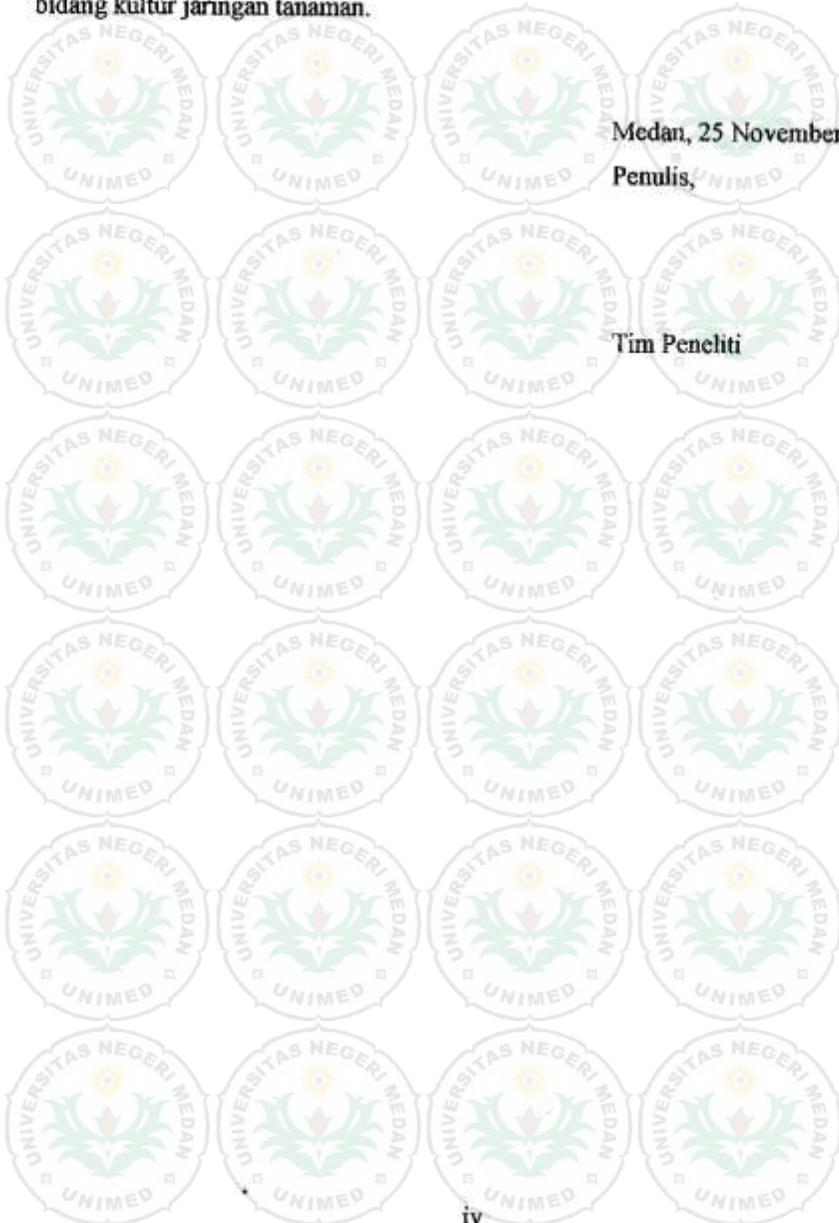
1. Bapak Direktur Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas pendanaan yang telah diberikan, sehingga penelitian ini dapat berjalan sesuai dengan jadual.
2. Bapak Ketua beserta Staf Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan yang telah memproses secara baik, mulai dari pengajuan proposal sampai dengan pengiriman laporan hasil penelitian.
3. Bapak Dekan FMIPA Universitas Negeri Medan yang selalu memotivasi penulis mulai dari pembuatan proposal sampai penulisan laporan hasil penelitian.
4. Bapak Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Medan beserta jajarannya yang telah memberikan sarana dan prasarana penelitian sehingga penelitian ini dapat berjalan sebagaimana mestinya.

Akhirnya kepada semua pihak yang turut membantu dalam penelitian hingga penulisan laporan hasil penelitian tahun I, penulis sampaikan terima kasih. Semoga laporan ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu biologi, khususnya bidang kultur jaringan tanaman.

Medan, 25 November 2011

Penulis,

Tim Peneliti



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN .....	ii
SUMMARY .....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
I. PENDAHULUAN .....	1
II. STUDI PUSTAKA .....	6
III. METODE PENELITIAN .....	15
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	23
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	38
DAFTAR PUSTAKA .....	39
LAMPIRAN .....	42
Artikel Ilmiah .....	45



## DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-1 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	24
4.2. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-2 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	25
4.3. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-3 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	26
4.4. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-1	27
4.5. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-2	28
4.6. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-3	29
4.7. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-1 .....	30
4.8. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-2 .....	31
4.9. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-3 .....	33
4.10. Jumlah kalus dalam media seleksi Al dan pH rendah, jumlah kalus yang diregenerasikan dan jumlah kalus bertunas/berakar untuk setiap turunan varietas nias-1, nias-2 dan nias-3 .....	37

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Indonesia sampai saat masih menghadapi masalah kekurangan persediaan beras nasional. Hal ini disebabkan jumlah penduduk yang terus meningkat serta pengurangan lahan subur karena konversi untuk kepentingan perumahan, industri, perkantoran, dan infrastruktur. Peningkatan produksi padi di masa akan datang dilakukan dengan memanfaatkan lahan sub-optimal yang masih sangat luas di luar Pulau Jawa dan Bali. Salah satu kendala pada lahan sub-optimal adalah kemasaman tanah (keracunan Al dan pH rendah). Solusinya adalah pengembangan varietas padi unggul adaptif terhadap lahan sub-optimal melalui pemuliaan dan penerapan bioteknologi, hal ini sesuai dengan Agenda Riset Nasional 2010 – 2014. Target capaian 2014 adalah rekombinasi jenis dan varietas tanaman pangan pokok serta benih tanaman tenggang lahan masam (Dewan Riset Nasional, 2010).

Cara yang dilakukan untuk mencapai target di atas melalui pemuliaan dan penerapan bioteknologi pada kultur *in vitro* dan iradiasi sinar gamma. Kultur *in vitro* dilakukan dengan cara menginduksi kalus sehingga keragaman sel-sel somatik meningkat. Selanjutnya untuk lebih meningkat keragaman pada sel-sel kalus dilakukan dengan cara iradiasi sinar gamma. Terbukti bahwa kultur kalus dan iradiasi sinar gamma dapat meningkatkan keragaman somaklonal (Edi, 2004). Keragaman yang tinggi memudahkan pengujian terhadap Al dan pH rendah.

Hal lain yang tidak kalah pentingnya adalah eksplan yang merupakan sumber kehidupan dalam proses perakitan. Setelah dilakukan observasi di Sumatera Utara, maka dipilih Kepulauan Nias sebagai sumber eksplan karena : 1) jenis padi ladang yang biasa ditanam oleh penduduk disana lebih banyak, 2) produksinya tinggi, 3) tahan hama dan penyakit, 4) morfologinya spesifik/khas dan berpotensi dikembangkan di daerah lain di Sumatera Utara, dan 5) uji cepat (percobaan pendahuluan) di Laboratorium untuk mengetahui kepekaan terhadap Al dan pH rendah, hasilnya adalah beberapa jenis padi ladang peka asal Kepulauan Nias (Herkules dan Edi, 2008). Jenis padi peka inilah yang digunakan sebagai sumber eksplan pada penelitian Hibah Bersaing tahun 2011 – 2013, yang mana sebelumnya telah dilakukan Penelitian Fundamental untuk mengetahui media dan zat pengatur tumbuh terbaik dalam menginduksi dan meregenerasikan kalus padi.

## 1.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan :

1. Mendapatkan planlet' (tanaman) padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro* (Tahun I).
2. Memperoleh tanaman padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian larutan hara (Tahun II).
3. Memperoleh benih padi vigor dan fertil yang tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian tanah asam (Tahun II).
4. Mendapatkan benih padi vigor dan fertil tanaman padi pada setiap generasi dari beberapa genotipe tanaman padi yang diuji sifat tahanannya terhadap keracunan Al dan pH rendah hasil uji progeni sampai generasi keempat (R4) (Tahun III).

## 1.3. Urgensi (Kemtamaan) Penelitian

### 1.3.1. Urgensi Bagi Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Seni

Penelitian ini sangat penting untuk pengembangan ilmu pengetahuan terutama dalam bidang kultur jaringan, antara lain :

1. Menginduksi keragaman somaklonal melalui kultur *in vitro* (kalus). Sudah banyak penelitian yang menyatakan bahwa keragaman somaklonal dapat ditingkatkan melalui kultur *in vitro* (kultur kalus). Kalus merupakan kumpulan sel yang tanpa bentuk (*amorphous*), membelah secara terus menerus tanpa mengalami diferensiasi (dediferensiasi). Kalus secara *in vitro* dapat terbentuk dengan adanya keseimbangan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang diberikan. Auksin kuat (2,4-D dan NAA) dan sitokinin kuat (BAP) dapat meningkatkan pertumbuhan dan pembelahan sel kalus, sehingga diharapkan adanya penyimpangan pembelahan mitosis. Penyimpangan pembelahan mitosis yang begitu cepat, mengakibatkan keragaman sel menjadi meningkat. Selain itu pemberian 2,4-D dapat menghalangi terbentuk benang-benang spindel sehingga pada waktu pembelahan intinya tidak memisah (*double nucleus*).
2. Langkah selanjutnya adalah menyeleksi sel ke dalam media yang mengandung Al (pH rendah). Sel-sel yang mampu bertahan selama seleksi berarti sel tersebut tahan terhadap bahan penyeleksi (Al dan pH rendah).
3. Selanjutnya meregenerasikan kalus hasil seleksi *in vitro* dan iradiasi sinar gamma menjadi planlet dengan memodifikasi media dasar dan zat pengatur tumbuh

sehingga didapatkan planlet yang beragam. Keberhasilan tahap ini akan menentukan tahap-tahap selanjutnya karena disamping mendapatkan planlet (tanaman) beragam, juga sekaligus memperbaiki metode dan mempersingkat waktu seleksi.

4. Perbaikan dan pengembangan metode pemuliaan tanaman dan penerapan bioteknologi dengan berbagai modifikasi atau rekayasa sehingga mempermudah untuk mendapatkan varietas/jenis tanaman unggul

### 1.3.2. Manfaat bagi Pembangunan dan Institusi

Penelitian ini disesuaikan dengan Agenda Riset Nasional tahun 2010 – 2014 sehingga memberikan manfaat besar bagi Pembangunan dan Institusi. Hal ini akan tercermin dari luaran (*out put*) penelitian itu sendiri. Berikut ini uraian manfaat bagi pembangunan dan institusi.

#### 1.3.2.1. Manfaat bagi Pembangunan

Ketahanan pangan merupakan Agenda Riset Nasional tahun 2010 – 2014, hal ini sesuai dengan prioritas pembangunan Kabinet Indonesia Bersatu – II, maka pembangunan diarahkan untuk meningkatkan ketahanan pangan dan melanjutkan revitalisasi pertanian dalam rangka mewujudkan kemandirian pangan, peningkatan daya saing produk pertanian, peningkatan pendapatan petani, serta kelestarian lingkungan dan sumber daya alam.

Permasalahan dan tantangan yang dihadapi dalam aspek ketersediaan dan produksi pangan, disamping banyak dipengaruhi oleh perubahan cepat pada lingkungan global dan perubahan iklim, secara umum terjadi akibat adanya dua kecenderungan utama. Kecenderungan pertama adalah terus bertambahnya kebutuhan pangan seiring dengan laju pertumbuhan penduduk. Kecenderungan kedua adalah semakin menyempitnya lahan pertanian karena tekanan penduduk sehingga terjadi konversi untuk berbagai kepentingan lain.

Upaya meningkatkan produksi pangan dimasa yang akan datang tidak akan menjadi lebih mudah karena lahan subur yang tersedia akan makin berkurang karena konversi untuk kepentingan perumahan, industri, perkantoran, dan infrastruktur. Laju konversi lahan pertanian ke non pertanian di Indonesia diperkirakan mencapai

106.000 hektar selama 5 tahun. Laju konversi tersebut paling pesat terjadi di sekitar kota-kota besar di Pulau Jawa. Solusinya adalah memanfaatkan lahan sub-optimal yang sangat diluar Pulau Jawa (Sumatera, Kalimantan, dan Papua). Lahan sub-optimal mempunyai banyak kendala, salah satu kendalanya adalah lahan masam (pH rendah). Oleh sebab itu pengembangan varietas adaptif untuk lahan sub-optimal perlu dilakukan, penelitian ini akan memberi luaran (*out put*) yaitu mendapatkan beberapa genotipe padi tenggang AI dan pH rendah yang dapat diaplikasikan pada lahan masam.

#### 1.3.2.2. Manfaat bagi Institusi

Bagi Institusi sendiri penelitian ini sangat bermanfaat untuk pengembangan diri, antara lain :

1. Pengembangan Laboratorium Kultur Jaringan yang sudah ada sekarang ini sehingga kualitasnya lebih meningkat. Indikator peningkatan kualitas Laboratorium ini ditandai dengan mobilitas kerja yang tinggi. Mobilitas kerja yang tinggi akan dapat dicapai dengan tersedianya bahan-bahan yang akan digunakan serta alat-alat yang akan dipakai. Melalui penelitian ini akan dapat menyediakan bahan dan alat yang tidak bersifat investasi.
2. Menunjang proses belajar dan mengajar bagi mahasiswa yang mengambil mata kuliah kultur jaringan (matakuliah wajib bagi mahasiswa non kependidikan). Matakuliah ini disamping bobot teorinya sebanyak 3 sks, tetapi juga ada praktikumnya 1 sks.
3. Mempercepat penyelesaian masa studi mahasiswa karena dalam penelitian ini akan melibatkan beberapa orang mahasiswa untuk penelitian di Laboratorium dalam rangka penyusunan tugas akhir (skripsi).
4. Mempercepat kenaikan pangkat/jabatan seorang peneliti (dosen) karena penelitian ini akan memberikan kredit point untuk kum B.
5. Menaikkan peringkat Universitas di tingkat nasional berdasarkan banyak proposal penelitian yang diterima di pusat (*track record*).

## BAB II. STUDI PUSTAKA

### 2.1. Pertumbuhan dalam Kultur Jaringan (*In Vitro*)

Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali (Bhojwani dan Razdan, 1983). Pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman secara *in vitro* ditentukan oleh beberapa faktor komplek di antaranya : (1) susunan genetik dari spesies tanaman, (2) nutrisi, (3) faktor-faktor pertumbuhan fisik, (4) beberapa senyawa organik seperti zat pengatur tumbuh, vitamin dan sebagainya.

Gunawan (1992) menyatakan bahwa keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat bergantung pada media yang digunakan. Media kultur jaringan tersusun dari : hara makro dan mikro, vitamin, gula, asam amino dan N organik, persenyawaan komplek alamiah (air kelapa, juice tomat), buffer organik, arang aktif, zat pengatur pertumbuhan dan bahan pematid media.

Pengaruh komposisi media dapat disebabkan oleh keseimbangan komponen yang menyusun media di antaranya zat pengatur tumbuh. Salah satu mekanisme yang mengatur organogenesis adalah taraf relatif auksin (IAA, NAA, dan 2,4-D) dan sitokinin (BAP, zeatin dan thidiazuron) dalam media. Sebagai contoh, pada tembakau dengan nisbah auksin terhadap sitokinin dalam media (IAA/kinetin) tinggi, akan membentuk akar dan apabila sebaliknya akan terbentuk tunas, sedangkan apabila nisbah auksin/sitokinin sama akan terbentuk kalus (Bhojwani dan Razdan, 1983). George dan Sherrington (1983) juga menyatakan bahwa pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* diatur oleh interaksi dan keseimbangan antara suplai zat pengatur tumbuh dalam media dan yang diproduksi secara endogen oleh sel-sel yang dikultur.

Pertumbuhan dimanifestasikan sebagai peningkatan permanen dalam hal ukuran, atau berat. Ukuran tidak hanya kriteria yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan, misalnya pertumbuhan sel dalam kultur suspensi dapat dinilai dengan mengukur bobot segar jaringan yang hidup. Pertumbuhan dari zigot akan menyebabkan terjadinya penambahan volume, bobot, jumlah sel, jumlah

protoplasma dan juga kompleksitas. Pengukuran pertumbuhan dapat dilakukan terhadap faktor-faktor tersebut walaupun yang banyak digunakan adalah pengukuran pertambahan bobot kering (Salisbury dan Ross, 1995; Taiz dan Zeiger, 1991).

## 2.2. Pengaruh Keracunan Al

Kendala utama dalam peningkatan produksi pangan pada lahan kering atau lahan marginal adalah rendahnya ketersediaan hara N, P, K, Ca, Mg dan Mo (Raper dan Kramer, 1987; Marschner, 1995). Pada lahan dengan tingkat kemasaman tinggi, pertumbuhan tanaman dihambat oleh ion-ion logam seperti Al, Fe dan Mn. Namun di antara ion-ion tersebut Al merupakan unsur penting karena merupakan faktor utama dalam penghambatan pertumbuhan dan bersifat racun bagi tanaman. Menurut Marschner (1995) lebih dari 70 % tanah masam tropis mengalami defisiensi Ca dan Mg sehingga memiliki kapasitas fiksasi P yang amat tinggi.

Salah satu penyebab kerusakan pada akar oleh ion polimer Al adalah terbentuknya ikatan antar polimer Al dengan membran plasma akar yang menyebabkan kerusakan pada membran dan kebocoran  $K^+$  dari sel akar (Matsumoto, Yamamoto dan Kasai, 1992).

Efek kerusakan Al pada tanaman diawali dengan gangguan terhadap tudung akar yang mempunyai sinyal dan merupakan detektor gaya gravitasi serta halangan mekanis sehingga pada gilirannya akan mengurangi sekresi musilage sel tudung akar dimana sel tersebut merupakan sumber pengatur endogen pertumbuhan. Pada tingkat molekuler, Al berhubungan dengan DNA sehingga interaksi Al dengan DNA akan mempengaruhi sifat-sifat fisikokimia dan fungsi biologis seperti menghentikan pembelahan sel pada meristem akar, perpanjangan sel, sintesis DNA dan RNA. Hal ini juga didukung oleh hasil penelitian Matsumoto (1991) yang menyatakan bahwa Al menghambat pembelahan sel dengan mengganggu penggandaan DNA.

Pada dinding sel, penghambatan terjadi karena Al menggantikan kedudukan  $Ca^{2+}$  pada lamela tengah.  $Ca^{2+}$  mempunyai peranan penting dalam transpor ion melewati membran plasma sebab Ca merupakan "second messenger" dalam aktivitas  $H^+$  - ATPase dengan bantuan calmodulin. Dalam hal ini dengan digantikannya  $Ca^{2+}$  yang melekat pada calmodulin akan terjadi perubahan aktivitas enzim. Ikatan Al dengan karboksil ( $RCOO^-$ ) membentuk ikatan kuat sehingga sel tidak mampu

membesar. Selain itu Al juga berhubungan dengan membran lipid bilayer pada sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur membran karena  $\text{Ca}^{2+}$  digantikan oleh  $\text{Al}^{3+}$  yang akhirnya mempengaruhi penyerapan hara (Marschner, 1995).

### 2.3. Mekanisme Toleransi Al

Menurut Taylor (1991) dan Marschner (1995) ada dua mekanisme toleransi tanaman terhadap Al yaitu mekanisme eksklusi dan mekanisme toleransi internal. Dalam hal ini mekanisme eksklusi terdiri dari : immobilisasi pada dinding sel, permeabilitas selektif dari membran plasma, meningkatnya pH dalam rizosfir atau apoplas akar, eksudasi ligan kelat, eksudasi fosfat dan effluk Al; sedang mekanisme toleransi internal termasuk kelatisasi Al oleh asam organik (asam malat) pada sitoplasma, kompartementasi Al dalam vakuola, isoenzim toleran, sintesis protein spesifik pengikat Al yang akan menurunkan serapan Al ataupun peningkatan effluk Al. Pembentukan kompleks Al dengan asam organik merupakan salah satu mekanisme toleransi tanaman terhadap Al. Asam organik berperan dalam eksklusi Al melalui pelepasannya dari akar dan detoksifikasi Al dalam simplas dimana asam organik tersebut dapat mengkelat Al dan mereduksi atau mencegah pengaruh racun Al. Taylor (1991) juga mengemukakan bahwa tanaman yang toleran Al cenderung meningkatkan pH di daerah rizosfir. Perubahan pH pada daerah rizosfir ini berhubungan dengan kemampuan tanaman dalam penyerapan  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$  (Harjadi dan Yahya, 1988). Bila  $\text{NO}_3^-$  lebih banyak diserap maka pH sitosol akan turun sehingga menyebabkan meningkatnya aktivitas enzim malat untuk menstimulir terjadinya dekarboksilasi malat menjadi piruvat. Penyerapan  $\text{NO}_3^-$  yang lebih besar juga menyebabkan terjadinya pelepasan ion hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) atau ion bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) ke arah perakaran sehingga sekaligus juga meningkatkan pH, yang pada gilirannya akan mengurangi kelarutan Al.

Selanjutnya dari studi pada tingkat molekuler yang dilakukan oleh Richards *et al.* (1998) pada bibit *Arabidopsis thaliana* terbukti bahwa ada empat gen yang terekspresi yang sifatnya transien menginduksi peroksidase, glutathione-S-transferase, protein yang mengikat tembaga biru, protein homolog pada retikulum dan enzim oksidoreduktase. Hasil ekspresi gen tersebut menyimpulkan bahwa perlakuan Al pada *Arabidopsis* menginduksi stres oksidatif. Dalam hal ini stres oksidatif merupakan reaksi tanaman terhadap level toksik Al.

#### 2.4. Keragaman Somaklonal

Metode kultur jaringan selain menghasilkan propagula yang bermutu, juga dapat menghasilkan keragaman somaklonal yang dapat dipergunakan dalam pemuliaan tanaman secara *in vitro*. Keragaman somaklonal tanaman didefinisikan sebagai keragaman genetik dari tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan (Larkin dan Scowcroft, 1981).

Keragaman somaklonal yang dihasilkan dari penerapan teknik kultur jaringan dalam budidaya tanaman, merupakan suatu bukti bahwa melalui perbanyakan secara vegetatif terdapat kemungkinan diperoleh individu baru yang tidak seperti induknya. Dua keuntungan dari perubahan kromosom yang diperoleh melalui keragaman somaklonal yaitu : (1) keragaman yang diperoleh kemungkinan tidak akan diperoleh pada *genepool* yang ada, (2) perubahan beberapa sifat yang akan memperbaiki penampilan. Melalui teknik kultur jaringan terdapat dua hal yang berbeda kepentingannya bagi pemuliaan tanaman yaitu mempertahankan kestabilan genotipe dan merangsang keragaman genetik. Kestabilan genotipe dapat dicapai dengan mendorong sesingkat mungkin fase pertumbuhan tak berdiferensiasi (fase kalus, sel bebas), sedangkan keragaman genetik dapat dicapai pada fase tak berdiferensiasi yang relatif panjang. Sejumlah mutan diduga dapat terbentuk pada fase kalus dan sel bebas, dari sini dapat diseleksi turunan yang sangat berguna bagi pemuliaan tanaman. Oleh karena itu dari hasil kultur jaringan dapat diseleksi genotipe yang berguna bagi pemuliaan tanaman seperti sifat-sifat tahan penyakit, toleransi terhadap salinitas dan ion-ion yang meracuni tanaman (seperti Al, Mn, Pb, Fe), kekeringan serta herbisida (Gunawan, 1992).

Pada kultur jaringan keadaan eksplan dan keseimbangan zat pengatur tumbuh dalam media dapat mempengaruhi kestabilan genetik materi kultur (Ancora dan Sonuino, 1987). Menurut D'Amato (1978) dan Bayliss (1980) kultur jaringan merupakan sumber potensial untuk mendapatkan keragaman, yaitu dengan cara mengatur komposisi media, keseimbangan zat pengatur tumbuh, dan lama mengkulturkan. Terdapat tiga cara memperoleh keragaman somaklonal dari eksplan yang telah berhasil dikerjakan yaitu : (1) eksplan yang beregenerasi langsung membentuk tunas dan akar, (2) menginduksi kalus terlebih dahulu kemudian dilanjutkan penanaman sel tunggal, dan (3) kultur protoplasma (Jacobsen, 1987).

Reisch (1983) mengungkapkan bahwa kultur kalus dapat menghasilkan keragaman somaklonal. Keragaman ini dapat ditingkatkan dengan menggunakan mutagen. Mutagen yang digunakan dapat berupa mutagen fisik seperti sinar-x dan sinar gamma, maupun mutagen kimia dapat berupa bahan kimia antara lain etil metan sulfonat (EMS), dietil sulfat (DES) dan nitroso metil urea (NMU) (Ancora dan Sonuino, 1987).

## 2.5. Mutagen

Keragaman somaklonal yang terjadi tidak hanya mengandalkan pada cara spontan, tetapi dapat ditingkatkan dengan cara induksi dari luar dengan menggunakan mutagen fisik maupun kimia, dan mutasi yang diperoleh merupakan mutasi buatan (*induced mutation*) (Ismachin, 1988). Penggunaan mutagen dalam pemuliaan tanaman dimulai tahun 1940an. Di antara peneliti yang telah melakukannya adalah Freisleben dan In Halle dari Jerman. Mereka berhasil mendapatkan mutan barley yang tahan *mildew*. Pada saat yang sama Tolenaar berhasil mendapatkan mutan dari tanaman tembakau yang diradiasi sinar-x di Deli Medan (Ismachin, 1988).

Sinar-x dan sinar gamma (mutagen fisik) adalah gelombang elektro magnetik, dimana protonnya akan mercesap kedalam materi dengan suatu proses dimana sebagian atau seluruh energi proton ditransfer ke energi kinetik suatu elektron. Elektron ini kemudian kehilangan energinya karena berinteraksi dengan atom molekul materi tadi dan melepaskan elektron lain. Beberapa elektron ini dapat menghasilkan energi yang cukup untuk mengionisir partikelnya sendiri. Proses ionisasi ini menghasilkan radikal ion positif dan ion bebas. Dalam sistem biologi elektron tersebut akan terjebak dalam sistem polar, sehingga cukup waktu bagi ion radikal yang lebih dan aktif itu untuk bereaksi dengan molekul lain atau masuk ke dalam susunan jaringan (Ismachin, 1988).

Materi biologi selalu mengandung air yang cukup banyak. Dengan demikian penyerapan sinar pengion dalam materi biologi akan melibatkan proses fisika dan kimia sebagai sumber kerusakan gen (Ismachin, 1988). Bagi para pemulia tanaman perlu diketahui tinggi rendahnya kecepatan dosis atau laju dosis iradiasi. Dosis terserap untuk setiap sinar pengion adalah jumlah energi yang diserap per berat

benda yang disinari. Satuan sinar radiasi adalah Gray (Gy) atau rad.

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg per gr} = 10 \text{ joule per kg}$$

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 0,1 \text{ krad}$$

Kecepatan dosis adalah jumlah dosis terserap persatuan waktu (rad per detik atau Gy per detik). Dosimeter adalah alat pengukur besarnya dosis radiasi. Dosimeter standar yang umum digunakan adalah dosimeter Fricke, tetapi dosimeter ini hanya untuk pengukuran dosis sinar gamma antara 40–400 Gy. Diluar dosis itu dosimeter sudah tidak tepat lagi. Pengukuran dosis diluar selang tersebut dilakukan kalibrasi dengan perhitungan atas laju dosis dan waktu penyinaran (Ismachin, 1988).

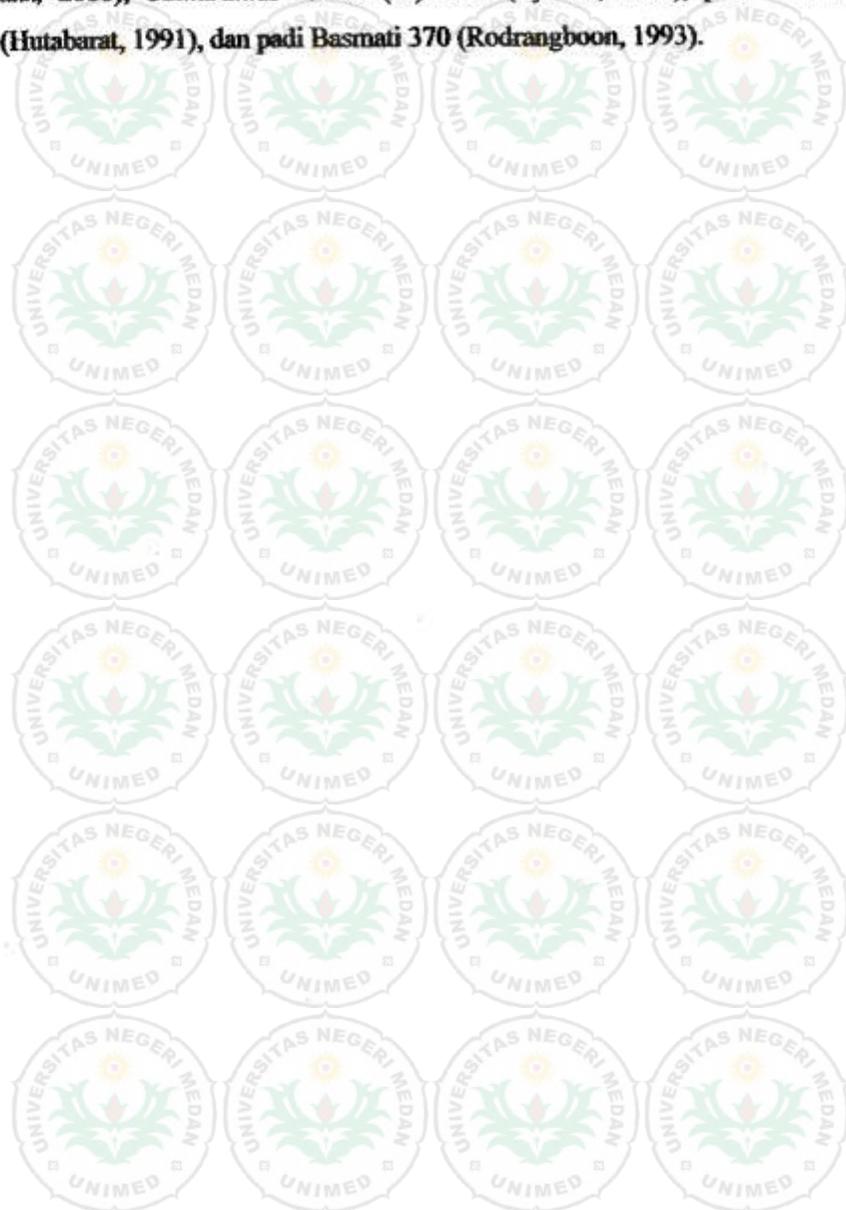
## 2.6. Studi Pendahuluan/Kemajuan yang Telah Dicapai

Studi pendahuluan/kemajuan yang telah dicapai untuk penelitian ini telah banyak dilakukan untuk memberikan gambaran dalam mencapai tujuan jangka panjang dan target khusus yang diinginkan. Berikut ini berbagai penelitian pendahuluan/kemajuan yang telah dicapai.

Penelitian pendahuluan tentang keragaman somaklonal pada padi dapat ditingkatkan melalui kultur kalus dan iradiasi sinar gamma (Edi, 2004), mutasi induksi dengan sinar gamma ( $\text{Co}^{60}$ ) dapat meningkat keragaman somaklonal (Socdjono, 2003), pemanfaatan kultur *in vitro* untuk meningkat keragaman genetik tanaman nilam (Mariskan dan Gati, 20003).

Beberapa penelitian seleksi *in vitro* yang dilakukan untuk mendapatkan ketahanan antara lain : (a) seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap tanah masam dan Al pada tanaman kedelai, dari hasil penelitian didapatkan varietas kelinci yang tahan terhadap tanah masam (Hutabarat dan Ratma, 1996), (b) pengaruh sinar gamma terhadap toleransi Al pada padi varietas sentani melalui teknik kultur jaringan, dari hasil penelitian didapatkan mutan tahan Al pada perlakuan 10 Gy + 8 ppm Al dan 20 Gy + 14 ppm Al (Hutabarat, 1991), (c) induksi keragaman somaklon ke arah ketenggangan terhadap keracunan Al pada tanaman jagung, dari hasil penelitian didapatkan terjadinya peningkatan daya ketenggangan tanaman jagung somaklon terhadap keracunan Al sampai taraf 800  $\mu\text{M AlCl}_3$  (Sutjahjo, 1994), dan (d) seleksi varietas padi peka menjadi tahan Al menggunakan keragaman somaklonal, didapatkan tanaman padi genotipe Aiwu yang tahan terhadap Al pada konsentrasi 250 dan 1000  $\mu\text{ML}^{-1}$ ) pada pH 3,85 (Van Sint Jan *et al*, 1997).

Beberapa hasil penelitian penggunaan radiasi pada eksplan kultur jaringan yang menghasilkan keragaman somaklonal adalah pengaruh sinar gamma pada nilam (*Pogostemon cablin* Bent.) (Mariska *et al.*, 1997), pisang ambon kuning (Wardiyati *dkk.*, 2000), *Catharantus roseus* (L.) Don. (Syukur, 2000), padi varietas Sentani (Hutabarat, 1991), dan padi Basmati 370 (Rodrangboon, 1993).



## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca Jurusan Biologi FMIPA UNIMED. Penelitian dimulai bulan Maret 2011 sampai November 2013.

### 3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang akan digunakan berupa 3 macam varietas padi Ladang asal Kepulauan Nias yaitu : nias-1, nias-2, nias-3 dan T 309 (kontrol *in vitro*). Sebagai perbandingan dilapangan digunakan varietas Dupa (tenggang AI dan pH rendah) dan varietas Salun pikit (peka AI dan pH rendah). Bahan kimia yang diperlukan sesuai dengan formula media Murashige & Skoog (1962), bahan kimia untuk membuat media pengujian pada kultur *in vitro*, bahan kimia untuk pengujian pada larutan hara dan bahan kimia untuk pengujian progeni. Zat pengatur tumbuh yang digunakan meliputi : Auksin (IAA, NAA, 2,4-D), sitokinin (BAP, kinetin dan zeatin). Asam amino campuran yaitu casein hydrolysate (CH). Bahan sterilisasi meliputi : deterjen, benlate, alkohol, sunklin dan akuades steril. Bahan untuk tutup botol kultur antara lain aluminium foil, plastik wrap dan karet gelang.

Alat yang akan digunakan sebagian besar berupa alat gelas standar seperti: botol kultur, erlemeyer, petridis, pipet isap, labu ukur, corong, saringan, timbangan analitik, autoklaf, pH meter, kompor listrik, oven, alat diseksi (pisau, pinset dan gunting), kotak pindah (laminar air flow cabinet), lampu spritus dan rak kultur.

Bahan dan alat yang digunakan di rumah kaca adalah : a) untuk aklimatisasi : tanah kebun dan pupuk kompos, polibag kecil ukuran 12 x 12 cm, gelas akua untuk tutup planlet, b) untuk pengujian planlet pada larutan hara seleksi : botol kultur ukuran 500 ml, gabus dan busa tutup botol, aerator, slang kecil dan c) untuk pengujian tanaman pada tanah asam menggunakan tanah podsolik merah kuning (PMK), kapur pertanian (kaptan), pupuk buatan (urea, SP 36, KCl), pot plastik besar, ayakan dan bahan pengendalian hama dan penyakit (Azodrin 1 cc/l dan Dithane M-45 1 g/l).

### 3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode yang sesuai dengan tujuan penelitian yaitu mendapat varietas tanaman padi yang tenggang terhadap Al dan pH melalui keragaman somaklonal yang diinduksi melalui kultur *in vitro* (kultur kalus) dan iradiasi sinar gamma. Untuk mencapai tujuan tersebut berbagai metode digunakan, antara lain :

#### Tahun I :

1. Metode induksi keragaman somaklonal melalui kultur kalus. Kultur kalus menggunakan metode Edi (2004). **Luaran** untuk mendapat *kalus* yang *embriogenik* dengan penampilan yang beragam. **Indikator** pengamatan adalah kalus segar dengan *pertumbuhan cepat, renggang (freabel), bening, warna kuning keputihan, nodul jelas dan adanya spot hijau*. Induksi kalus dilakukan dengan cara pemberian zat pengatur tumbuh yang seimbang pada kultur *in vitro*. Pemakaian zat pengatur tumbuh dari golongan auksin kuat (2,4-D dan NAA) dan sitokinin kuat (BAP dan thidiazuron) mendorong pertumbuhan sel kalus lebih cepat dengan keragaman yang tinggi. Pertumbuhan dan perbanyakkan kalus yang cepat diharapkan adanya penyimpangan pembelahan mitosis, sehingga sel yang satu berlainan dengan sel yang lain dan memunculkan keragaman baru.
2. Iradiasi sinar gamma dilakukan untuk meningkat keragaman sudah ada pada sel-sel kalus (Edi, 2004). **Luaran** adalah *kalus hidup* setelah iradiasi. **Indikator** yang diamati setelah 1 minggu adalah : *kalus segar, mengkilat, tidak hancur* bila diraba pakai pingset.
3. Pengujian kalus pada tingkat *in vitro* menggunakan metode Van Sint Jan *et al.* (1997). **Luaran** mendapat *kalus* yang *tenggang* terhadap Al dan pH rendah setelah *seleksi in vitro*. **Indikator** yang diamati setelah 12 minggu dalam media seleksi adalah adanya *kalus segar dan tumbuh dengan baik*. Pengujian dalam kultur *in vitro* dilakukan dengan menambahkan Al dengan berbagai konsentrasi ke dalam media seleksi pada pH 4.
4. Regenerasi kalus menggunakan metode Herkules dan Edi (2009). Kalus hasil seleksi *in vitro* dipindahkan ke media regenerasi yang menginduksi tunas dan akar. **Luaran** untuk mendapatkan *planlet* (tanaman) padi pada tingkat *in vitro*. **Indikator** yang diamati adalah *planlet (tanaman) padi yang lengkap (tunas dan*

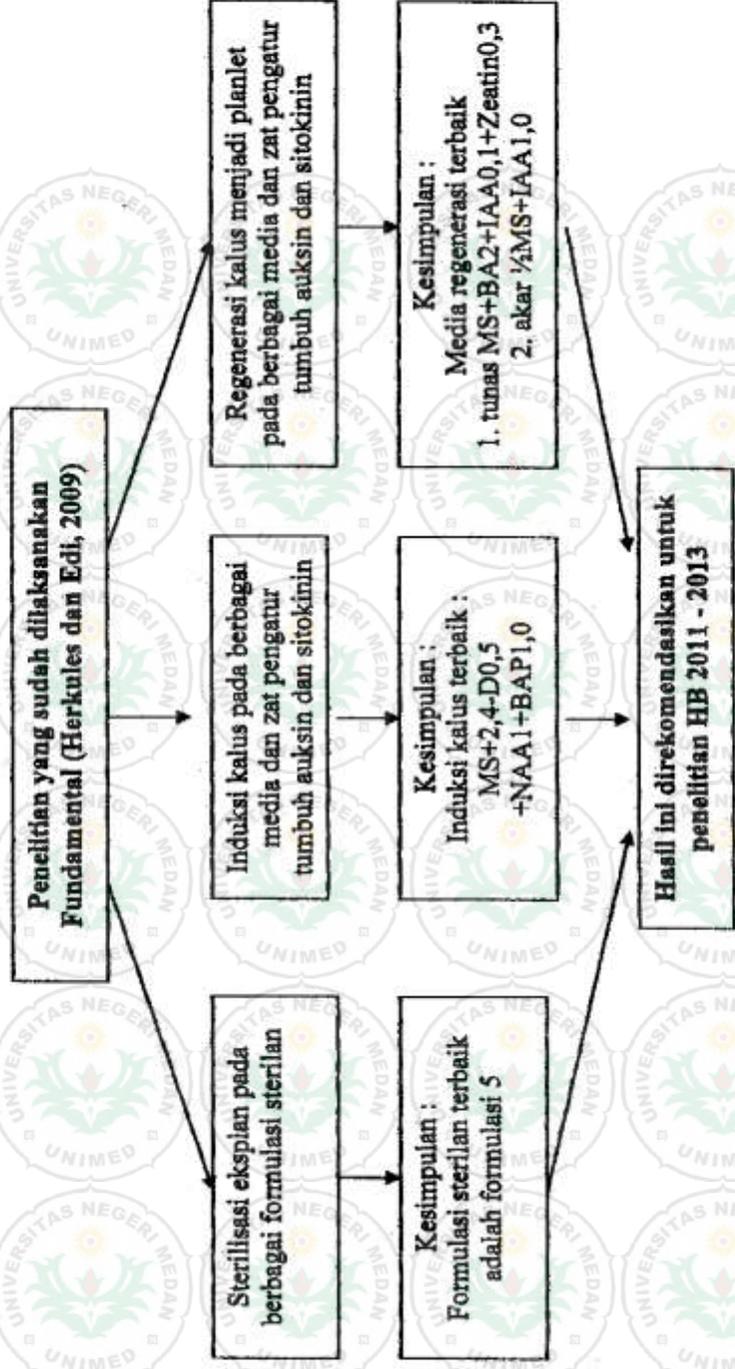
*akar*) dengan berbagai *penampilan* (performance) atau keragaman yang tinggi. Pertama kalus di subkultur ke media yang dapat menginduksi tunas yaitu media yang mengandung sitokinin. Setelah tunas terbentuk, selanjutnya tunas ini dipindahkan ke media yang dapat menginduksi akar. Dalam sistem generasi kalus, yang pertama diinduksi adalah tunas karena kalau akar duluan yang diinduksi maka kalus tersebut sangat sukar untuk bertunas.

#### Tahun II :

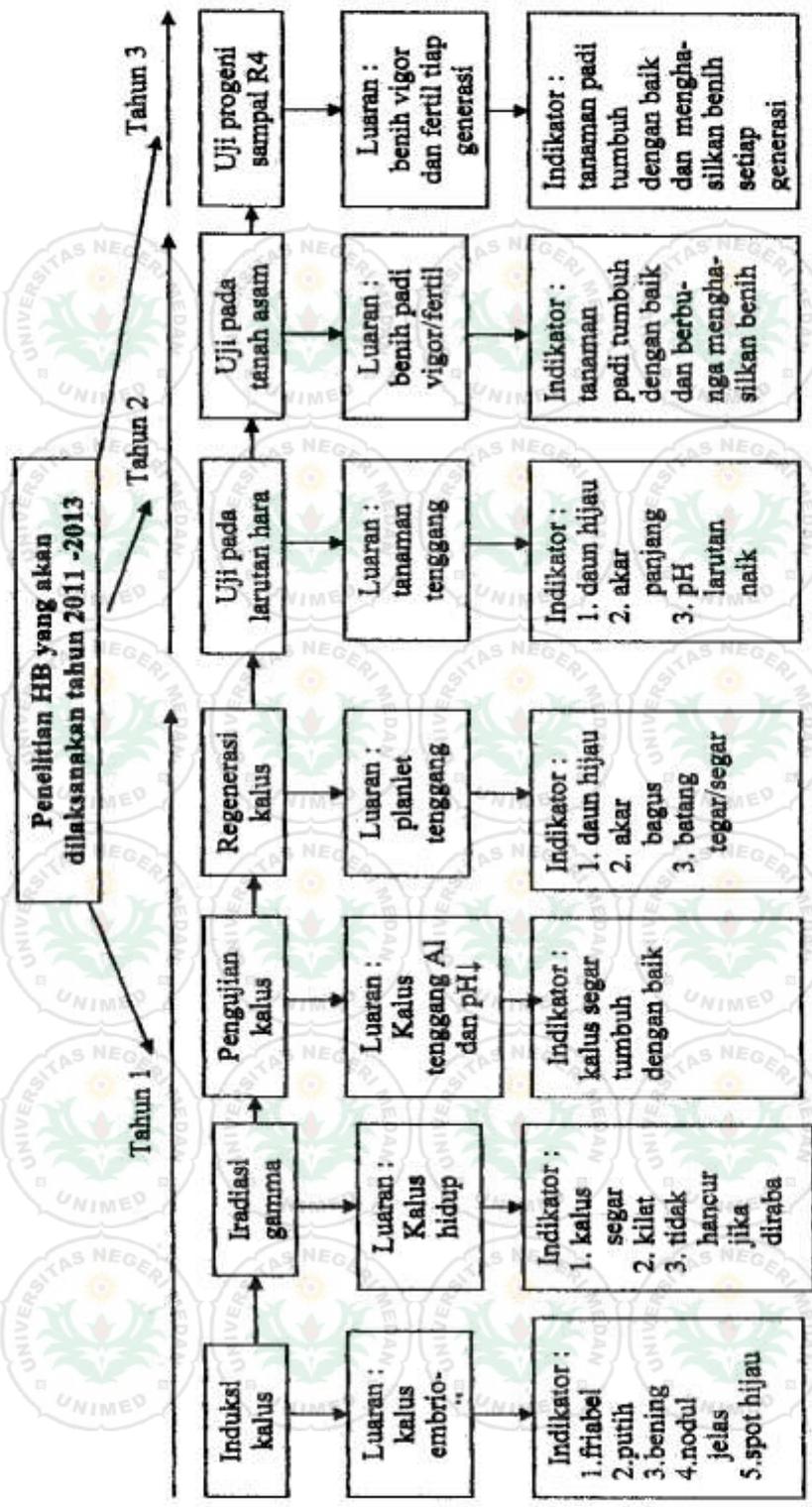
5. Pengujian pada larutan hara menggunakan metode Van Sint Jan *et al.* (1997) untuk unsur makro dan Yoshida *et al.* (1976) untuk unsur mikro. **Luaran** untuk mendapatkan *tanaman padi tenggang Al dan pH rendah* pada larutan hara seleksi selama 12 minggu. **Indikator** yang diamati adalah *tanaman padi yang berwarna hijau, akar bertambah panjang dan pH larutan naik*.
6. Untuk mendapatkan biji (R1) tanaman tenggang dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur dengan kompos (2 : 1) selama 8 minggu.
7. Pengujian pada tanah masam menggunakan metode Sarkarung (1986) dengan cara mencampur tanah podsolik merah kuning dengan kapur pertanian berdasarkan hasil analisis tanah. Kemudian biji padi (R1) hasil seleksi larutan hara ditanam selama 16 minggu. **Luaran** untuk mendapat *tanaman padi* yang dapat *menghasilkan benih*. **Indikatornya** adalah *tanaman padi yang tumbuh baik, berbunga dan menghasilkan benih vigor dan fertil*. Benih padi vigor dan fertil (R2) yang dihasilkan akan digunakan untuk uji selanjutnya.

#### Tahun III :

8. Uji Progeni menggunakan metode Costa *et al.*, (1997). Uji ini dilakukan untuk menstabilkan sifat tenggang Al dan pH rendah yang sudah didapat sampai regenerasi keempat (R4). **Luarannya** menghasilkan benih padi vigor dan fertil tiap generasi *tanaman padi* dengan *sifat tenggang Al dan pH rendah yang stabil*. **Indikatornya** adalah *tanaman padi berwarna hijau* setelah diseleksi dengan Al 1500  $\mu\text{mol}$  dan pH 4 selama 80 hari, selanjutnya menghasilkan *biji yang vigor dan fertil* jika dipindahkan pada tanah masam yang dicampur kompos. Gambar 1 dan 2 memperlihatkan *Bagan Alir* penelitian yang menggambarkan apa yang sudah dilaksanakan dan apa yang akan dikerjakan secara multitahun. Bagan alir penelitian dilengkapi *luaran (output)* dan indikator capaian yang terukur.



**Gambar 1. Bagan Alir Penelitian yang sudah dilaksanakan**



**Gambar 2. Bagan Alir Penelitian yang akan dilaksanakan**

## 1.4. Percobaan

### 3.4.1. Percobaan di Laboratorium (*In vitro*)

Inti dari percobaan di Laboratorium adalah untuk menginduksi keragaman somaklonal melalui kultur kalus, sekaligus mendapat media dan zat pengatur tumbuh terbaik. Dari hasil penelitian fundamental didapat media dan zat pengatur tumbuh terbaik pada media MS+2,4-D0,5 +NAA1+BAP1,0.

### 3.4.2. Iradiasi kalus dengan sinar gamma

Untuk meningkatkan keragaman pada kalus, maka dilakukan iradiasi sinar gamma pada dosis 1,5 krad. Dosis ini digunakan berdasarkan hasil penelitian Edi tahun 2004.

### 3.4.3. Seleksi kalus pada media yang mengandung Aluminium (Al) dan pH 4

Konsentrasi Al yang digunakan : 0, 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm untuk keempat varietas yang digunakan. Terdapat 24 (6 x 4) kombinasi perlakuan dengan ulangan 6 kali (botol kultur) untuk setiap kombinasi perlakuan. Setiap botol kultur berisi 7 buah eksplan (embrio). Menggunakan RAL faktorial. Peubah yang diamati : persentase (jumlah) kalus yang hidup. Kemudian dihitung standar deviasi. Untuk melihat perbedaan rata-rata diuji dengan BNT 5 %.

### 3.4.4. Regenerasi kalus menjadi planlet

#### 3.4.4.1. Regenerasi kalus menjadi tunas

Regenerasi kalus menjadi planlet menggunakan media MS + BA 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l + Zeatin 0.3 mg/l (sesuai dengan hasil penelitian fundamental). Peubah yang diamati : jumlah (%) kalus bertunas dan jumlah tunas per kalus.

#### 3.4.4.2. Induksi akar

Induksi akar menggunakan media  $\frac{1}{2}$ MS + IAA 1,0 mg/l (sesuai dengan hasil penelitian fundamental). Peubah yang diamati : jumlah akar dan panjang akar.

### 3.4.5. Percobaan di Rumah Kaca

#### 3.4.5.1. Aklimatisasi planlet

Aklimatisasi dilakukan untuk mendapatkan tanaman yang tahan terhadap

kondisi luar (alami) yang sangat berbeda dengan kondisi sebelumnya yaitu kondisi *in vitro* (kondisi laboratorium) yang steril. Perlakuannya adalah media tanam menggunakan campuran tanah kebun dan kompos (2 : 1). Peubah yang diamati adalah : jumlah (%) tanaman tenggang (hidup) setelah proses akhir aklimatisasi. Hasil aklimatisasi akan digunakan untuk pengujian pada larutan hara seleksi.

#### 3.4.5.2. Pengujian tanaman pada larutan hara seleksi

Tanaman hasil aklimatisasi diuji menggunakan larutan hara seleksi selama 12 minggu. Konsentrasi Al yang ditambahkan sesuai dengan yang ditambah pada media seleksi. Larutan hara seleksi diperbarui setiap minggu dan optimasi pH 4 (pH awal) dilakukan dengan penambahan 0.1 N NaOH atau 0.1 N HO. Untuk menghindari terjadinya pengendapan pada larutan hara digunakan aerator. Peubah yang diamati adalah pertambahan panjang akar dan perubahan pH larutan.

Pengamatan pertambahan panjang akar dan perubahan pH dilakukan sekali dua hari. Data pertambahan panjang akar dan perubahan pH ditampilkan dalam bentuk grafik.

#### 3.4.5.3. Biji R1

Untuk menghasilkan biji R1, maka tanaman dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur kompos (2 : 1). Biji ini digunakan untuk uji selanjutnya pada tanah masam.

#### 3.4.5.4. Pengujian tanaman pada tanah masam

Tanaman yang tenggang terhadap larutan hara seleksi dipindahkan kedalam pot plastik besar berisi tanah podsolik merah kuning dan untuk kontrol ditambah kapur berdasarkan hasil analisis tanah untuk ditumbuhkan sampai menghasilkan biji R2. Selanjutnya rasio bobot gabah per rumpun (RBGR) dihitung dengan persamaan :

$$RBGR = \frac{\text{Bobot gabah per rumpun pada keadaan tercekam Al}}{\text{Bobot gabah per rumpun pada keadaan tanpa Al}} \times 100 \%$$

Berdasarkan nilai skoring RBGR, tanaman dikelompokkan berdasarkan sifat ketenggangannya terhadap Al mengikuti metode Sarkarung (1986) yang telah dimodifikasi, yaitu skor 0 > 90% (sangat tenggang), 1 = 81 — 90 % (tenggang), 2 = 71 - 80% (agak tenggang), 3 = 61 - 70% (agak peka), 4 = 51 - 60 (peka) dan 5 = < 50% (sangat peka).

### 3.4.5.5. Uji Progeni

Untuk menentukan kestabilan sifat tenggang Al dan pH rendah pada progeni tanaman R1, maka biji R2 didekambahkan pada kertas filter yang dibasahi dengan air tanpa mineral. Planlet yang berumur 10 hari dipindahkan kelarutan hara selektif dengan kandungan Al 1500  $\mu\text{mol}$  selama 80 hari. Menurut Costa *et al.*, 1997 ada tiga kategori tanaman hasil seleksi : (i) Tanaman yang tahan (RPs) menunjukkan warna hijau, (ii) tanaman memperlihatkan nekrosis daun sebagian (HPs), dan (iii) tanaman yang sensitif (SPs) terlihat semuanya nekrosis. Sesudah periode seleksi generasi 1 (R1), hanya RPs yang dipindahkan ke dalam campuran tanah/kompos untuk ditumbuhkan menjadi biji, dan biji yang mempunyai vigor dan fertil RPs yang digunakan untuk uji dua generasi berikut (R3 dan R4) dengan menggunakan prosedur yang sama. Selama uji progeni, pencahayaan dan temperatur dicatat.

## 3.5. Prosedur Penelitian

### 3.5.1. Pembuatan Media Kultur

Dalam penelitian ini digunakan media padat dari Murashige & Skoog (1962) untuk induksi kalus dengan penambahan zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan. Keasaman media (pH) diatur sebesar 5,8 sebelum diautoklaf dengan menambahkan beberapa tetes 0,1 N NaOH atau 0,1 N HCl ke dalam media.

Untuk membuat menjadi padat dengan menambahkan gelrite konsentrasi 0,25 % (2,5 g/l). Media dipanaskan di atas tungku listrik untuk melarutkan agar dan sukrosa. Setelah media mendidih yang berupa larutan jernih, selanjutnya dimasukkan ke dalam botol kultur yang sudah disterilkan sebelumnya sebanyak 25 ml setiap botol. Setelah itu botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121  $^{\circ}\text{C}$  pada tekanan 20 psi.

Proses pembuatan media uji sama dengan proses pembuatan media untuk induksi kalus, yang berbeda adalah komposisi unsur makro dan konsentrasi gelrite. Penambahan gelrite disesuaikan dengan konsentrasi Al yang ditambahkan (makin tinggi konsentrasi Al, gelrite yang ditambahkan semakin banyak). Keasaman media (pH) diatur sebesar 4.0 sebelum diautoklaf.

Pembuatan larutan hara uji digunakan untuk menguji planlet yang tenggang terhadap Al dan pH rendah, komposisi unsur makro sesuai dengan yang dikemukakan Van Sint Jan *et al.* (1997) dan unsur mikro yang dikemukakan Yoshida *et al.* (1976). Konsentrasi Al sesuai dengan media seleksi yaitu 0, 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm, kemasaman larutan hara seleksi (pH) diatur 4.0 dengan penambahan 0.1 N NaOH atau 0.1 N HCl. Larutan hara seleksi diperbarui setiap minggu.

### 3.5.2. Prosedur Percobaan

Induksi kalus, biji-biji yang sudah mengalami pembengkakan segera diisolasi (dibuang endosperm), kemudian embrionya diinokulasi pada media induksi kalus (sesuai perlakuan) masing-masing 8 eksplan per botol kultur. Selanjutnya semua botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam ruang pertumbuhan. Suhu ruang pertumbuhan sudah diatur sekitar  $(26 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  dan diberikan cahaya lampu TL 40 watt selama 16 jam per hari. Setelah satu minggu semua kalus yang terbentuk diperiksa dan skutelum yang tumbuh diujung kalus dipotong dan dibuang. Selanjutnya kalus dikulturkan kembali di dalam media yang sama selama 10 minggu (2 kali sub kultur).

Selanjutnya dilakukan iradiasi sinar gamma dengan dosis 1,5 krad, setelah iradiasi kalus dipindahkan ke media segar tanpa zat pengatur tumbuh (MS0) selama 1 minggu. Kalus yang masih hidup selanjutnya dilakukan pengujian pada media yang mengandung Al dan pH rendah.

Pengujian kalus pada media yang mengandung Al dan pH rendah, kalus yang keadaannya bagus (kalus mengkilap, warna putih kekuningan, kompak artinya tidak hancur bila diraba dengan pinset) akan dipindahkan ke dalam media uji. Kalus dibiarkan tumbuh dan berkembang selama 12 minggu (enam kali subkultur). Pada media seleksi ini sebagian besar kalus akan mati yang ditandai dengan warna kalus yang menghitam, hanya kalus-kalus yang tenggang akan dapat berkembang secara terus-menerus.

Regenerasi kalus akan dilakukan setelah melewati seleksi. Kalus yang masih tumbuh dengan baik (kalus tenggang) ditandai dengan warna kalus kekuning-kuningan. Pertama-tama kalus diinduksi untuk menghasilkan tunas yang ditandai dengan berobahnya warna kalus dari kuning menjadi putih kekuning-kuningan, tahap selanjutnya akan muncul spot-spot hijau yang nantinya akan muncul tunas.

Aluminium akan menghambat pertumbuhan akar, oleh karena itu tunas yang sudah tumbuh dengan baik akan dipindahkan ke media pengakaran guna menginduksi pertumbuhan akar. Planlet yang sudah mempunyai akar banyak dan kuat akan segera diaklimatisasi.

Aklimatisasi dilakukan untuk penyesuaian dengan lingkungan luar yang tidak steril. Sebelum planlet dipindahkan ke lingkungan luar, terlebih dahulu disiapkan media tanam yang terdiri dari campuran tanah kebun dengan kompos (2 : 1), kemudian campuran tanah dan kompos diayak dan dimasukkan ke dalam polibag kecil (12 x 12 cm). Setelah itu permukaan tanah disiram dengan benlate 1 g/L. Planlet yang ada dalam botol kultur dikeluarkan, media kultur yang masih ada pada akar planlet secara perlahan-lahan dicuci pada air mengalir. Selanjutnya planlet ditanam pada pot-pot yang telah disiapkan. Untuk menjaga penguapan yang terlalu besar, planlet ditutupi dengan gelas akua dan paranet yang berwarna hitam selama 10 hari. Setelah 10 hari secara berangsur-angsur tutup gelas dan paranet dibuka sedikit demi sedikit sampai akhirnya tanpa penutup sama sekali. Tanaman yang sudah dapat bertahan diruangan terbuka akan dipindahkan ke larutan hara seleksi (seleksi planlet).

Pengujian planlet pada kultur larutan hara, pembuatan larutan hara seleksi dilakukan dengan cara menimbang dan mencampur bahan kimia makro dan mikro serta melarutkannya dalam akuades. Selanjutnya larutan hara seleksi dimasukkan ke dalam botol kultur besar sebanyak 400 ml. Gabus dan busa digunakan sebagai penyangga tanaman di atas permukaan botol, setiap botol satu tanaman. Suplai oksigen dilakukan dengan menggunakan aerator yang dihubungkan oleh slang kecil ke tiap-tiap botol kultur. Larutan diperbarui setiap minggu, selama 12 minggu. Kemudian tanaman tenggang dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur kompos (2 : 1) selama 8 minggu sampai menghasilkan biji R1.

Pengujian biji R1 pada tanah masam, tanah yang digunakan adalah tanah Podsolik Merah Kuning (PMK). Untuk tanaman kontrol digunakan tanah yang sama tetapi diberi pengapuran setara 1 x  $Al_{44}$ . Media tanam dipersiapkan dalam pot-pot plastik dengan volume 10 kg tanah per pot. Selanjutnya tanaman hasil seleksi kultur larutan hara dipindahkan ke pot-pot plastik untuk ditumbuhkan sampai menghasilkan benih R1 (Gambar 3). Pemupukan dilakukan sehari sebelum tanam dengan dosis 5 g Urea, 4 g SP36 dan 4 g KCl per pot. Penyiraman dilakukan dua hari sekali,

sedangkan pengendalian hama dan penyakit dilakukan secara kontinyu setiap dua minggu atau apabila tanaman menunjukkan gejala serangan.

Untuk menentukan kestabilan sifat tahan Al dan pH rendah pada progeni tanaman RO, maka biji R1 dikecambahkan pada kertas filter yang dibasahi dengan air tanpa mineral. Planlet yang berumur 10 hari dipindahkan ke larutan hara selektif dengan kandungan Al 1500  $\mu\text{mol}$  selama 80 hari. Pemilihan lamanya waktu stres dan konsentrasi Al didasarkan pada studi pendahuluan oleh Costa *et al.* (1997) karena telah menunjukkan bahwa evaluasi melalui nekrosis lebih dapat dipercaya jika pemeliharaan tanaman dalam jangka waktu yang lama (80 hari) dan konsentrasi Al yang tinggi (1500  $\mu\text{mol}$ ). Tanaman ditumbuhkan pada tangki berisi 25 l larutan yang diperbaharui setiap minggu dengan rata-rata 30 tanaman/tangki.

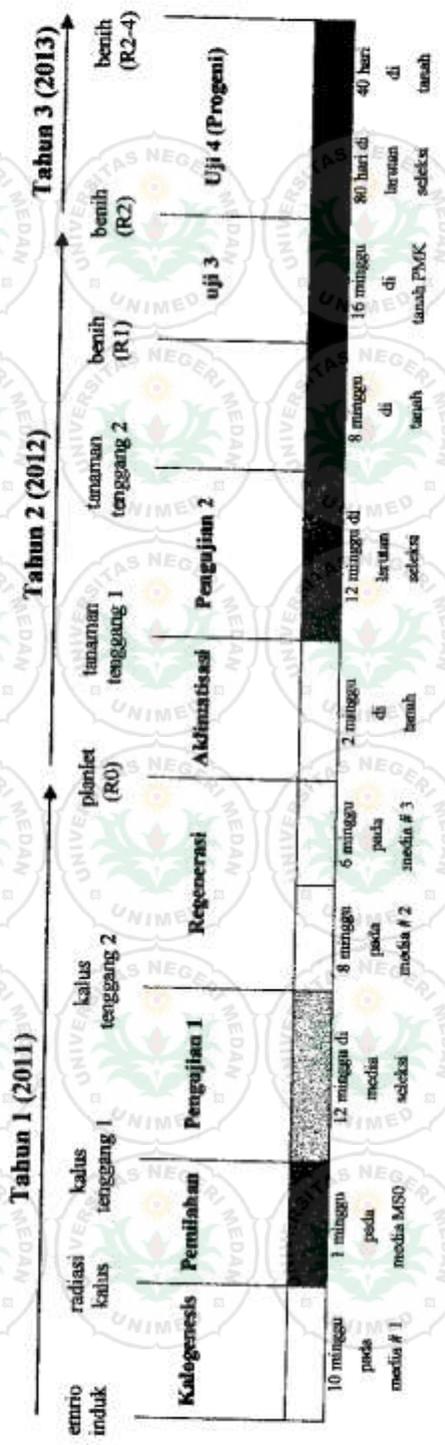
### 3.6. Komposisi Media Kultur dan Larutan

Media # 1 terdiri dari media MS (Murashige & Skoog, 1962) ditambah dengan 100  $\text{mg L}^{-1}$  myoinositol, 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  asam nikotinat, 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  pyridoxin HCl, 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  tiamin HCl, 3 % sukrosa dan 0,25 % gelrite, auksin dan sitokinin (sesuai perlakuan). Media # 2 dan media # 3 merupakan media regenerasi yang terdiri dari media MS ditambah auksin dan sitokinin (sesuai perlakuan).

Komposisi media seleksi adalah sebagai berikut : 2,4  $\text{g L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1,9  $\text{g L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ , 370  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 13  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 28  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; yang lain garam, vitamin, sukrosa dan regulator pertumbuhan seperti pada medium # 1. Perbedaan konsentrasi  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0 - 500 ppm), pH 4,0, gelrite 2,5 - 17  $\text{g L}^{-1}$  yang ditambahkan sebelum diautoklaf.

Larutan hara seleksi digunakan untuk seleksi tanaman berisi : 240,7  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 228,6  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 41,02  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 27,8  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 16,09  $\text{mg L}^{-1}$  KCl, 6,16  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0 dan 45 ppm), pH 4,0 dan mikroelemen Yoshida *et al.* (1976).

# Jadual Penelitian



Gambar 3. Bar chart kegiatan pelaksanaan penelitian

## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil sebagai berikut :

### 4.1. Hasil

#### 4.1.1. Induksi Kalus

Induksi kalus dilakukan untuk meningkat keragaman somaklonal pada kultur *in vitro* dengan menggunakan media MS + 2,4-D 0,5 + NAA 1 + BAP 1,0. Hasil dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-1 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu)

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Diameter Kalus	Penampilan Kalus
1	1	1	1,0	k, tb, ctm, ntj
		2	1,4	pk, b, f, nj
		3	0,9	k, tb, ctm, ntj
		4	0,6	k, tb, c, ntj
		5	-	-
2	2	1	1,3	pk, b, f, nj
		2	1,0	k, tb, ctm, ntj
		3	0,8	k, tb, c, ntj
		4	-	-
		5	1,2	kp, b, f, nj
3	3	1	0,7	k, tb, c, ntj
		2	1,4	pk, b, f, nj
		3	1,0	k, tb, ctm, ntj
		4	1,3	pk, b, f, nj
		5	1,1	kp, b, cym, nj
4	4	1	0,8	k, tb, c, ntj
		2	1,4	pk, b, f, nj
		3	-	-
		4	0,8	k, tb, c, ntj
		5	0,9	k, tb, ctm, ntj
5	5	1	1,1	kp, b, ctm, nj
		2	1,2	kp, b, f, nj
		3	1,0	k, tb, ctm, ntj
		4	0,7	k, tb, c, ntj
		5	1,5	pk, b, f, nj

Keterangan : k = kuning, kp = kuning keputihan, pk = putih kekuningan, b = bening, tb = tidak bening, c = kompak, ctm = kompak tidak merata, f = friable (renggang), nj = nodul jelas, ntj = nodul tidak jelas.

Tabel 4.2. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-2 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu)

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Diameter Kalus	Penampilan Kalus
1	1	1	1,4	
		2	1,2	pk, b, f, nj
		3	-	kp, b, f, nj
		4	0,9	-
		5	0,8	k, tb, ctm, ntj
2	2	1	0,7	k, tb, c, nj
		2	1,0	k, tb, ctm, ntj
		3	1,3	kp, b, f, nj
		4	1,4	pk, b, f, nj
		5	1,2	kp, b, f, nj
3	3	1	-	-
		2	1,3	pk, b, f, nj
		3	1,2	kp, b, f, nj
		4	0,7	k, tb, c, nj
		5	1,0	k, tb, ctm, ntj
4	4	1	1,3	pk, b, f, nj
		2	1,4	pk, b, f, nj
		3	1,2	kp, b, f, nj
		4	-	-
		5	1,0	kp, tb, ctm, ntj
5	5	1	0,9	k, tb, ctm, ntj
		2	1,3	kp, b, f, nj
		3	1,4	kp, b, f, nj
		4	1,2	kp, b, f, nj
		5	0,9	k, tb, ctm, ntj

Keterangan : k = kuning, kp = kuning keputihan, pk = putih kekuningan, b = bening, tb = tidak bening, c = kompak, ctm = kompak tidak merata, f = friable (renggang), nj = nodul jelas, ntj = nodul tidak jelas.



Tabel 4.3. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-3 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu)

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Diameter Kalus	Penampilan Kalus
1	1	1	0,7	k, tb, c, ntj
		2	1,2	pk, b, f, nj
		3	1,2	kp, b, f, nj
		4	0,9	k, tb, ctm, ntj
		5	1,1	kp, b, ctm, nj
2	2	1	1,2	kp, b, f, nj
		2	-	-
		3	1,3	pk, b, f, nj
		4	1,2	kp, b, f, nj
		5	0,5	k, tb, c, ntj
3	3	1	1,0	kp, tb, ctm, ntj
		2	0,9	k, tb, ctm, ntj
		3	-	-
		4	1,2	pk, b, f, nj
		5	1,2	k, b, f, nj
4	4	1	0,9	k, tb, ctm, ntj
		2	1,1	kp, b, ctm, nj
		3	1,2	kp, b, f, nj
		4	-	-
		5	1,3	pk, b, f, nj
5	5	1	1,2	kp, b, f, nj
		2	1,2	kp, b, f, nj
		3	1,2	kp, b, f, nj
		4	-	-
		5	0,9	k, tb, ctm, ntj

Keterangan : k = kuning, kp = kuning keputihan, pk = putih kekuningan, b = bening, tb = tidak bening, c = kompak, ctm = kompak tidak merata, f = friable (renggang), nj = nodul jelas, ntj = nodul tidak jelas

Semua kalus di atas selanjutnya di radiasi dengan sinar gamma dengan tujuan untuk meningkatkan keragaman somaklonal. Setelah radiasi beberapa kalus mati, kemudian seleksi selanjutnya pada media yang mengandung AI dan pH rendah seperti terlihat pada Tabel 4.4 sampai Tabel 4.6.

#### 4.1.2. Radiasi dan Seleksi Kalus

Iradiasi kalus dilakukan pada dosis 1,5 krad dan kalus yang masih hidup setelah iradiasi sinar gamma dipecah menjadi enam bagian, setelah itu kulturkan pada enam konsentrasi media seleksi yaitu Al 0, Al 100, Al 200, Al 300, Al 400, Al 500 ppm.

Tabel 4.4. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-1

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Kalus Setelah Radiasi	Kalus Setelah Media Seleksi
1	1	1	+	+(0, 1, 2, 3, 5)
		2	+	+(0, 1, 2, 3)
		3	+	+(0, 1, 3, 5)
		4	+	+(0, 3, 4)
2	2	1	+	+(0, 1, 2, 3)
		2	+	+(0, 1, 2, 5)
		3	+	+(0, 1, 4)
		5	-	-
3	3	1	+	+(0, 2, 4)
		2	+	+(0, 3, 5)
		3	+	+(0, 1, 4)
		4	+	+(0, 1, 3, 5)
		5	-	-
4	4	2	+	+(0, 1, 2, 3)
		4	+	+(1, 2, 3, 4)
		5	+	+(0, 2, 4, 5)
5	5	1	+	+(0, 2, 3, 4)
		2	+	+(0, 1, 2, 3)
		3	-	-
		4	+	+(0, 2, 4)
		5	+	+(0, 1, 5)

Keterangan : + = kalus hidup, - = kalus mati, + (0, 1, 2, 4, 5) = kalus hidup pada media yang mengandung Al 0, Al 100, Al 200, Al 400 dan Al 500 ppm.

Tabel 4.5. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas mias-2

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Kalus Setelah Radiasi	Kalus Setelah Media Seleksi		
1	1	1	+	+(0, 3, 5)		
		2	+	+(0, 1, 4)		
		4	-	-		
		5	+	+(0, 1, 3, 5)		
		2	2	1	+	+(0, 1, 2, 3)
2	2	2	+	+(0, 1, 2, 4)		
		3	+	+(0, 2, 4, 5)		
		4	-	-		
		5	+	+(0, 2, 3, 4)		
		3	3	2	+	+(0, 1, 2, 3, 5)
3	3	3	+	+(0, 1, 2, 3)		
		4	+	+(0, 1, 3, 5)		
		5	+	+(0, 3, 4)		
		4	4	1	+	+(0, 1, 4)
		2	-	-		
4	4	3	+	+(0, 1, 2, 5)		
		5	+	+(0, 1, 4)		
		5	5	1	+	+(0, 1, 2, 3)
		2	+	+(0, 2, 4)		
		3	+	+(0, 3, 5)		
5	5	4	-	-		
		5	+	+(0, 1, 3, 5)		

Keterangan : + = kalus hidup, - = kalus mati, + (0, 1, 2, 4, 5) = kalus hidup pada media yang mengandung Al 0, Al 100, Al 200, Al 400 dan Al 500 ppm.

Tabel 4.6. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-3

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Kalus Setelah Radiasi	Kalus Setelah Media Seleksi
1	1	1	+	+(0, 2, 4)
		2	+	+(0, 3, 5)
		3	+	+(0, 1, 4)
		4	-	-
		5	+	+(0, 1, 2, 3)
2	2	1	+	+(0, 1, 2, 4)
		3	+	+(0, 1, 3, 5)
		4	+	+(0, 2, 4, 5)
		5	-	-
		1	+	+(0, 1, 2, 3)
3	3	2	+	+(0, 2, 3, 4)
		4	+	+(0, 1, 5)
		5	-	-
		1	+	+(0, 1, 2, 3)
		2	+	+(0, 2, 3, 4)
4	4	3	+	+(0, 1, 5)
		5	+	+(0, 1, 5)
		1	-	-
		2	+	+(0, 1, 2, 4)
		3	+	+(0, 1, 3, 5)
5	5	5	+	+(0, 2, 4, 5)

Keterangan : + = kalus hidup, - = kalus mati, + (0, 1, 2, 4, 5) = kalus hidup pada media yang mengandung Al 0, Al 100, Al 200, Al 400 dan Al 500 ppm.

Dari data di atas terlihat seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah ternyata banyak juga kalus yang tidak tumbuh terutama pada konsentrasi Al 400 dan Al 500. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi Al yang diberikan semakin banyak kalus yang mati. Tetapi kalus-kalus yang tanggang terhadap Al dapat tumbuh pada konsentrasi Al tinggi seperti terlihat pada data di atas karena adanya perbedaan respon yang tinggi terhadap pertumbuhan kalus (keragaman tinggi).

#### 4.1.3. Regenerasi Kalus Membentuk Planlet

Kalus-kalus hasil seleksi (kalus tenggang) selanjut ditumbuhkan pada media regenerasi untuk diinduksi menjadi tunas dan akar. Tabel 4.7 sampai Tabel 4.9 akan memperlihatkan pertumbuhan sampai muncul tunas.

Tabel 4.7. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakkannya pada padi turunan varietas nias-1

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Nomor Regenerasi	Penampakan Kalus
1	1	1	Al 0	Putih dengan spot hijau
			Al 1	Putih kekuningan
			Al 2	<b>Spot hijau, tunas dan akar (1)</b>
			Al 3	Kuning keputihan
		2	Al 5	Kuning
			Al 0	<b>Spot hijau, tunas dan akar (2)</b>
			Al 1	Putih kekuningan
			Al 2	<b>Spot hijau, tunas dan akar (3)</b>
		3	Al 3	Kuning keputihan
			Al 0	Putih dengan spot hijau
			Al 1	Putih kekuningan
			Al 3	Kuning keputihan dan spot hijau
		4	Al 5	<b>Spot hijau, tunas dan akar (4)</b>
			Al 0	Putih dengan spot hijau
			Al 3	Putih kekuningan
			Al 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (5)</b>
2	2	1	Al 0	<b>Spot hijau, tunas dan akar (6)</b>
			Al 1	Putih kekuningan
			Al 2	Putih kekuningan dan spot hijau
			Al 3	Kuning keputihan
		2	Al 0	Putih dengan spot hijau
			Al 1	Putih kekuningan
			Al 2	<b>Spot hijau, tunas dan akar (7)</b>
			Al 5	<b>Spot hijau, tunas dan akar (8)</b>
		3	Al 0	Putih dengan spot hijau
			Al 1	Putih kekuningan
			Al 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (9)</b>
			Al 0	Kuning keputihan
3	3	1	Al 2	Putih kekuningan
			Al 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (10)</b>
			Al 0	Putih dengan spot hijau
			Al 3	Putih kekuningan
		2	Al 5	<b>Spot hijau, tunas dan akar (11)</b>
			Al 0	Putih dengan spot hijau
			Al 3	Putih kekuningan
			Al 5	<b>Spot hijau, tunas dan akar (11)</b>
		3	Al 0	Putih dengan spot hijau
			Al 1	Putih kekuningan

			AI 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (12)</b>
		4	AI 0	Kuning keputihan dan spot hijau
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 3	<b>Spot hijau, tunas dan akar (13)</b>
			AI 5	Kuning keputihan
4	4	2	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 2	<b>Spot hijau, tunas dan akar (14)</b>
			AI 3	<b>Spot hijau, tunas dan akar (15)</b>
		4	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 3	<b>Spot hijau, tunas dan akar (16)</b>
			AI 4	Kuning keputihan
		5	AI 0	Putih kekuningan
			AI 2	Putih kekuningan
			AI 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (17)</b>
			AI 5	Kuning keputihan
5	5	1	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 2	Putih kekuningan
			AI 3	<b>Spot hijau, tunas dan akar (18)</b>
			AI 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (19)</b>
		2	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 2	<b>Spot hijau, tunas dan akar (20)</b>
			AI 3	<b>Spot hijau, tunas dan akar (21)</b>
		4	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 2	Putih kekuningan
			AI 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (22)</b>
		5	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 5	<b>Spot hijau, tunas dan akar (23)</b>
		<b>Total</b>	66	23 kalus bertunas + akar (34,85 %)

Tabel 4.8. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakkannya pada padi turunan varietas nias-2

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Nomor Regenerasi	Penampakan Kalus
1	1	1	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 3	<b>Spot hijau, tunas dan akar (1)</b>
			AI 5	Kuning
		2	AI 0	<b>Spot hijau, tunas dan akar (2)</b>
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (3)</b>
		5	AI 0	Putih dengan spot hijau

			AI 1 AI 3 AI 5	Putih kekuningan Kuning keputihan dan spot hijau <b>Spot hijau, tunas dan akar (4)</b>
2	2	1	AI 0 AI 1 AI 2 AI 3	<b>Spot hijau, tunas dan akar (5)</b> Putih kekuningan Putih kekuningan dan spot hijau Kuning keputihan
		2	AI 0 AI 1 AI 2 AI 4	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (6)</b> <b>Spot hijau, tunas dan akar (7)</b>
		3	AI 0 AI 2 AI 4 AI 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (8)</b> Putih kekuningan
		5	AI 0 AI 2 AI 3 AI 4	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (9)</b> <b>Spot hijau, tunas dan akar (10)</b>
3	3	2	AI 0 AI 1 AI 2 AI 3 AI 5	Kuning keputihan Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (11)</b> Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (12)</b>
		3	AI 0 AI 1 AI 2 AI 3	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (13)</b> Putih dengan spot hijau
		4	AI 0 AI 1 AI 3 AI 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (14)</b> Putih kekuningan
		5	AI 0 AI 3 AI 4	Kuning keputihan dan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (15)</b>
4	4	1	AI 0 AI 1 AI 4	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (16)</b>
		3	AI 0 AI 1 AI 2 AI 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (17)</b> Kuning keputihan
		5	AI 0 AI 1 AI 4	Putih kekuningan Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (18)</b>
5	5	1	AI 0	Putih dengan spot hijau

			AI 1 AI 2 AI 3	Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (19)</b> <b>Spot hijau, tunas dan akar (20)</b>
		2	AI 0 AI 2 AI 4	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (21)</b>
		3	AI 0 AI 3 AI 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (22)</b>
		5	AI 0 AI 1 AI 3 AI 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan Putih dengan spot hijau <b>Spot hijau, tunas dan akar (23)</b>
		<b>Total</b>	66	23 kalus bertunas + akar (34,85 %)

Tabel 4.9. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-3

No.	Ulangan (Botol)	No. Eksplan	Nomor Regenerasi	Penampakan Kalus
1	1	1	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 2	<b>Spot hijau, tunas dan akar (1)</b>
			AI 4	Kuning keputihan
		2	AI 0	<b>Spot hijau, tunas dan akar (2)</b>
			AI 3	Putih kekuningan
			AI 5	<b>Spot hijau, tunas dan akar (3)</b>
		3	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (4)</b>
		5	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 2	<b>Spot hijau, tunas dan akar (5)</b>
AI 3	Putih dengan spot hijau			
2	2	1	AI 0	<b>Spot hijau, tunas dan akar (6)</b>
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 2	Putih kekuningan dan spot hijau
			AI 4	Kuning keputihan
		3	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 1	Putih kekuningan
			AI 3	<b>Spot hijau, tunas dan akar (7)</b>
			AI 5	<b>Spot hijau, tunas dan akar (8)</b>
		4	AI 0	Putih dengan spot hijau
			AI 2	Putih kekuningan
			AI 4	<b>Spot hijau, tunas dan akar (9)</b>
			AI 5	Putih kekuningan
3	3	1	AI 0	Kuning keputihan

			Al 1 Al 2 Al 3	Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (10)</b> Kuning keputihan
		2	Al 0 Al 2 Al 3 Al 4	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (11)</b> Putih kekuningan
		4	Al 0 Al 1 Al 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (12)</b>
4	4	1	Al 0 Al 1 Al 2 Al 3	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (13)</b> <b>Spot hijau, tunas dan akar (14)</b>
		2	Al 0 Al 2 Al 3 Al 4	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (15)</b> Kuning keputihan
		3	Al 0 Al 1 Al 5	Putih kekuningan Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (16)</b>
		5	Al 0 Al 1 Al 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (17)</b>
5	5	2	Al 0 Al 1 Al 2 Al 4	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (18)</b> <b>Spot hijau, tunas dan akar (19)</b>
		3	Al 0 Al 1 Al 3 Al 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (20)</b> <b>Spot hijau, tunas dan akar (21)</b>
		5	Al 0 Al 2 Al 4 Al 5	Putih dengan spot hijau Putih kekuningan <b>Spot hijau, tunas dan akar (22)</b> Putih kekuningan
Total			62	22 kalus bertunas + akar (35,48 %)

## 4.2. Pembahasan

### 4.2.1. Induksi Kalus

Dari Tabel 4.1, Tabel 4.2 dan Tabel 4.3 memperlihatkan bahwa hampir semua eksplan yang dikulturkan terinduksi menjadi kalus. Persentase eksplan menjadi kalus berbeda untuk setiap varietas, pada varietas nias-1 dan nias-2 88 %, dan varietas nias-2 sebanyak 84%. Angka ini termasuk tinggi jika dibandingkan dengan dengan penelitian-penelitian sebelumnya (Edi, 2004).

Diameter kalus untuk setiap varietas yang digunakan bervariasi. Pada varietas nias-1 diameter kalus berkisar antara 0,6 – 1,5 cm; pada varietas nias-2 diameter kalus berkisar antara 0,7 – 1,4 cm dan varietas nias-3 diameter kalus berkisar antara 0,5 – 1,2 cm. Pertambahan diameter kalus ini ada hubungannya dengan pertumbuhan kalus ke samping dan ke atas serta dipengaruhi oleh struktur kalus tersebut. Kalus dengan struktur friabel (renggang) pertambahan diameter akan lebih cepat dibandingkan dengan kalus yang berstruktur kompak.

Selain dari struktur kalus yang diamati, perubahan warna dari kalus juga diamati (kuning, kuning keputihan, putih kekuningan, bening atau tidak), nodul jelas atau tidak. Ada hubungan antara diameter kalus dengan penampilan kalus, kalus yang berdiameter tinggi mempunyai penampilan yang berbeda dengan kalus yang berdiameter rendah. Pada Tabel 4.1 kalus berdiameter tertinggi berpenampilan putih kekuningan, bening, friabel dan nodul jelas, sedangkan kalus berdiameter terendah berpenampilan kuning, tidak bening, kompak dan nodul tidak jelas. Hal yang sama juga terjadi pada Tabel 4.2 dan Tabel 4.3. Jadi setiap angka dari diameter kalus mempunyai penampilan yang berbeda, artinya dengan melalui kultur kalus penampilannya menjadi beragam.

### 4.2.2. Iradiasi kalus dengan Sinar Gamma dan Seleksi Kalus pada Media yang Mengandung AI dan pH Rendah

Persentase kalus hidup setelah iradiasi semakin turun karena banyak kalus yang mati setelah iradiasi. Persentase kalus hidup setelah iradiasi pada setiap varietas berbeda, varietas nias-1 persentase kalus hidup 85,71%; nias-2 81,81% dan nias-3 80,95%. Setelah kalus diiradiasi, tahap selanjutnya adalah seleksi pada

media yang mengandung Al dan pH rendah. Jumlah kalus yang diseleksi pada setiap varietas berbeda, pada varietas nias-1 dan nias-3 jumlah kalus yang diseleksi 126, sedangkan pada varietas nias-2 sebanyak 132 kalus.

Setelah kalus diseleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah, jumlah kalus yang hidup juga bervariasi. Pada varietas nias-1 jumlah kalus yang hidup sebanyak 66 (52,38%), nias-2 66 (50,00%) dan nias-3 62 (49,21%). Dari Tabel 4.4, Tabel 4.5 dan Tabel 4.6 memperlihatkan semakin tinggi konsentrasi Al yang diberikan semakin banyak kalus yang mati (Edi, 2004).

Distribusi kalus yang hidup setelah di media seleksi untuk setiap varietas berbeda-beda. Untuk varietas nias-1 jumlah kalus yang hidup (tenggang) adalah Al 0 = 17 kalus, Al 100 = 12 kalus, Al 200 = 9 kalus, Al 300 = 11 kalus, Al 400 = 8 kalus dan Al 500 = 7 kalus. Untuk varietas nias-2 jumlah kalus yang hidup (tenggang) adalah Al 0 = 18 kalus, Al 100 = 12 kalus, Al 200 = 9 kalus, Al 300 = 10 kalus, Al 400 = 7 kalus dan Al 500 = 8 kalus. Untuk varietas nias-3 jumlah kalus yang hidup (tenggang) adalah Al 0 = 17 kalus, Al 100 = 11 kalus, Al 200 = 10 kalus, Al 300 = 8 kalus, Al 400 = 8 kalus dan Al 500 = 8 kalus.

Jika dijumlahkan kalus hidup (tenggang) untuk ketiga varietas pada masing-masing konsentrasi Al yang diberikan adalah : Al 0 = 52 kalus, Al 100 = 35 kalus, Al 200 = 30 kalus, Al 300 = 30 kalus, Al 400 = 22 kalus dan Al 500 = 23 kalus. Artinya semakin tinggi konsentrasi Al yang diberikan semakin sedikit kalus yang hidup (tenggang).

#### 4.2.3. Regenerasi Kalus

Akhir dari regenerasi kalus adalah terbentuknya planlet (tunas dan akar) yang tenggang terhadap Al dan pH rendah. Tahap pertama regenerasi kalus adalah menginduksi terbentuk tunas, kemudian induk akar. Jumlah kalus bertunas dan berakar untuk setiap varietas jumlahnya semakin sedikit. Tabel 4.7. memperlihatkan jumlah kalus yang diregenerasikan dari turunan varietas nias-1. Dari 66 kalus yang diregenerasikan, hanya 23 kalus yang menjadi planlet. Begitu juga dengan varietas nias-2 dari 66 kalus yang diregenerasikan hanya 23 kalus yang menjadi planlet. Berikut ini ringkasan jumlah kalus dalam media seleksi Al dan pH rendah,

jumlah kalus yang diregenerasikan dan jumlah kalus bertunas/berakar untuk setiap turunan varietas nias-1, nias-2 dan nias-3.

Tabel 4.10. Jumlah kalus dalam media seleksi AI dan pH rendah, jumlah kalus yang diregenerasikan dan jumlah kalus bertunas/berakar untuk setiap turunan varietas nias-1, nias-2 dan nias-3

Varietas	Jumlah kalus pada media seleksi	Jumlah kalus (%) yang diregenerasikan	Jumlah (%) kalus bertunas + akar
Nias-1	126	66 (52,38)	23 (34,85)
Nias-2	132	66 (50,00)	23 (34,85)
Nias-3	126	62 (49,21)	22 (35,48)
<b>Total</b>	<b>384</b>	<b>194</b>	<b>68 Genotipa</b>

Di bawah ini akan ditunjukkan Gambar mulai induksi kalus sampai terbentuknya tunas dan akar.



A

B



C

D



E

F

Keterangan : A = Proses pembengkan embrio  
 B = Mulai induksi kalus  
 C = Kalus umur 8 minggu (akan diiradiasi)  
 D = Kalus selesai diiradiasi  
 E = Kalus pada media seleksi  
 F = Kalus pada media regenerasi (mulai terbentuk tunas).

## BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Dari data yang didapatkan dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat diambil beberapa kesimpulan :

1. Kultur kalus dan iradiasi sinar gamma dapat meningkatkan keragaman penampilan kalus yang terlihat dari warna kalus (mulai dari warna kuning, kuning keputihan, putih kekuningan, bening atau tidak), struktur kalus (kompak, kompak tidak merata, friable, nodul jelas atau tidak).
2. Kalus dengan penampilan putih kekuningan, bening, friabel dan nodul yang jelas akan memberikan kalus bertunas lebih banyak.
3. Didapat 68 genotipa tanaman padi dari 3 varietas yang digunakan, dengan rincian : 23 genotipa dari turunan varietas nias-1, 23 genotipa dari turunan varietas nias-2 dan 22 genotipa dari turunan varietas nias-3.

### 5.2. Saran

1. Perlu penelitian lanjutan tahun ke dua untuk menstabilkan sifat tenggang yang telah didapat pada tahun pertama (hasil seleksi *in vitro*) yaitu berupa 68 genotipa tanaman padi tenggang AI dan pH rendah yang berasal dari turunan padi varietas nias-1, nias-2 dan nias-3.
2. Pada tahun ke dua akan dilaksanakan seleksi sifat tenggang AI dan pH rendah pada tingkat rumah kaca yaitu seleksi pada larutan hara dan seleksi pada tanah masam.
3. Hasil Tahun kedua akan digunakan untuk tahun ketiga yaitu uji progeni sampai R-4.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ancora, G. And A. Sonuino. 1987. *In Vitro* Induction of potato breeding agriculture and forestry 3, p. 408-424. In Y. P. S. Bajaj (Ed). Springer Verlag. New York.
- Bayliss, M. W. 1980. Chromosomal variation in plant tissue culture. *Int. Rev. Cytol. (Suppl)* 11 A: 113-144.
- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1983. *Plant Tissue Culture, Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. 502p.
- Costa de Macedo, C, J. M. Kinet and V. Van Sint Jan. 1997. Effects of duration and intensity of aluminium stress on growth parameters in 4 rice genotypes differing in Al-sensitivity. *J. Plant Nutr* 20 (1): 181-193.
- D'Amato, F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants, p. 287-295. In T. A. Trope (Ed). *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Calgary Univ. Press.
- Dewan Riset Nasional. 2010. *Agenda Riset Nasional 2010 - 2014*. Kantor Kementerian Negara Riset dan Teknologi. Jakarta. Hal. 9 - 16.
- Edi, S. 2004. Peningkatan Ketanggangan terhadap Aluminium dan pH Rendah pada Tanaman Padi melalui Keragaman Somaklonal dan Iradiasi Sinar Gamma. Disertasi S-3. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 125 halalaman.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1983. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories Exegetics Limited*. England. 709p
- Gunawan, L.W. 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 165p.
- Harjadi, S.S. dan S. Yahya. 1988. *Fisiologi Stres Lingkungan*. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 236p.
- Herkules, S. Edi. 2008. Uji Cepat Beberapa Jenis Padi Ladang Asal Kepulauan Nias terhadap Aluminium dan pH Rendah. *SPP/DPP Unimed*. 25 hal.
- Herkules, S. Edi. 2009. Pengaruh Beberapa Media Dasar dan Zat Pengatur Tumbuh terhadap Pertumbuhan dan Regenerasi Kalus Padi Ladang Asal Kepulauan Nias melalui Kultur *In Vitro*. Laporan Hasil Penelitian Fundamental. 47 hal.

- Hutabarat, D. 1991. Pengaruh sinar gamma terhadap toleransi Al pada padi varietas sentani melalui teknik kultur jaringan. Risalah Pertemuan Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi dalam Bidang Pertanian, Peternakan dan Biologi. Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN Jakarta, hal. 297 - 301
- Hutabarat, D. dan R. Ratma. 1996. Seleksi *in vitro* untuk ketahanan asam dan Al pada tanaman kedelai. Risalah Pertemuan Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi dalam Bidang Pertanian. Peternakan dan Biologi. Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN Jakarta, hal. 37 - 42.
- Ismachin, M. 1988. Pemuliaan Tanaman dengan Mutasi Buatan. Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi. Badan Tenaga Atom Nasional. Jakarta. 28 hal.
- Jacobsen, E. 1987. Genetic diversity in protoplast and cell derived plants potato, p. 347-358. *In* Y. P. S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Potato. Springer-Verlag, Berlin.
- Larkin, PJ. and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60 : 197-214.
- Mariska, I. dan E. Gati. 2003. Pemanfaatan kultur *in vitro* untuk meningkatkan keragaman genetic tanaman nilam. *Jurnal Litbang Pertanian* 22 (2) : 64 -69.
- Mariska, I., Hobir, Mugiono, Gati and Seswita. 1997. Improvement oil content of patchouly through *in vitro* culture and irradiation. *Oil and Industrial Crops Mutation Breeding in Asia*. Suwon, Republic of Korea, p. 21 - 32
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, Harcourt Brace and Company, Publishers. P.605.
- Matsumoto, H. 1991. Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium in plants cells. *Plant Soil Interaction at Low pH* : 825-838.
- Matsumoto, H., Y. Yamamoto and M. Kasai. 1992. Changes of some properties of the plasma membrane enriched, fraction of barley roots related to aluminium stress : Membrane associated ATPase, aluminium and calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38 (3): 411-419.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15 : 473 - 497.
- Radrangboon, P. 1993. Induced mutation in rice (Basmati 370) by gamma rays through tissue culture. Bangkok (Thailand). 67p.

- Raper, C. D. And P. J Kramer. 1987. Stress physiology. In J.R. Wilcox (Ed). Soybeans : Improvement, production and uses. American Society of Agronomy Inc. 16 : 588-631.
- Reisch, O. 1983. Genetic variability in regenerated plants, p. 748-781. In D. A. Dian, W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). Handbook of Plant Cell Culture. McMillan Co. Inc. New York. Vol. 1.
- Richards, K. D., E. J. Scott, Y. K. Sharma, K. R. Davis and R. C. Gardner. 1998. Aluminium induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 116:409-418.
- Salisbury, F. B. And C. W. Ross. 1995. Fisiologi Tumbuhan (jilid 2) Terjemahan oleh D. R. Lukman dan Sumaryono. ITB Bandung. 173p.
- Sarkarung, S. 1986. Screening upland rice for aluminium tolerance and blast disease. In Progress report in upland rice research. p. 271 - 281. IRRI Los Banos, Philippines.
- Soedjono, S. 2003. Aplikasi mutasi induksi dan variasi somaklonal dalam pemuliaan tanaman. Jurnal Litbang Pertanian 22 (2) : 70 - 78.
- Sutjahjo, S. H. 1994. Induksi Keragaman Somaklon ke arah Ketenggangan terhadap Keracunan Aluminium pada Tanaman Jagung. Disertasi S3. Program Studi Agronomi PPs IPB Bogor. 115 halaman.
- Syukur, S. 2000. Efek irradiasi gamma pada pembentukan variasi klon dari *Catharanthus roseus* (L.) Don. Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi, Batan. Jakarta, hal. 33 - 37.
- Taiz, L. And E. Zeiger. 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. 559p.
- Taylor, G. J. 1991. Current views of the aluminium stress response. The physiological basis of tolerance. Current Topics in Plant Biochem. And Physiol. 10 : 57-93.
- Van Sint Jan, V., C.C. de Macedo, J.M. Kinet and J. Bouharmont. 1997. Selection of Al-resistant plants from a sensitive rice cultivar, using somaclonal variation, *in vitro* and hydroponic cultures. Euphytica 97 : 303-310.
- Wardiyati, T., Ramliyanto, Nurfahmi, S. Lamandji dan Mugiono. 2000. Respon kultivar dan macam eksplan tanaman pisang terhadap radiasi sinar gamma dalam induksi mutasi secara *in vitro*. Kongres dan Seminar Nasional II PBPI. 7 - 8 November 2000. Yogyakarta. Hal 48.
- Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cock and K. A. Gomes. 1976. Laboratory manual for physiological studies of Rice (3<sup>rd</sup> Ed). IRRI- Philippines. 83p.

**LAPORAN HASIL PENELITIAN  
HIBAH BERSAING TAHUN 2011**

**PENINGKATAN KERAGAMAN SOMAKLONAL MELALUI  
KULTUR IN VITRO DAN IRADIASI SINAR GAMMA KE  
ARAH KETENGGANGAN TERHADAP ALUMINIUM  
DAN pH RENDAH PADA TANAMAN PADI**

**Tim Peneliti :**

**Ir. Herkules, M.S (Ketua)**

**Dr. Syahmi Edi, M.Si (Anggota)**

**Drs. Lazuardi, M.Si (Anggota)**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Hibah Penugasan Penelitian Hibah Bersaing No. 036/SP2H/PL/Dit.Litabmas/IV/2011 tanggal 14 April 2011

**UNIVERSITAS NEGERI MEDAN  
2011**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Peningkatan Keragaman Somaklonal melalui Kultur *In Vitro* dan Iradiasi Sinar Gamma ke Arah Ketenggangan terhadap Aluminium dan pH Rendah pada Tanaman Padi

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : **Ir. Herkules, M.S**  
b. Jenis Kelamin : Laki-laki  
c. NIP : 19621019 198803 1 004  
d. Jabatan Struktural : -  
e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
f. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi  
g. Pusat Penelitian : Universitas Negeri Medan  
h. Alamat : Jl. Willem Iskandar, Pasar V, Medan  
i. Telepon/Faks : 0616625970/0616613319  
j. Alamat Rumah : Jl. Pandu II Blok F No 30 Perumahan Cendana  
Asri Batang Kuis, Medan  
k. Telepon/Faks/E-mail : 06177109019

3. Jangka Waktu Penelitian : 3 (tiga) Tahun

4. Pembiayaan

- a. Jumlah yang disetujui Dikti tahun ke-1 (2011) : Rp. 35.000.000,-  
b. Jumlah biaya yang diajukan tahun ke-2 (2012) : Rp. 50.000.000,-  
c. Jumlah biaya yang diajukan tahun ke-3 (2013) : Rp. 50.000.000,-  
d. Biaya dari Institusi Lain : Rp. -

Mengetahui,  
Dekan Fakultas MIPA

Medan, 25 Nopember 2011  
Ketua Peneliti,



Prof. Drs. Mottan, M.Sc., PhD.  
NIP. 195908051986011001

Ir. Herkules, M.S  
NIP. 196210191988031004



Direktur Penelitian  
Dr. Ridwan A. M. Sami, M.Si  
NIP. 196406101988031017

## RINGKASAN

Tujuan dari penelitian Hibah Bersaing tahun pertama adalah mendapatkan beberapa genotipe planlet (tanaman) padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro*.

Metode yang digunakan untuk mencapai tujuan tersebut adalah : 1) metode peningkatan keragaman somaklonal melalui kultur kalus iradiasi sinar gamma (Edi, 2004), 2) uji pada kultur *in vitro* menggunakan komposisi media MS yang dimodifikasi (Van Sint Jan *et al.*, 1997).

Kegiatan penelitian tahun pertama meliputi : induksi kalus selama 10 minggu, iradiasi sinar gamma selama 1 minggu, pengujian kalus pada media *in vitro* selama 12 minggu, regenerasi kalus menjadi tunas selama 8 minggu, induksi akar pada kalus yang sudah bertunas 6 minggu.

Hasil penelitian tahun pertama adalah : (1) Kultur kalus dan iradiasi sinar gamma dapat meningkatkan keragaman penampilan kalus yang terlihat dari warna kalus (mulai dari warna kuning, kuning keputihan, putih kekuningan, bening atau tidak), struktur kalus (kompak, kompak tidak merata, friable, nodul jelas atau tidak); (2) kalus dengan penampilan putih kekuningan, bening, friabel dan nodul yang jelas akan memberikan kalus bertunas lebih banyak; dan (3) didapat 68 genotipa tanaman padi dari 3 varietas yang digunakan, dengan rincian : 23 genotipa dari turunan varietas nias-1, 23 genotipa dari turunan varietas nias-2 dan 22 genotipa dari turunan varietas nias-3.

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmatNya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan membuat laporan hasil tahun I (tahun 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan planlet (tanaman) pada ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro*.

Selesainya penelitian ini tidak lepas dari bantuan dan arahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang tulus kepada :

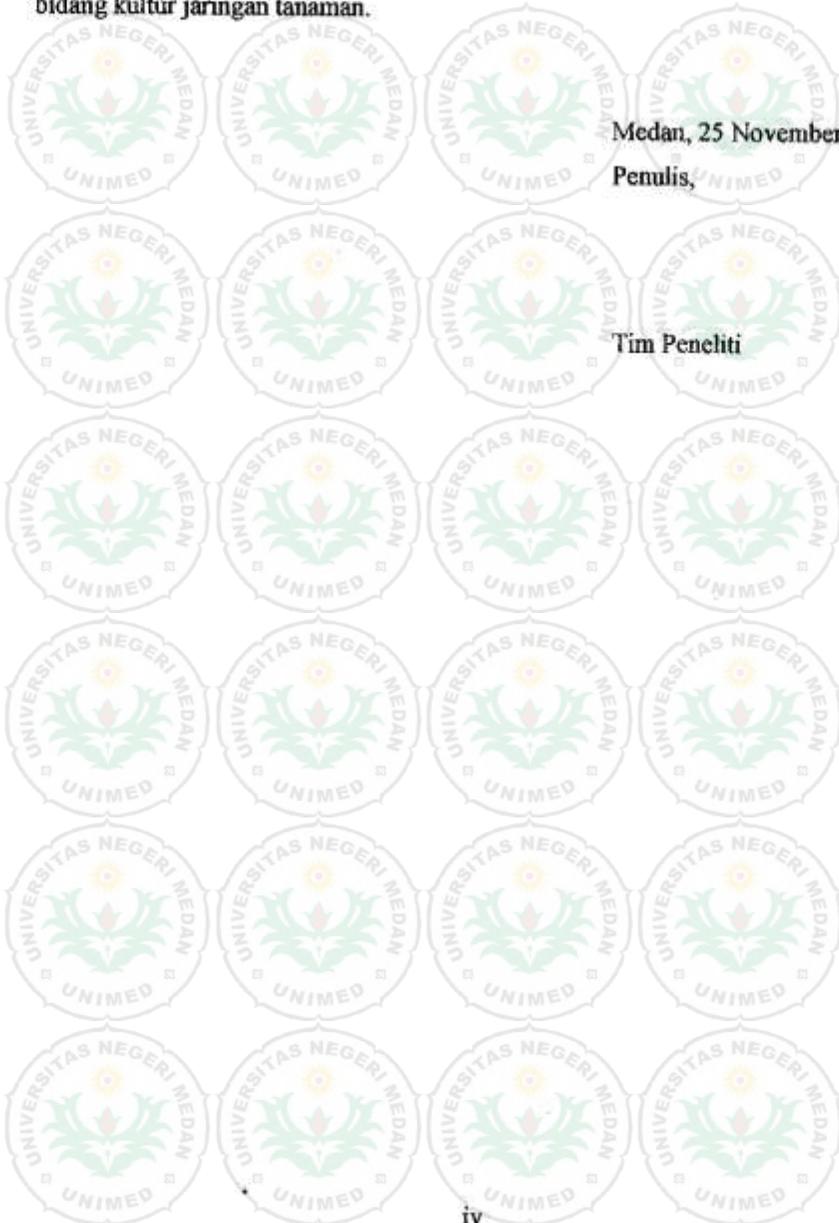
1. Bapak Direktur Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas pendanaan yang telah diberikan, sehingga penelitian ini dapat berjalan sesuai dengan jadual.
2. Bapak Ketua beserta Staf Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan yang telah memproses secara baik, mulai dari pengajuan proposal sampai dengan pengiriman laporan hasil penelitian.
3. Bapak Dekan FMIPA Universitas Negeri Medan yang selalu memotivasi penulis mulai dari pembuatan proposal sampai penulisan laporan hasil penelitian.
4. Bapak Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Medan beserta jajarannya yang telah memberikan sarana dan prasarana penelitian sehingga penelitian ini dapat berjalan sebagaimana mestinya.

Akhirnya kepada semua pihak yang turut membantu dalam penelitian hingga penulisan laporan hasil penelitian tahun I, penulis sampaikan terima kasih. Semoga laporan ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu biologi, khususnya bidang kultur jaringan tanaman.

Medan, 25 November 2011

Penulis,

Tim Peneliti



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN .....	ii
SUMMARY .....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
I. PENDAHULUAN .....	1
II. STUDI PUSTAKA .....	6
III. METODE PENELITIAN .....	15
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	23
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	38
DAFTAR PUSTAKA .....	39
LAMPIRAN .....	42
Artikel Ilmiah .....	45



## DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-1 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	24
4.2. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-2 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	25
4.3. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-3 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	26
4.4. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-1	27
4.5. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-2	28
4.6. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-3	29
4.7. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-1 .....	30
4.8. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-2 .....	31
4.9. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-3 .....	33
4.10. Jumlah kalus dalam media seleksi Al dan pH rendah, jumlah kalus yang diregenerasikan dan jumlah kalus bertunas/berakar untuk setiap turunan varietas nias-1, nias-2 dan nias-3 .....	37

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Indonesia sampai saat masih menghadapi masalah kekurangan persediaan beras nasional. Hal ini disebabkan jumlah penduduk yang terus meningkat serta pengurangan lahan subur karena konversi untuk kepentingan perumahan, industri, perkantoran, dan infrastruktur. Peningkatan produksi padi di masa akan datang dilakukan dengan memanfaatkan lahan sub-optimal yang masih sangat luas di luar Pulau Jawa dan Bali. Salah satu kendala pada lahan sub-optimal adalah kemasaman tanah (keracunan Al dan pH rendah). Solusinya adalah pengembangan varietas padi unggul adaptif terhadap lahan sub-optimal melalui pemuliaan dan penerapan bioteknologi, hal ini sesuai dengan Agenda Riset Nasional 2010 – 2014. Target capaian 2014 adalah rekombinasi jenis dan varietas tanaman pangan pokok serta benih tanaman tenggang lahan masam (Dewan Riset Nasional, 2010).

Cara yang dilakukan untuk mencapai target di atas melalui pemuliaan dan penerapan bioteknologi pada kultur *in vitro* dan iradiasi sinar gamma. Kultur *in vitro* dilakukan dengan cara menginduksi kalus sehingga keragaman sel-sel somatik meningkat. Selanjutnya untuk lebih meningkat keragaman pada sel-sel kalus dilakukan dengan cara iradiasi sinar gamma. Terbukti bahwa kultur kalus dan iradiasi sinar gamma dapat meningkatkan keragaman somaklonal (Edi, 2004). Keragaman yang tinggi memudahkan pengujian terhadap Al dan pH rendah.

Hal lain yang tidak kalah pentingnya adalah eksplan yang merupakan sumber kehidupan dalam proses perakitan. Setelah dilakukan observasi di Sumatera Utara, maka dipilih Kepulauan Nias sebagai sumber eksplan karena : 1) jenis padi ladang yang biasa ditanam oleh penduduk disana lebih banyak, 2) produksinya tinggi, 3) tahan hama dan penyakit, 4) morfologinya spesifik/khas dan berpotensi dikembangkan di daerah lain di Sumatera Utara, dan 5) uji cepat (percobaan pendahuluan) di Laboratorium untuk mengetahui kepekaan terhadap Al dan pH rendah, hasilnya adalah beberapa jenis padi ladang peka asal Kepulauan Nias (Herkules dan Edi, 2008). Jenis padi peka inilah yang digunakan sebagai sumber eksplan pada penelitian Hibah Bersaing tahun 2011 – 2013, yang mana sebelumnya telah dilakukan Penelitian Fundamental untuk mengetahui media dan zat pengatur tumbuh terbaik dalam menginduksi dan meregenerasikan kalus padi.

## 1.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan :

1. Mendapatkan planlet' (tanaman) padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro* (Tahun I).
2. Memperoleh tanaman padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian larutan hara (Tahun II).
3. Memperoleh benih padi vigor dan fertil yang tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian tanah asam (Tahun II).
4. Mendapatkan benih padi vigor dan fertil tanaman padi pada setiap generasi dari beberapa genotipe tanaman padi yang diuji sifat tahanannya terhadap keracunan Al dan pH rendah hasil uji progeni sampai generasi keempat (R4) (Tahun III).

## 1.3. Urgensi (Kemtamaan) Penelitian

### 1.3.1. Urgensi Bagi Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Seni

Penelitian ini sangat penting untuk pengembangan ilmu pengetahuan terutama dalam bidang kultur jaringan, antara lain :

1. Menginduksi keragaman somaklonal melalui kultur *in vitro* (kalus). Sudah banyak penelitian yang menyatakan bahwa keragaman somaklonal dapat ditingkatkan melalui kultur *in vitro* (kultur kalus). Kalus merupakan kumpulan sel yang tanpa bentuk (*amorphous*), membelah secara terus menerus tanpa mengalami diferensiasi (dediferensiasi). Kalus secara *in vitro* dapat terbentuk dengan adanya keseimbangan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang diberikan. Auksin kuat (2,4-D dan NAA) dan sitokinin kuat (BAP) dapat meningkatkan pertumbuhan dan pembelahan sel kalus, sehingga diharapkan adanya penyimpangan pembelahan mitosis. Penyimpangan pembelahan mitosis yang begitu cepat, mengakibatkan keragaman sel menjadi meningkat. Selain itu pemberian 2,4-D dapat menghalangi terbentuk benang-benang spindel sehingga pada waktu pembelahan intinya tidak memisah (double nucleus).
2. Langkah selanjutnya adalah menyeleksi sel ke dalam media yang mengandung Al (pH rendah). Sel-sel yang mampu bertahan selama seleksi berarti sel tersebut tahan terhadap bahan penyeleksi (Al dan pH rendah).
3. Selanjutnya meregenerasikan kalus hasil seleksi *in vitro* dan iradiasi sinar gamma menjadi planlet dengan memodifikasi media dasar dan zat pengatur tumbuh

sehingga didapatkan planlet yang beragam. Keberhasilan tahap ini akan menentukan tahap-tahap selanjutnya karena disamping mendapatkan planlet (tanaman) beragam, juga sekaligus memperbaiki metode dan mempersingkat waktu seleksi.

4. Perbaikan dan pengembangan metode pemuliaan tanaman dan penerapan bioteknologi dengan berbagai modifikasi atau rekayasa sehingga mempermudah untuk mendapatkan varietas/jenis tanaman unggul

### 1.3.2. Manfaat bagi Pembangunan dan Institusi

Penelitian ini disesuaikan dengan Agenda Riset Nasional tahun 2010 – 2014 sehingga memberikan manfaat besar bagi Pembangunan dan Institusi. Hal ini akan tercermin dari luaran (*out put*) penelitian itu sendiri. Berikut ini uraian manfaat bagi pembangunan dan institusi.

#### 1.3.2.1. Manfaat bagi Pembangunan

Ketahanan pangan merupakan Agenda Riset Nasional tahun 2010 – 2014, hal ini sesuai dengan prioritas pembangunan Kabinet Indonesia Bersatu – II, maka pembangunan diarahkan untuk meningkatkan ketahanan pangan dan melanjutkan revitalisasi pertanian dalam rangka mewujudkan kemandirian pangan, peningkatan daya saing produk pertanian, peningkatan pendapatan petani, serta kelestarian lingkungan dan sumber daya alam.

Permasalahan dan tantangan yang dihadapi dalam aspek ketersediaan dan produksi pangan, disamping banyak dipengaruhi oleh perubahan cepat pada lingkungan global dan perubahan iklim, secara umum terjadi akibat adanya dua kecenderungan utama. Kecenderungan pertama adalah terus bertambahnya kebutuhan pangan seiring dengan laju pertumbuhan penduduk. Kecenderungan kedua adalah semakin menyempitnya lahan pertanian karena tekanan penduduk sehingga terjadi konversi untuk berbagai kepentingan lain.

Upaya meningkatkan produksi pangan dimasa yang akan datang tidak akan menjadi lebih mudah karena lahan subur yang tersedia akan makin berkurang karena konversi untuk kepentingan perumahan, industri, perkantoran, dan infrastruktur. Laju konversi lahan pertanian ke non pertanian di Indonesia diperkirakan mencapai

106.000 hektar selama 5 tahun. Laju konversi tersebut paling pesat terjadi di sekitar kota-kota besar di Pulau Jawa. Solusinya adalah memanfaatkan lahan sub-optimal yang sangat diluar Pulau Jawa (Sumatera, Kalimantan, dan Papua). Lahan sub-optimal mempunyai banyak kendala, salah satu kendalanya adalah lahan masam (pH rendah). Oleh sebab itu pengembangan varietas adaptif untuk lahan sub-optimal perlu dilakukan, penelitian ini akan memberi luaran (*out put*) yaitu mendapatkan beberapa genotipe padi tenggang AI dan pH rendah yang dapat diaplikasikan pada lahan masam.

### 1.3.2.2. Manfaat bagi Institusi

Bagi Institusi sendiri penelitian ini sangat bermanfaat untuk pengembangan diri, antara lain :

1. Pengembangan Laboratorium Kultur Jaringan yang sudah ada sekarang ini sehingga kualitasnya lebih meningkat. Indikator peningkatan kualitas Laboratorium ini ditandai dengan mobilitas kerja yang tinggi. Mobilitas kerja yang tinggi akan dapat dicapai dengan tersedianya bahan-bahan yang akan digunakan serta alat-alat yang akan dipakai. Melalui penelitian ini akan dapat menyediakan bahan dan alat yang tidak bersifat investasi.
2. Menunjang proses belajar dan mengajar bagi mahasiswa yang mengambil mata kuliah kultur jaringan (matakuliah wajib bagi mahasiswa non kependidikan). Matakuliah ini disamping bobot teorinya sebanyak 3 sks, tetapi juga ada praktikumnya 1 sks.
3. Mempercepat penyelesaian masa studi mahasiswa karena dalam penelitian ini akan melibatkan beberapa orang mahasiswa untuk penelitian di Laboratorium dalam rangka penyusunan tugas akhir (skripsi).
4. Mempercepat kenaikan pangkat/jabatan seorang peneliti (dosen) karena penelitian ini akan memberikan kredit point untuk kum B.
5. Menaikkan peringkat Universitas di tingkat nasional berdasarkan banyak proposal penelitian yang diterima di pusat (*track record*).

## BAB II. STUDI PUSTAKA

### 2.1. Pertumbuhan dalam Kultur Jaringan (*In Vitro*)

Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali (Bhojwani dan Razdan, 1983). Pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman secara *in vitro* ditentukan oleh beberapa faktor komplek di antaranya : (1) susunan genetik dari spesies tanaman, (2) nutrisi, (3) faktor-faktor pertumbuhan fisik, (4) beberapa senyawa organik seperti zat pengatur tumbuh, vitamin dan sebagainya.

Gunawan (1992) menyatakan bahwa keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat bergantung pada media yang digunakan. Media kultur jaringan tersusun dari : hara makro dan mikro, vitamin, gula, asam amino dan N organik, persenyawaan komplek alamiah (air kelapa, juice tomat), buffer organik, arang aktif, zat pengatur pertumbuhan dan bahan pematid media.

Pengaruh komposisi media dapat disebabkan oleh keseimbangan komponen yang menyusun media di antaranya zat pengatur tumbuh. Salah satu mekanisme yang mengatur organogenesis adalah taraf relatif auksin (IAA, NAA, dan 2,4-D) dan sitokinin (BAP, zeatin dan thidiazuron) dalam media. Sebagai contoh, pada tembakau dengan nisbah auksin terhadap sitokinin dalam media (IAA/kinetin) tinggi, akan membentuk akar dan apabila sebaliknya akan terbentuk tunas, sedangkan apabila nisbah auksin/sitokinin sama akan terbentuk kalus (Bhojwani dan Razdan, 1983). George dan Sherrington (1983) juga menyatakan bahwa pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* diatur oleh interaksi dan keseimbangan antara suplai zat pengatur tumbuh dalam media dan yang diproduksi secara endogen oleh sel-sel yang dikultur.

Pertumbuhan dimanifestasikan sebagai peningkatan permanen dalam hal ukuran, atau berat. Ukuran tidak hanya kriteria yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan, misalnya pertumbuhan sel dalam kultur suspensi dapat dinilai dengan mengukur bobot segar jaringan yang hidup. Pertumbuhan dari zigot akan menyebabkan terjadinya penambahan volume, bobot, jumlah sel, jumlah

protoplasma dan juga kompleksitas. Pengukuran pertumbuhan dapat dilakukan terhadap faktor-faktor tersebut walaupun yang banyak digunakan adalah pengukuran pertambahan bobot kering (Salisbury dan Ross, 1995; Taiz dan Zeiger, 1991).

## 2.2. Pengaruh Keracunan Al

Kendala utama dalam peningkatan produksi pangan pada lahan kering atau lahan marginal adalah rendahnya ketersediaan hara N, P, K, Ca, Mg dan Mo (Raper dan Kramer, 1987; Marschner, 1995). Pada lahan dengan tingkat kemasaman tinggi, pertumbuhan tanaman dihambat oleh ion-ion logam seperti Al, Fe dan Mn. Namun di antara ion-ion tersebut Al merupakan unsur penting karena merupakan faktor utama dalam penghambatan pertumbuhan dan bersifat racun bagi tanaman. Menurut Marschner (1995) lebih dari 70 % tanah masam tropis mengalami defisiensi Ca dan Mg sehingga memiliki kapasitas fiksasi P yang amat tinggi.

Salah satu penyebab kerusakan pada akar oleh ion polimer Al adalah terbentuknya ikatan antar polimer Al dengan membran plasma akar yang menyebabkan kerusakan pada membran dan kebocoran  $K^+$  dari sel akar (Matsumoto, Yamamoto dan Kasai, 1992).

Efek kerusakan Al pada tanaman diawali dengan gangguan terhadap tudung akar yang mempunyai sinyal dan merupakan detektor gaya gravitasi serta halangan mekanis sehingga pada gilirannya akan mengurangi sekresi musilage sel tudung akar dimana sel tersebut merupakan sumber pengatur endogen pertumbuhan. Pada tingkat molekuler, Al berhubungan dengan DNA sehingga interaksi Al dengan DNA akan mempengaruhi sifat-sifat fisikokimia dan fungsi biologis seperti menghentikan pembelahan sel pada meristem akar, perpanjangan sel, sintesis DNA dan RNA. Hal ini juga didukung oleh hasil penelitian Matsumoto (1991) yang menyatakan bahwa Al menghambat pembelahan sel dengan mengganggu penggandaan DNA.

Pada dinding sel, penghambatan terjadi karena Al menggantikan kedudukan  $Ca^{2+}$  pada lamela tengah.  $Ca^{2+}$  mempunyai peranan penting dalam transpor ion melewati membran plasma sebab Ca merupakan "second messenger" dalam aktivitas  $H^+$  - ATPase dengan bantuan calmodulin. Dalam hal ini dengan digantikannya  $Ca^{2+}$  yang melekat pada calmodulin akan terjadi perubahan aktivitas enzim. Ikatan Al dengan karboksil ( $RCOO^-$ ) membentuk ikatan kuat sehingga sel tidak mampu

membesar. Selain itu Al juga berhubungan dengan membran lipid bilayer pada sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur membran karena  $\text{Ca}^{2+}$  digantikan oleh  $\text{Al}^{3+}$  yang akhirnya mempengaruhi penyerapan hara (Marschner, 1995).

### 2.3. Mekanisme Toleransi Al

Menurut Taylor (1991) dan Marschner (1995) ada dua mekanisme toleransi tanaman terhadap Al yaitu mekanisme eksklusi dan mekanisme toleransi internal. Dalam hal ini mekanisme eksklusi terdiri dari : immobilisasi pada dinding sel, permeabilitas selektif dari membran plasma, meningkatnya pH dalam rizosfir atau apoplas akar, eksudasi ligan kelat, eksudasi fosfat dan effluk Al; sedang mekanisme toleransi internal termasuk kelatifikasi Al oleh asam organik (asam malat) pada sitoplasma, kompartementasi Al dalam vakuola, isoenzim toleran, sintesis protein spesifik pengikat Al yang akan menurunkan serapan Al ataupun peningkatan effluk Al. Pembentukan kompleks Al dengan asam organik merupakan salah satu mekanisme toleransi tanaman terhadap Al. Asam organik berperan dalam eksklusi Al melalui pelepasannya dari akar dan detoksifikasi Al dalam simplas dimana asam organik tersebut dapat mengkelat Al dan mereduksi atau mencegah pengaruh racun Al. Taylor (1991) juga mengemukakan bahwa tanaman yang toleran Al cenderung meningkatkan pH di daerah rizosfir. Perubahan pH pada daerah rizosfir ini berhubungan dengan kemampuan tanaman dalam penyerapan  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$  (Harjadi dan Yahya, 1988). Bila  $\text{NO}_3^-$  lebih banyak diserap maka pH sitosol akan turun sehingga menyebabkan meningkatnya aktivitas enzim malat untuk menstimulir terjadinya dekarboksilasi malat menjadi piruvat. Penyerapan  $\text{NO}_3^-$  yang lebih besar juga menyebabkan terjadinya pelepasan ion hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) atau ion bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) ke arah perakaran sehingga sekaligus juga meningkatkan pH, yang pada gilirannya akan mengurangi kelarutan Al.

Selanjutnya dari studi pada tingkat molekuler yang dilakukan oleh Richards *et al.* (1998) pada bibit *Arabidopsis thaliana* terbukti bahwa ada empat gen yang terekspresi yang sifatnya transien menginduksi peroksidase, glutathione-S-transferase, protein yang mengikat tembaga biru, protein homolog pada retikulum dan enzim oksidoreduktase. Hasil ekspresi gen tersebut menyimpulkan bahwa perlakuan Al pada *Arabidopsis* menginduksi stres oksidatif. Dalam hal ini stres oksidatif merupakan reaksi tanaman terhadap level toksik Al.

#### 2.4. Keragaman Somaklonal

Metode kultur jaringan selain menghasilkan propagula yang bermutu, juga dapat menghasilkan keragaman somaklonal yang dapat dipergunakan dalam pemuliaan tanaman secara *in vitro*. Keragaman somaklonal tanaman didefinisikan sebagai keragaman genetik dari tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan (Larkin dan Scowcroft, 1981).

Keragaman somaklonal yang dihasilkan dari penerapan teknik kultur jaringan dalam budidaya tanaman, merupakan suatu bukti bahwa melalui perbanyakan secara vegetatif terdapat kemungkinan diperoleh individu baru yang tidak seperti induknya. Dua keuntungan dari perubahan kromosom yang diperoleh melalui keragaman somaklonal yaitu : (1) keragaman yang diperoleh kemungkinan tidak akan diperoleh pada *genepool* yang ada, (2) perubahan beberapa sifat yang akan memperbaiki penampilan. Melalui teknik kultur jaringan terdapat dua hal yang berbeda kepentingannya bagi pemuliaan tanaman yaitu mempertahankan kestabilan genotipe dan merangsang keragaman genetik. Kestabilan genotipe dapat dicapai dengan mendorong sesingkat mungkin fase pertumbuhan tak berdiferensiasi (fase kalus, sel bebas), sedangkan keragaman genetik dapat dicapai pada fase tak berdiferensiasi yang relatif panjang. Sejumlah mutan diduga dapat terbentuk pada fase kalus dan sel bebas, dari sini dapat diseleksi turunan yang sangat berguna bagi pemuliaan tanaman. Oleh karena itu dari hasil kultur jaringan dapat diseleksi genotipe yang berguna bagi pemuliaan tanaman seperti sifat-sifat tahan penyakit, toleransi terhadap salinitas dan ion-ion yang meracuni tanaman (seperti Al, Mn, Pb, Fe), kekeringan serta herbisida (Gunawan, 1992).

Pada kultur jaringan keadaan eksplan dan keseimbangan zat pengatur tumbuh dalam media dapat mempengaruhi kestabilan genetik materi kultur (Ancora dan Sonuino, 1987). Menurut D'Amato (1978) dan Bayliss (1980) kultur jaringan merupakan sumber potensial untuk mendapatkan keragaman, yaitu dengan cara mengatur komposisi media, keseimbangan zat pengatur tumbuh, dan lama mengkulturkan. Terdapat tiga cara memperoleh keragaman somaklonal dari eksplan yang telah berhasil dikerjakan yaitu : (1) eksplan yang beregenerasi langsung membentuk tunas dan akar, (2) menginduksi kalus terlebih dahulu kemudian dilanjutkan penanaman sel tunggal, dan (3) kultur protoplasma (Jacobsen, 1987).

Reisch (1983) mengungkapkan bahwa kultur kalus dapat menghasilkan keragaman somaklonal. Keragaman ini dapat ditingkatkan dengan menggunakan mutagen. Mutagen yang digunakan dapat berupa mutagen fisik seperti sinar-x dan sinar gamma, maupun mutagen kimia dapat berupa bahan kimia antara lain etil metan sulfonat (EMS), dietil sulfat (DES) dan nitroso metil urea (NMU) (Ancora dan Sonuino, 1987).

## 2.5. Mutagen

Keragaman somaklonal yang terjadi tidak hanya mengandalkan pada cara spontan, tetapi dapat ditingkatkan dengan cara induksi dari luar dengan menggunakan mutagen fisik maupun kimia, dan mutasi yang diperoleh merupakan mutasi buatan (*induced mutation*) (Ismachin, 1988). Penggunaan mutagen dalam pemuliaan tanaman dimulai tahun 1940an. Di antara peneliti yang telah melakukannya adalah Freisleben dan In Halle dari Jerman. Mereka berhasil mendapatkan mutan barley yang tahan *mildew*. Pada saat yang sama Tolenaar berhasil mendapatkan mutan dari tanaman tembakau yang diradiasi sinar-x di Deli Medan (Ismachin, 1988).

Sinar-x dan sinar gamma (mutagen fisik) adalah gelombang elektro magnetik, dimana protonnya akan mercesap kedalam materi dengan suatu proses dimana sebagian atau seluruh energi proton ditransfer ke energi kinetik suatu elektron. Elektron ini kemudian kehilangan energinya karena berinteraksi dengan atom molekul materi tadi dan melepaskan elektron lain. Beberapa elektron ini dapat menghasilkan energi yang cukup untuk mengionisir partikelnya sendiri. Proses ionisasi ini menghasilkan radikal ion positif dan ion bebas. Dalam sistem biologi elektron tersebut akan terjebak dalam sistem polar, sehingga cukup waktu bagi ion radikal yang lebih dan aktif itu untuk bereaksi dengan molekul lain atau masuk ke dalam susunan jaringan (Ismachin, 1988).

Materi biologi selalu mengandung air yang cukup banyak. Dengan demikian penyerapan sinar pengion dalam materi biologi akan melibatkan proses fisika dan kimia sebagai sumber kerusakan gen (Ismachin, 1988). Bagi para pemulia tanaman perlu diketahui tinggi rendahnya kecepatan dosis atau laju dosis iradiasi. Dosis terserap untuk setiap sinar pengion adalah jumlah energi yang diserap per berat

benda yang disinari. Satuan sinar radiasi adalah Gray (Gy) atau rad.

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg per gr} = 10 \text{ joule per kg}$$

$$1 \text{ Gy} = 100\text{rad} = 0,1 \text{ krad}$$

Kecepatan dosis adalah jumlah dosis terserap persatuan waktu (rad per detik atau Gy per detik). Dosimeter adalah alat pengukur besarnya dosis radiasi. Dosimeter standar yang umum digunakan adalah dosimeter Fricke, tetapi dosimeter ini hanya untuk pengukuran dosis sinar gamma antara 40–400 Gy. Diluar dosis itu dosimeter sudah tidak tepat lagi. Pengukuran dosis diluar selang tersebut dilakukan kalibrasi dengan perhitungan atas laju dosis dan waktu penyinaran (Ismachin, 1988).

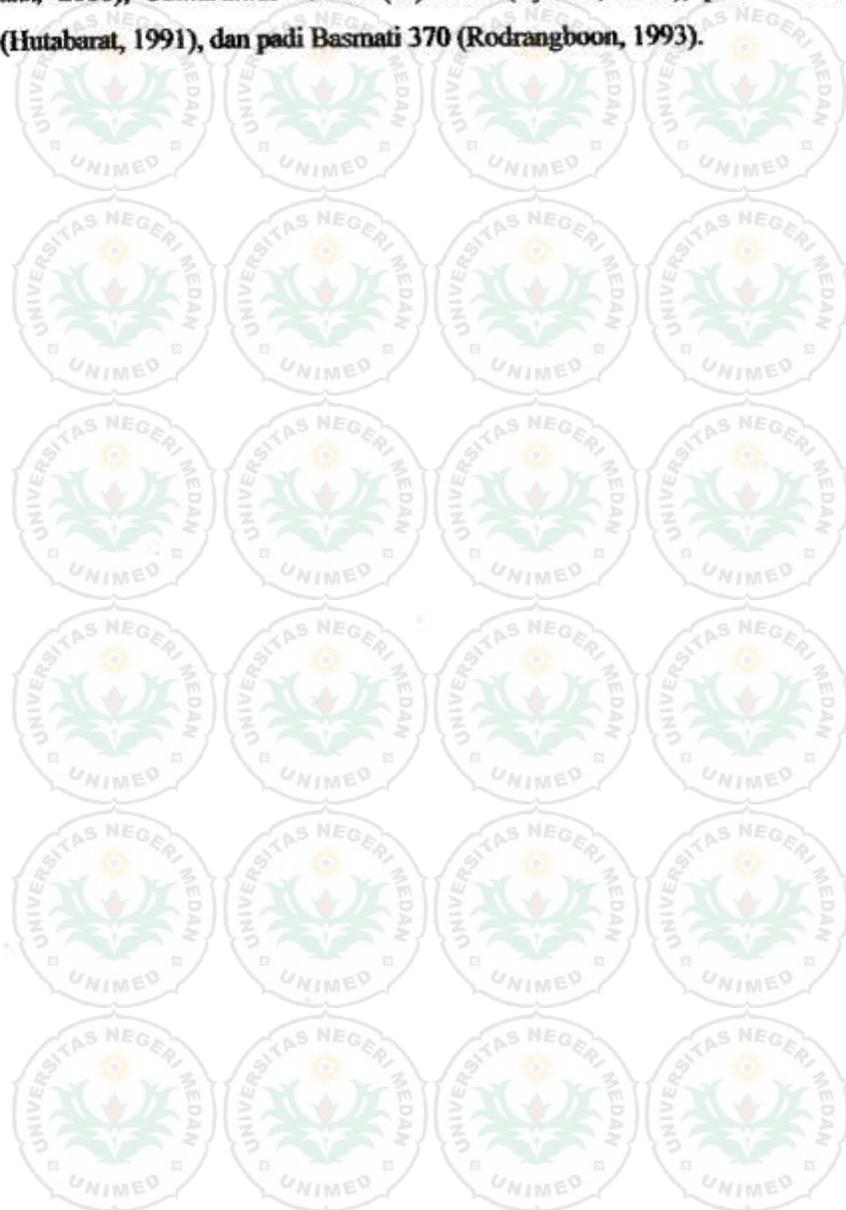
## 2.6. Studi Pendahuluan/Kemajuan yang Telah Dicapai

Studi pendahuluan/kemajuan yang telah dicapai untuk penelitian ini telah banyak dilakukan untuk memberikan gambaran dalam mencapai tujuan jangka panjang dan target khusus yang diinginkan. Berikut ini berbagai penelitian pendahuluan/kemajuan yang telah dicapai.

Penelitian pendahuluan tentang keragaman somaklonal pada padi dapat ditingkatkan melalui kultur kalus dan iradiasi sinar gamma (Edi, 2004), mutasi induksi dengan sinar gamma ( $\text{Co}^{60}$ ) dapat meningkat keragaman somaklonal (Socdjono, 2003), pemanfaatan kultur *in vitro* untuk meningkat keragaman genetik tanaman nilam (Mariskan dan Gati, 20003).

Beberapa penelitian seleksi *in vitro* yang dilakukan untuk mendapatkan ketahanan antara lain : (a) seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap tanah masam dan Al pada tanaman kedelai, dari hasil penelitian didapatkan varietas kelinci yang tahan terhadap tanah masam (Hutabarat dan Ratma, 1996), (b) pengaruh sinar gamma terhadap toleransi Al pada padi varietas sentani melalui teknik kultur jaringan, dari hasil penelitian didapatkan mutan tahan Al pada perlakuan 10 Gy + 8 ppm Al dan 20 Gy + 14 ppm Al (Hutabarat, 1991), (c) induksi keragaman somaklon ke arah ketenggangan terhadap keracunan Al pada tanaman jagung, dari hasil penelitian didapatkan terjadinya peningkatan daya ketenggangan tanaman jagung somaklon terhadap keracunan Al sampai taraf 800  $\mu\text{M AlCl}_3$  (Sutjahjo, 1994), dan (d) seleksi varietas padi peka menjadi tahan Al menggunakan keragaman somaklonal, didapatkan tanaman padi genotipe Aiwu yang tahan terhadap Al pada konsentrasi 250 dan 1000  $\mu\text{ML}^{-1}$ ) pada pH 3,85 (Van Sint Jan *et al*, 1997).

Beberapa hasil penelitian penggunaan radiasi pada eksplan kultur jaringan yang menghasilkan keragaman somaklonal adalah pengaruh sinar gamma pada nilam (*Pogostemon cablin* Bent.) (Mariska *et al.*, 1997), pisang ambon kuning (Wardiyati *dkk.*, 2000), *Catharantus roseus* (L.) Don. (Syukur, 2000), padi varietas Sentani (Hutabarat, 1991), dan padi Basmati 370 (Rodrangboon, 1993).



## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca Jurusan Biologi FMIPA UNIMED. Penelitian dimulai bulan Maret 2011 sampai November 2013.

### 3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang akan digunakan berupa 3 macam varietas padi Ladang asal Kepulauan Nias yaitu : nias-1, nias-2, nias-3 dan T 309 (kontrol *in vitro*). Sebagai pembanding dilapangan digunakan varietas Dupa (tenggang AI dan pH rendah) dan varietas Salum pikit (peka AI dan pH rendah). Bahan kimia yang diperlukan sesuai dengan formula media Murashige & Skoog (1962), bahan kimia untuk membuat media pengujian pada kultur *in vitro*, bahan kimia untuk pengujian pada larutan hara dan bahan kimia untuk pengujian progeni. Zat pengatur tumbuh yang digunakan meliputi : Auksin (IAA, NAA, 2,4-D), sitokinin (BAP, kinetin dan zeatin). Asam amino campuran yaitu casein hydrolisate (CH). Bahan sterilisasi meliputi : deterjen, benlate, alkohol, sunclin dan akuades steril. Bahan untuk tutup botol kultur antara lain aluminium foil, plastik wrap dan karet gelang.

Alat yang akan digunakan sebagian besar berupa alat gelas standar seperti: botol kultur, erlemeyer, petridis, pipet isap, labu ukur, corong, saringan, timbangan analitik, autoklaf, pH meter, kompor listrik, oven, alat diseksi (pisau, pinset dan gunting), kotak pindah (laminar air flow cabinet), lampu spritus dan rak kultur.

Bahan dan alat yang digunakan di rumah kaca adalah : a) untuk aklimatisasi : tanah kebun dan pupuk kompos, polibag kecil ukuran 12 x 12 cm, gelas akua untuk tutup planlet, b) untuk pengujian planlet pada larutan hara seleksi : botol kultur ukuran 500 ml, gabus dan busa tutup botol, aerator, slang kecil dan c) untuk pengujian tanaman pada tanah asam menggunakan tanah podsolik merah kuning (PMK), kapur pertanian (kaptan), pupuk buatan (urea, SP 36, KCl), pot plastik besar, ayakan dan bahan pengendalian hama dan penyakit (Azodrin 1 cc/1 dan Dithane M-45 1 g/1).

### 3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode yang sesuai dengan tujuan penelitian yaitu mendapat varietas tanaman padi yang tenggang terhadap Al dan pH melalui keragaman somaklonal yang diinduksi melalui kultur *in vitro* (kultur kalus) dan iradiasi sinar gamma. Untuk mencapai tujuan tersebut berbagai metode digunakan, antara lain :

#### Tahun I :

1. Metode induksi keragaman somaklonal melalui kultur kalus. Kultur kalus menggunakan metode Edi (2004). **Luaran** untuk mendapat *kalus* yang *embriogenik* dengan penampilan yang beragam. **Indikator** pengamatan adalah kalus segar dengan *pertumbuhan cepat, renggang (freabel), bening, warna kuning keputihan, nodul jelas dan adanya spot hijau*. Induksi kalus dilakukan dengan cara pemberian zat pengatur tumbuh yang seimbang pada kultur *in vitro*. Pemakaian zat pengatur tumbuh dari golongan auksin kuat (2,4-D dan NAA) dan sitokinin kuat (BAP dan thidiazuron) mendorong pertumbuhan sel kalus lebih cepat dengan keragaman yang tinggi. Pertumbuhan dan perbanyakan kalus yang cepat diharapkan adanya penyimpangan pembelahan mitosis, sehingga sel yang satu berlainan dengan sel yang lain dan memunculkan keragaman baru.
2. Iradiasi sinar gamma dilakukan untuk meningkat keragaman sudah ada pada sel-sel kalus (Edi, 2004). **Luaran** adalah *kalus hidup* setelah iradiasi. **Indikator** yang diamati setelah 1 minggu adalah : *kalus segar, mengkilat, tidak hancur* bila diraba pakai pingset.
3. Pengujian kalus pada tingkat *in vitro* menggunakan metode Van Sint Jan *et al.* (1997). **Luaran** mendapat *kalus* yang *tenggang* terhadap Al dan pH rendah setelah *seleksi in vitro*. **Indikator** yang diamati setelah 12 minggu dalam media seleksi adalah adanya *kalus segar dan tumbuh dengan baik*. Pengujian dalam kultur *in vitro* dilakukan dengan menambahkan Al dengan berbagai konsentrasi ke dalam media seleksi pada pH 4.
4. Regenerasi kalus menggunakan metode Herkules dan Edi (2009). Kalus hasil seleksi *in vitro* dipindahkan ke media regenerasi yang menginduksi tunas dan akar. **Luaran** untuk mendapatkan *planlet* (tanaman) padi pada tingkat *in vitro*. **Indikator** yang diamati adalah *planlet (tanaman) padi yang lengkap (tunas dan*

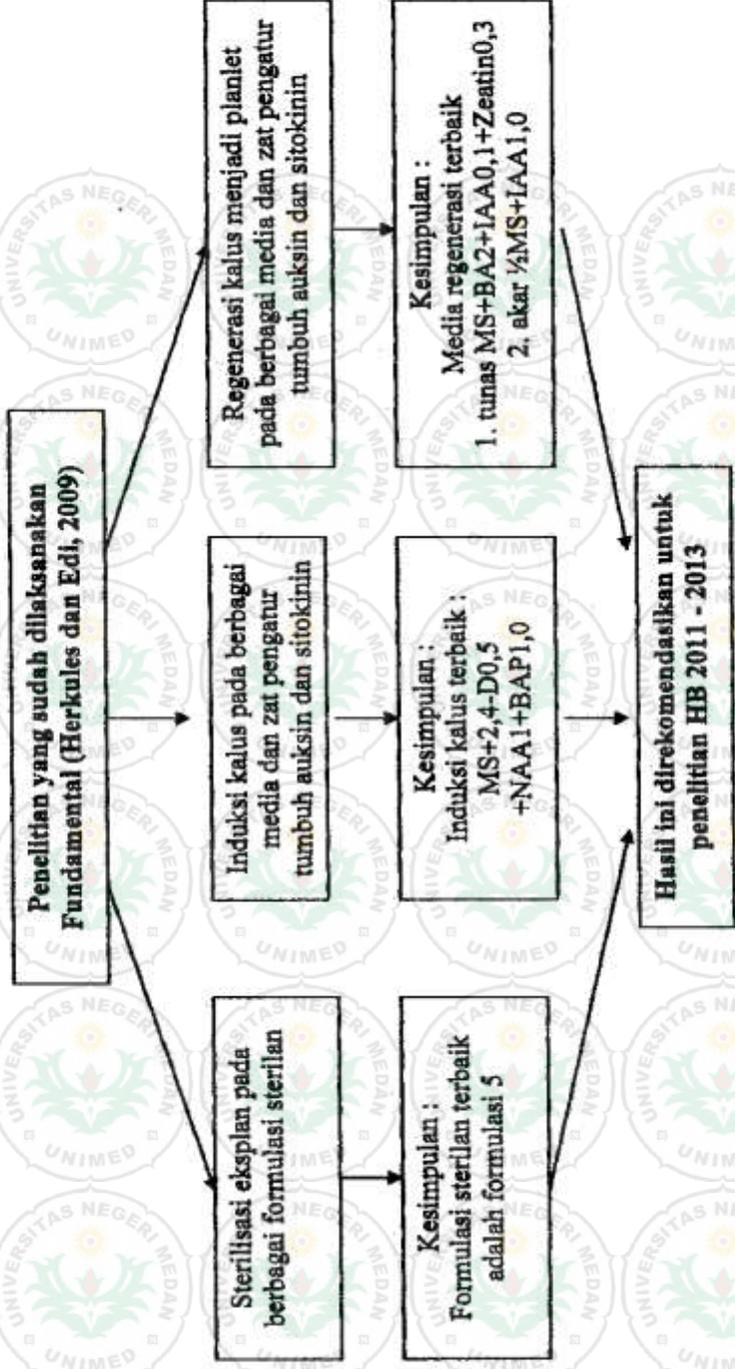
*akar*) dengan berbagai *penampilan* (performance) atau keragaman yang tinggi. Pertama kalus di subkultur ke media yang dapat menginduksi tunas yaitu media yang mengandung sitokinin. Setelah tunas terbentuk, selanjutnya tunas ini dipindahkan ke media yang dapat menginduksi akar. Dalam sistem generasi kalus, yang pertama diinduksi adalah tunas karena kalau akar duluan yang diinduksi maka kalus tersebut sangat sukar untuk bertunas.

#### Tahun II :

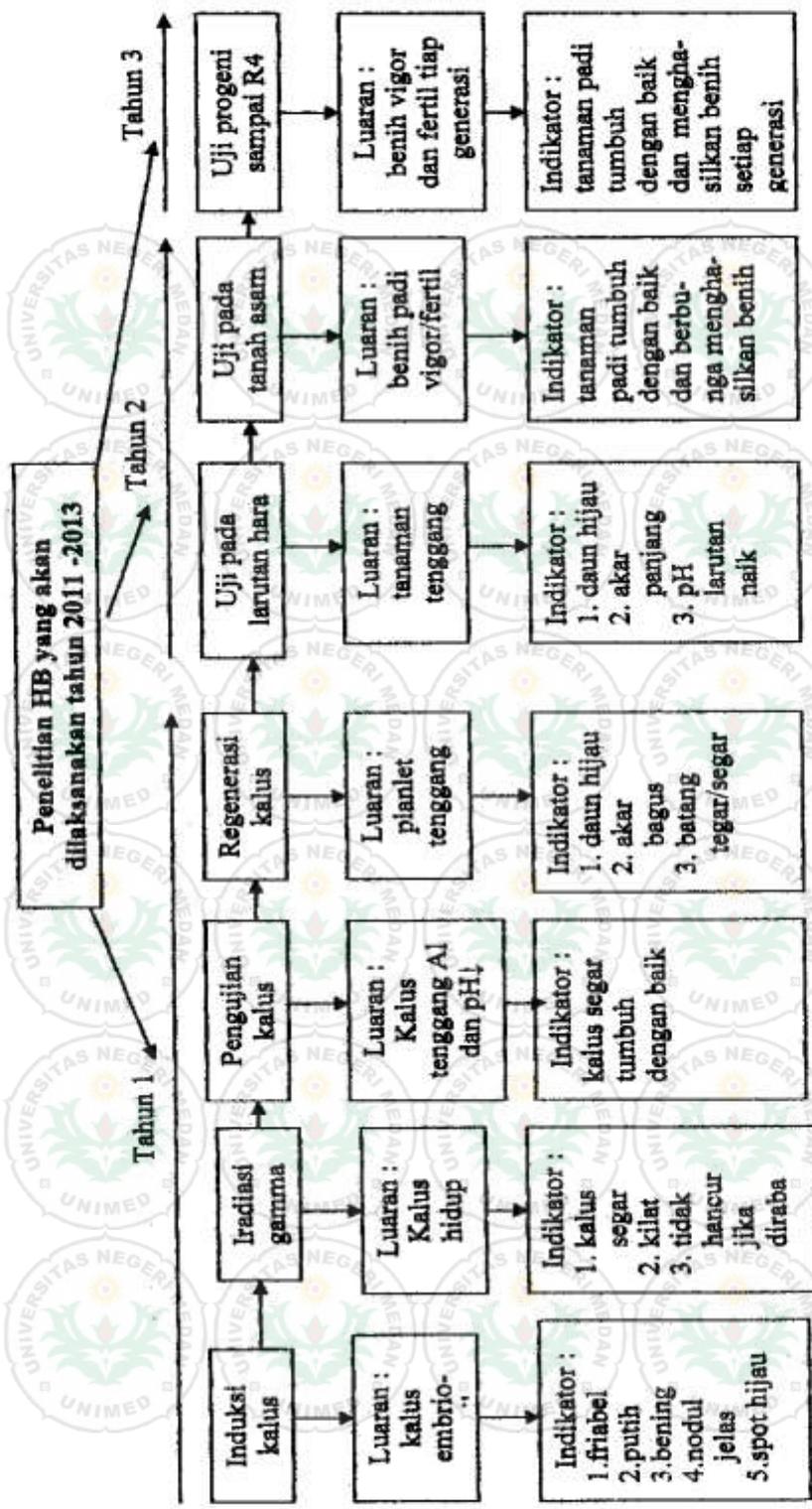
5. Pengujian pada larutan hara menggunakan metode Van Sint Jan *et al.* (1997) untuk unsur makro dan Yoshida *et al.* (1976) untuk unsur mikro. **Luaran** untuk mendapatkan *tanaman padi tenggang Al dan pH rendah* pada larutan hara seleksi selama 12 minggu. **Indikator** yang diamati adalah *tanaman padi yang berwarna hijau, akar bertambah panjang dan pH larutan naik*.
6. Untuk mendapatkan biji (R1) tanaman tenggang dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur dengan kompos (2 : 1) selama 8 minggu.
7. Pengujian pada tanah masam menggunakan metode Sarkarung (1986) dengan cara mencampur tanah podsolik merah kuning dengan kapur pertanian berdasarkan hasil analisis tanah. Kemudian biji padi (R1) hasil seleksi larutan hara ditanam selama 16 minggu. **Luaran** untuk mendapat *tanaman padi yang dapat menghasilkan benih*. **Indikatornya** adalah *tanaman padi yang tumbuh baik, berbunga dan menghasilkan benih vigor dan fertil*. Benih padi vigor dan fertil (R2) yang dihasilkan akan digunakan untuk uji selanjutnya.

#### Tahun III :

8. Uji Progeni menggunakan metode Costa *et al.*, (1997). Uji ini dilakukan untuk menstabilkan sifat tenggang Al dan pH rendah yang sudah didapat sampai regenerasi keempat (R4). **Luarannya** menghasilkan benih padi vigor dan fertil tiap generasi *tanaman padi dengan sifat tenggang Al dan pH rendah yang stabil*. **Indikatornya** adalah *tanaman padi berwarna hijau setelah diseleksi dengan Al 1500  $\mu$ mol dan pH 4 selama 80 hari, selanjutnya menghasilkan biji yang vigor dan fertil* jika dipindahkan pada tanah masam yang dicampur kompos. Gambar 1 dan 2 memperlihatkan *Bagan Alir* penelitian yang menggambarkan apa yang sudah dilaksanakan dan apa yang akan dikerjakan secara multitahun. Bagan alir penelitian dilengkapi *luaran (output)* dan indikator capaian yang terukur.



**Gambar 1. Bagan Alir Penelitian yang sudah dilaksanakan**



**Gambar 2. Bagan Alir Penelitian yang akan dilaksanakan**

## 1.4. Percobaan

### 3.4.1. Percobaan di Laboratorium (*In vitro*)

Inti dari percobaan di Laboratorium adalah untuk menginduksi keragaman somaklonal melalui kultur kalus, sekaligus mendapat media dan zat pengatur tumbuh terbaik. Dari hasil penelitian fundamental didapat media dan zat pengatur tumbuh terbaik pada media MS+2,4-D0,5 +NAA1+BAP1,0.

### 3.4.2. Iradiasi kalus dengan sinar gamma

Untuk meningkatkan keragaman pada kalus, maka dilakukan iradiasi sinar gamma pada dosis 1,5 krad. Dosis ini digunakan berdasarkan hasil penelitian Edi tahun 2004.

### 3.4.3. Seleksi kalus pada media yang mengandung Aluminium (Al) dan pH 4

Konsentrasi Al yang digunakan : 0, 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm untuk keempat varietas yang digunakan. Terdapat 24 (6 x 4) kombinasi perlakuan dengan ulangan 6 kali (botol kultur) untuk setiap kombinasi perlakuan. Setiap botol kultur berisi 7 buah eksplan (cambrio). Menggunakan RAL faktorial. Peubah yang diamati : persentase (jumlah) kalus yang hidup. Kemudian dihitung standar deviasi. Untuk melihat perbedaan rata-rata diuji dengan BNT 5 %.

### 3.4.4. Regenerasi kalus menjadi planlet

#### 3.4.4.1. Regenerasi kalus menjadi tunas

Regenerasi kalus menjadi planlet menggunakan media MS + BA 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l + Zeatin 0.3 mg/l (sesuai dengan hasil penelitian fundamental). Peubah yang diamati : jumlah (%) kalus bertunas dan jumlah tunas per kalus.

#### 3.4.4.2. Induksi akar

Induksi akar menggunakan media  $\frac{1}{2}$ MS + IAA 1,0 mg/l (sesuai dengan hasil penelitian fundamental). Peubah yang diamati : jumlah akar dan panjang akar.

### 3.4.5. Percobaan di Rumah Kaca

#### 3.4.5.1. Aklimatisasi planlet

Aklimatisasi dilakukan untuk mendapatkan tanaman yang tahan terhadap

kondisi luar (alami) yang sangat berbeda dengan kondisi sebelumnya yaitu kondisi *in vitro* (kondisi laboratorium) yang steril. Perlakuannya adalah media tanam menggunakan campuran tanah kebun dan kompos (2 : 1). Peubah yang diamati adalah : jumlah (%) tanaman tenggang (hidup) setelah proses akhir aklimatisasi. Hasil aklimatisasi akan digunakan untuk pengujian pada larutan hara seleksi.

#### 3.4.5.2. Pengujian tanaman pada larutan hara seleksi

Tanaman hasil aklimatisasi diuji menggunakan larutan hara seleksi selama 12 minggu. Konsentrasi Al yang ditambahkan sesuai dengan yang ditambah pada media seleksi. Larutan hara seleksi diperbarui setiap minggu dan optimasi pH 4 (pH awal) dilakukan dengan penambahan 0.1 N NaOH atau 0.1 N HO. Untuk menghindari terjadinya pengendapan pada larutan hara digunakan aerator. Peubah yang diamati adalah pertambahan panjang akar dan perubahan pH larutan.

Pengamatan pertambahan panjang akar dan perubahan pH dilakukan sekali dua hari. Data pertambahan panjang akar dan perubahan pH ditampilkan dalam bentuk grafik.

#### 3.4.5.3. Biji R1

Untuk menghasilkan biji R1, maka tanaman dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur kompos (2 : 1). Biji ini digunakan untuk uji selanjutnya pada tanah masam.

#### 3.4.5.4. Pengujian tanaman pada tanah masam

Tanaman yang tenggang terhadap larutan hara seleksi dipindahkan kedalam pot plastik besar berisi tanah podsolik merah kuning dan untuk kontrol ditambah kapur berdasarkan hasil analisis tanah untuk ditumbuhkan sampai menghasilkan biji R2. Selanjutnya rasio bobot gabah per rumpun (RBGR) dihitung dengan persamaan :

$$RBGR = \frac{\text{Bobot gabah per rumpun pada keadaan tercekam Al}}{\text{Bobot gabah per rumpun pada keadaan tanpa Al}} \times 100 \%$$

Berdasarkan nilai skoring RBGR, tanaman dikelompokkan berdasarkan sifat ketenggangannya terhadap Al mengikuti metode Sarkarung (1986) yang telah dimodifikasi, yaitu skor 0 > 90% (sangat tenggang), 1 = 81 — 90 % (tenggang), 2 = 71 - 80% (agak tenggang), 3 = 61 - 70% (agak peka), 4 = 51 - 60 (peka) dan 5 < 50% (sangat peka).

### 3.4.5.5. Uji Progeni

Untuk menentukan kestabilan sifat tenggang Al dan pH rendah pada progeni tanaman R1, maka biji R2 dikecambahkan pada kertas filter yang dibasahi dengan air tanpa mineral. Planlet yang berumur 10 hari dipindahkan kelarutan hara selektif dengan kandungan Al 1500  $\mu\text{mol}$  selama 80 hari. Menurut Costa *et al.*, 1997 ada tiga kategori tanaman hasil seleksi : (i) Tanaman yang tahan (RPs) menunjukkan warna hijau, (ii) tanaman memperlihatkan nekrosis daun sebagian (HPs), dan (iii) tanaman yang sensitif (SPs) terlihat semuanva nekrosis. Sesudah periode seleksi generasi I (RI), hanya RPs yang dipindahkan ke dalam campuran tanah/kompos untuk ditumbuhkan menjadi biji, dan biji yang mempunyai vigor dan fertil RPs yang digunakan untuk uji dua generasi berikut (R3 dan R4) dengan menggunakan prosedur yang sama. Selama uji progeni, pencahayaan dan temperatur dicatat.

## 3.5. Prosedur Penelitian

### 3.5.1. Pembuatan Media Kultur

Dalam penelitian ini digunakan media padat dari Murashige & Skoog (1962) untuk induksi kalus dengan penambahan zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan. Keasaman media (pH) diatur sebesar 5,8 sebelum diautoklaf dengan menambahkan beberapa tetes 0,1 N NaOH atau 0,1 N HCl ke dalam media.

Untuk membuat menjadi padat dengan menambahkan gelrite konsentrasi 0,25 % (2,5 g/l). Media dipanaskan di atas tungku listrik untuk melarutkan agar dan sukrosa. Setelah media mendidih yang berupa larutan jernih, selanjutnya dimasukkan ke dalam botol kultur yang sudah disterilkan sebelumnya sebanyak 25 ml setiap botol. Setelah itu botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121  $^{\circ}\text{C}$  pada tekanan 20 psi.

Proses pembuatan media uji sama dengan proses pembuatan media untuk induksi kalus, yang berbeda adalah komposisi unsur makro dan konsentrasi gelrite. Penambahan gelrite disesuaikan dengan konsentrasi Al yang ditambahkan (makin tinggi konsentrasi Al, gelrite yang ditambahkan semakin banyak). Keasaman media (pH) diatur sebesar 4.0 sebelum diautoklaf.

Pembuatan larutan hara uji digunakan untuk menguji planlet yang tenggang terhadap Al dan pH rendah, komposisi unsur makro sesuai dengan yang dikemukakan Van Sint Jan *et al.* (1997) dan unsur mikro yang dikemukakan Yoshida *et al.* (1976). Konsentrasi Al sesuai dengan media seleksi yaitu 0, 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm, kemasaman larutan hara seleksi (pH) diatur 4.0 dengan penambahan 0.1 N NaOH atau 0.1 N HCl. Larutan hara seleksi diperbarui setiap minggu.

### 3.5.2. Prosedur Percobaan

Induksi kalus, biji-biji yang sudah mengalami pembengkakan segera diisolasi (dibuang endosperm), kemudian embrionya diinokulasi pada media induksi kalus (sesuai perlakuan) masing-masing 8 eksplan per botol kultur. Selanjutnya semua botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam ruang pertumbuhan. Suhu ruang pertumbuhan sudah diatur sekitar  $(26 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  dan diberikan cahaya lampu TL 40 watt selama 16 jam per hari. Setelah satu minggu semua kalus yang terbentuk diperiksa dan skutelum yang tumbuh diujung kalus dipotong dan dibuang. Selanjutnya kalus dikulturkan kembali di dalam media yang sama selama 10 minggu (2 kali sub kultur).

Selanjutnya dilakukan iradiasi sinar gamma dengan dosis 1,5 krad, setelah iradiasi kalus dipindahkan ke media segar tanpa zat pengatur tumbuh (MS0) selama 1 minggu. Kalus yang masih hidup selanjutnya dilakukan pengujian pada media yang mengandung Al dan pH rendah.

Pengujian kalus pada media yang mengandung Al dan pH rendah, kalus yang keadaannya bagus (kalus mengkilap, warna putih kekuningan, kompak artinya tidak hancur bila diraba dengan pinset) akan dipindahkan ke dalam media uji. Kalus dibiarkan tumbuh dan berkembang selama 12 minggu (enam kali subkultur). Pada media seleksi ini sebagian besar kalus akan mati yang ditandai dengan warna kalus yang menghitam, hanya kalus-kalus yang tenggang akan dapat berkembang secara terus-menerus.

Regenerasi kalus akan dilakukan setelah melewati seleksi. Kalus yang masih tumbuh dengan baik (kalus tenggang) ditandai dengan warna kalus kekuning-kuningan. Pertama-tama kalus diinduksi untuk menghasilkan tunas yang ditandai dengan berubahnya warna kalus dari kuning menjadi putih kekuning-kuningan, tahap selanjutnya akan muncul spot-spot hijau yang nantinya akan muncul tunas.

Aluminium akan menghambat pertumbuhan akar, oleh karena itu tunas yang sudah tumbuh dengan baik akan dipindahkan ke media pengakaran guna menginduksi pertumbuhan akar. Planlet yang sudah mempunyai akar banyak dan kuat akan segera diaklimatisasi.

Aklimatisasi dilakukan untuk penyesuaian dengan lingkungan luar yang tidak steril. Sebelum planlet dipindahkan ke lingkungan luar, terlebih dahulu disiapkan media tanam yang terdiri dari campuran tanah kebun dengan kompos (2 : 1), kemudian campuran tanah dan kompos diayak dan dimasukkan ke dalam polibag kecil (12 x 12 cm). Setelah itu permukaan tanah disiram dengan benlate 1 g/L. Planlet yang ada dalam botol kultur dikeluarkan, media kultur yang masih ada pada akar planlet secara perlahan-lahan dicuci pada air mengalir. Selanjutnya planlet ditanam pada pot-pot yang telah disiapkan. Untuk menjaga penguapan yang terlalu besar, planlet ditutupi dengan gelas akua dan paranet yang berwarna hitam selama 10 hari. Setelah 10 hari secara berangsur-angsur tutup gelas dan paranet dibuka sedikit demi sedikit sampai akhirnya tanpa penutup sama sekali. Tanaman yang sudah dapat bertahan diruangan terbuka akan dipindahkan ke larutan hara seleksi (seleksi planlet).

Pengujian planlet pada kultur larutan hara, pembuatan larutan hara seleksi dilakukan dengan cara menimbang dan mencampur bahan kimia makro dan mikro serta melarutkannya dalam akuades. Selanjutnya larutan hara seleksi dimasukkan ke dalam botol kultur besar sebanyak 400 ml. Gabus dan busa digunakan sebagai penyangga tanaman di atas permukaan botol, setiap botol satu tanaman. Suplai oksigen dilakukan dengan menggunakan aerator yang dihubungkan oleh slang kecil ke tiap-tiap botol kultur. Larutan diperbarui setiap minggu, selama 12 minggu. Kemudian tanaman tenggang dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur kompos (2 : 1) selama 8 minggu sampai menghasilkan biji R1.

Pengujian biji R1 pada tanah masam, tanah yang digunakan adalah tanah Podsolik Merah Kuning (PMK). Untuk tanaman kontrol digunakan tanah yang sama tetapi diberi pengapuran setara 1 x  $Al_{44}$ . Media tanam dipersiapkan dalam pot-pot plastik dengan volume 10 kg tanah per pot. Selanjutnya tanaman hasil seleksi kultur larutan hara dipindahkan ke pot-pot plastik untuk ditumbuhkan sampai menghasilkan benih R1 (Gambar 3). Pemupukan dilakukan sehari sebelum tanam dengan dosis 5 g Urea, 4 g SP36 dan 4 g KCl per pot. Penyiraman dilakukan dua hari sekali,

sedangkan pengendalian hama dan penyakit dilakukan secara kontinyu setiap dua minggu atau apabila tanaman menunjukkan gejala serangan.

Untuk menentukan kestabilan sifat tahan Al dan pH rendah pada progeni tanaman RO, maka biji RI dikecambahkan pada kertas filter yang dibasahi dengan air tanpa mineral. Planlet yang berumur 10 hari dipindahkan ke larutan hara selektif dengan kandungan Al 1500  $\mu\text{mol}$  selama 80 hari. Pemilihan lamanya waktu stres dan konsentrasi Al didasarkan pada studi pendahuluan oleh Costa *et al.* (1997) karena telah menunjukkan bahwa evaluasi melalui nekrosis lebih dapat dipercaya jika pemeliharaan tanaman dalam jangka waktu yang lama (80 hari) dan konsentrasi Al yang tinggi (1500  $\mu\text{mol}$ ). Tanaman ditumbuhkan pada tangki berisi 25 l larutan yang diperbaharui setiap minggu dengan rata-rata 30 tanaman/tangki.

### 3.6. Komposisi Media Kultur dan Larutan

Media # 1 terdiri dari media MS (Murashige & Skoog, 1962) ditambah dengan 100  $\text{mg L}^{-1}$  myoinositol, 0.5  $\text{mg L}^{-1}$  asam nikotinat, 0.5  $\text{mg L}^{-1}$  pyridoxin HCl, 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  tiamin HCl, 3 % sukrosa dan 0.25 % gelrite, auksin dan sitokinin (sesuai perlakuan). Media # 2 dan media # 3 merupakan media regenerasi yang terdiri dari media MS ditambah auksin dan sitokinin (sesuai perlakuan).

Komposisi media seleksi adalah sebagai berikut : 2.4  $\text{g L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.9  $\text{g L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ , 370  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 13  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 28  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; yang lain garam, vitamin, sukrosa dan regulator pertumbuhan seperti pada medium # 1. Perbedaan konsentrasi  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0 - 500 ppm), pH 4.0, gelrite 2.5 - 17  $\text{g L}^{-1}$  yang ditambahkan sebelum diautoklaf.

Larutan hara seleksi digunakan untuk seleksi tanaman berisi : 240.7  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 228.6  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 41.02  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 27.8  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 16.09  $\text{mg L}^{-1}$  KCl, 6.16  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0 dan 45 ppm), pH 4.0 dan mikroelemen Yoshida *et al.* (1976).

23

BIOTEKNOLOGI

## LAPORAN HASIL PENELITIAN HIBAH BERSAING TAHUN 2011

**PENINGKATAN KERAGAMAN SOMAKLONAL MELALUI  
KULTUR IN VITRO DAN IRADIASI SINAR GAMMA KE  
ARAH KETENGGANGAN TERHADAP ALUMINIUM  
DAN pH RENDAH PADA TANAMAN PADI**

**Tim Peneliti :**

**Ir. Herkules, M.S (Ketua)**

**Dr. Syahmi Edi, M.Si (Anggota)**

**Drs. Lazuardi, M.Si (Anggota)**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Hibah Penugasan Penelitian Hibah Bersaing No. 036/SP2H/PL/Dit.Litabmas/IV/2011 tanggal 14 April 2011

**UNIVERSITAS NEGERI MEDAN  
2011**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Peningkatan Keragaman Somaklonal melalui Kultur *In Vitro* dan Iradiasi Sinar Gamma ke Arah Ketenggangan terhadap Aluminium dan pH Rendah pada Tanaman Padi

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : **Ir. Herkules, M.S**  
b. Jenis Kelamin : Laki-laki  
c. NIP : 19621019 198803 1 004  
d. Jabatan Struktural : -  
e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
f. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi  
g. Pusat Penelitian : Universitas Negeri Medan  
h. Alamat : Jl. Willem Iskandar, Pasar V, Medan  
i. Telepon/Faks : 0616625970/0616613319  
j. Alamat Rumah : Jl. Pandu II Blok F No.30 Perumahan Cendana  
Asri Batang Kuis, Medan  
k. Telepon/Faks/E-mail : 06177109019

3. Jangka Waktu Penelitian : 3 (tiga) Tahun

4. Pembiayaan

- a. Jumlah yang disetujui Dikti tahun ke-1 (2011) : Rp. 35.000.000,-  
b. Jumlah biaya yang diajukan tahun ke-2 (2012) : Rp. 50.000.000,-  
c. Jumlah biaya yang diajukan tahun ke-3 (2013) : Rp. 50.000.000,-  
d. Biaya dari Institusi Lain : Rp. -

Mengetahui,  
Rektor Universitas Negeri Medan,  
Fakultas MIPA

Medan, 25 November 2011  
Ketua Peneliti,

Prof. Dr. Mottan, M.Sc., PhD.  
NIP. 195908051986011001

Ir. Herkules, M.S  
NIP. 196210191988031004

Mengetahui,  
Ketua Komisi Nasional Penelitian

Dr. Riwani Ayu. Sani, M.Si  
NIP. 196406101988031017

## RINGKASAN

Tujuan dari penelitian Hibah Bersaing tahun pertama adalah mendapatkan beberapa genotipe planlet (tanaman) padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro*.

Metode yang digunakan untuk mencapai tujuan tersebut adalah : 1) metode peningkatan keragaman somaklonal melalui kultur kalus iradiasi sinar gamma (Edi, 2004), 2) uji pada kultur *in vitro* menggunakan komposisi media MS yang dimodifikasi (Van Sint Jan *et al.*, 1997).

Kegiatan penelitian tahun pertama meliputi : induksi kalus selama 10 minggu, iradiasi sinar gamma selama 1 minggu, pengujian kalus pada media *in vitro* selama 12 minggu, regenerasi kalus menjadi tunas selama 8 minggu, induksi akar pada kalus yang sudah bertunas 6 minggu.

Hasil penelitian tahun pertama adalah : (1) Kultur kalus dan iradiasi sinar gamma dapat meningkatkan keragaman penampilan kalus yang terlihat dari warna kalus (mulai dari warna kuning, kuning keputihan, putih kekuningan, bening atau tidak), struktur kalus (kompak, kompak tidak merata, friable, nodul jelas atau tidak); (2) kalus dengan penampilan putih kekuningan, bening, friabel dan nodul yang jelas akan memberikan kalus bertunas lebih banyak; dan (3) didapat 68 genotipa tanaman padi dari 3 varietas yang digunakan, dengan rincian : 23 genotipa dari turunan varietas nias-1, 23 genotipa dari turunan varietas nias-2 dan 22 genotipa dari turunan varietas nias-3.

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmatNya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan membuat laporan hasil tahun I (tahun 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan planlet (tanaman) pada ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro*.

Selesaiya penelitian ini tidak lepas dari bantuan dan arahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang tulus kepada :

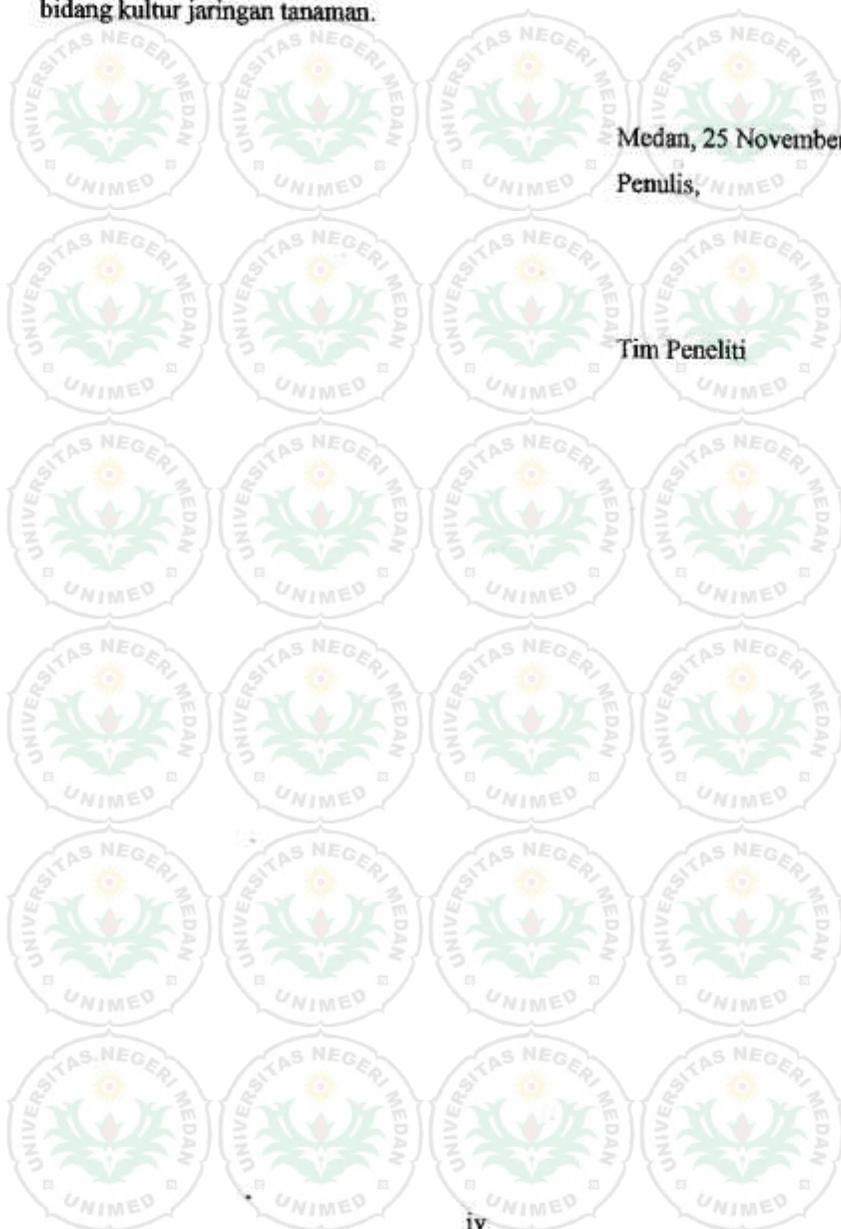
1. Bapak Direktur Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas pendanaan yang telah diberikan, sehingga penelitian ini dapat berjalan sesuai dengan jadual.
2. Bapak Ketua beserta Staf Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan yang telah memproses secara baik, mulai dari pengajuan proposal sampai dengan pengiriman laporan hasil penelitian.
3. Bapak Dekan FMIPA Universitas Negeri Medan yang selalu memotivasi penulis mulai dari pembuatan proposal sampai penulisan laporan hasil penelitian.
4. Bapak Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Medan beserta jajarannya yang telah memberikan sarana dan prasarana penelitian sehingga penelitian ini dapat berjalan sebagaimana mestinya.

Akhirnya kepada semua pihak yang turut membantu dalam penelitian hingga penulisan laporan hasil penelitian tahun I, penulis sampaikan terima kasih. Semoga laporan ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu biologi, khususnya bidang kultur jaringan tanaman.

Medan, 25 November 2011

Penulis,

Tim Peneliti



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN .....	ii
SUMMARY .....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
I. PENDAHULUAN .....	1
II. STUDI PUSTAKA .....	6
III. METODE PENELITIAN .....	15
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	23
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	38
DAFTAR PUSTAKA .....	39
LAMPIRAN .....	42
Artikel Ilmiah .....	45



## DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-1 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	24
4.2. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-2 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	25
4.3. Diameter kalus dan penampilan kalus padi varietas nias-3 pada setiap ulangan (botol) percobaan (umur 10 minggu) .....	26
4.4. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-1	27
4.5. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-2	28
4.6. Beberapa kalus yang hidup setelah radiasi sinar gamma dan seleksi pada media yang mengandung Al dan pH rendah untuk varietas nias-3	29
4.7. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-1 .....	30
4.8. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-2 .....	31
4.9. Nomor-nomor kalus yang diregenerasikan dan penampakannya pada padi turunan varietas nias-3 .....	33
4.10. Jumlah kalus dalam media seleksi Al dan pH rendah, jumlah kalus yang diregenerasikan dan jumlah kalus bertunas/berakar untuk setiap turunan varietas nias-1, nias-2 dan nias-3 .....	37

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Indonesia sampai saat masih menghadapi masalah kekurangan persediaan beras nasional. Hal ini disebabkan jumlah penduduk yang terus meningkat serta pengurangan lahan subur karena konversi untuk kepentingan perumahan, industri, perkantoran, dan infrastruktur. Peningkatan produksi padi di masa akan datang dilakukan dengan memanfaatkan lahan sub-optimal yang masih sangat luas di luar Pulau Jawa dan Bali. Salah satu kendala pada lahan sub-optimal adalah kemasaman tanah (keracunan Al dan pH rendah). Solusinya adalah pengembangan varietas padi unggul adaptif terhadap lahan sub-optimal melalui pemuliaan dan penerapan bioteknologi, hal ini sesuai dengan Agenda Riset Nasional 2010 – 2014. Target capaian 2014 adalah rekombinasi jenis dan varietas tanaman pangan pokok serta benih tanaman tenggang lahan masam (Dewan Riset Nasional, 2010).

Cara yang dilakukan untuk mencapai target di atas melalui pemuliaan dan penerapan bioteknologi pada kultur *in vitro* dan iradiasi sinar gamma. Kultur *in vitro* dilakukan dengan cara menginduksi kalus sehingga keragaman sel-sel somatik meningkat. Selanjutnya untuk lebih meningkat keragaman pada sel-sel kalus dilakukan dengan cara iradiasi sinar gamma. Terbukti bahwa kultur kalus dan iradiasi sinar gamma dapat meningkatkan keragaman somaklonal (Edi, 2004). Keragaman yang tinggi memudahkan pengujian terhadap Al dan pH rendah.

Hal lain yang tidak kalah pentingnya adalah eksplan yang merupakan sumber kehidupan dalam proses perakitan. Setelah dilakukan observasi di Sumatera Utara, maka dipilih Kepulauan Nias sebagai sumber eksplan karena : 1) jenis padi ladang yang biasa ditanam oleh penduduk disana lebih banyak, 2) produksinya tinggi, 3) tahan hama dan penyakit, 4) morfologinya spesifik/khas dan berpotensi dikembangkan di daerah lain di Sumatera Utara, dan 5) uji cepat (percobaan pendahuluan) di Laboratorium untuk mengetahui kepekaan terhadap Al dan pH rendah, hasilnya adalah beberapa jenis padi ladang peka asal Kepulauan Nias (Herkules dan Edi, 2008). Jenis padi peka inilah yang digunakan sebagai sumber eksplan pada penelitian Hibah Bersaing tahun 2011 – 2013, yang mana sebelumnya telah dilakukan Penelitian Fundamental untuk mengetahui media dan zat pengatur tumbuh terbaik dalam menginduksi dan meregenerasikan kalus padi.

## 1.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan :

1. Mendapatkan planlet' (tanaman) padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian kultur *in vitro* (Tahun I).
2. Memperoleh tanaman padi ladang asal Kepulauan Nias tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian larutan hara (Tahun II).
3. Memperoleh benih padi vigor dan fertil yang tenggang terhadap Al dan pH rendah hasil pengujian tanah asam (Tahun II).
4. Mendapatkan benih padi vigor dan fertil tanaman padi pada setiap generasi dari beberapa genotipe tanaman padi yang diuji sifat tahanannya terhadap keracunan Al dan pH rendah hasil uji progeni sampai generasi keempat (R4) (Tahun III).

## 1.3. Urgensi (Kantamaan) Penelitian

### 1.3.1. Urgensi Bagi Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Seni

Penelitian ini sangat penting untuk pengembangan ilmu pengetahuan terutama dalam bidang kultur jaringan, antara lain :

1. Menginduksi keragaman somaklonal melalui kultur *in vitro* (kalus). Sudah banyak penelitian yang menyatakan bahwa keragaman somaklonal dapat ditingkatkan melalui kultur *in vitro* (kultur kalus). Kalus merupakan kumpulan sel yang tanpa bentuk (*amorphous*), membelah secara terus menerus tanpa mengalami diferensiasi (dediferensiasi). Kalus secara *in vitro* dapat terbentuk dengan adanya keseimbangan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang diberikan. Auksin kuat (2,4-D dan NAA) dan sitokinin kuat (BAP) dapat meningkatkan pertumbuhan dan pembelahan sel kalus, sehingga diharapkan adanya penyimpangan pembelahan mitosis. Penyimpangan pembelahan mitosis yang begitu cepat, mengakibatkan keragaman sel menjadi meningkat. Selain itu pemberian 2,4-D dapat menghalangi terbentuk benang-benang spindel sehingga pada waktu pembelahan intinya tidak memisah (*double nucleus*).
2. Langkah selanjutnya adalah menseleksi sel ke dalam media yang mengandung Al (pH rendah). Sel-sel yang mampu bertahan selama seleksi berarti sel tersebut tahan terhadap bahan penyeleksi (Al dan pH rendah).
3. Selanjutnya meregenerasikan kalus hasil seleksi *in vitro* dan iradiasi sinar gamma menjadi planlet dengan memodifikasi media dasar dan zat pengatur tumbuh

sehingga didapatkan planlet yang beragam. Keberhasilan tahap ini akan menentukan tahap-tahap selanjutnya karena disamping mendapatkan planlet (tanaman) beragam, juga sekaligus memperbaiki metode dan mempersingkat waktu seleksi.

4. Perbaikan dan pengembangan metode pemuliaan tanaman dan penerapan bioteknologi dengan berbagai modifikasi atau rekayasa sehingga mempermudah untuk mendapatkan varietas/jenis tanaman unggul

### 1.3.2. Manfaat bagi Pembangunan dan Institusi

Penelitian ini disesuaikan dengan Agenda Riset Nasional tahun 2010 – 2014 sehingga memberikan manfaat besar bagi Pembangunan dan Institusi. Hal ini akan tercermin dari luaran (*out put*) penelitian itu sendiri. Berikut ini uraian manfaat bagi pembangunan dan institusi.

#### 1.3.2.1. Manfaat bagi Pembangunan

Ketahanan pangan merupakan Agenda Riset Nasional tahun 2010 – 2014, hal ini sesuai dengan prioritas pembangunan Kabinet Indonesia Bersatu – II, maka pembangunan diarahkan untuk meningkatkan ketahanan pangan dan melanjutkan revitalisasi pertanian dalam rangka mewujudkan kemandirian pangan, peningkatan daya saing produk pertanian, peningkatan pendapatan petani, serta kelestarian lingkungan dan sumber daya alam.

Permasalahan dan tantangan yang dihadapi dalam aspek ketersediaan dan produksi pangan, disamping banyak dipengaruhi oleh perubahan cepat pada lingkungan global dan perubahan iklim, secara umum terjadi akibat adanya dua kecenderungan utama. Kecenderungan pertama adalah terus bertambahnya kebutuhan pangan seiring dengan laju pertumbuhan penduduk. Kecenderungan kedua adalah semakin menyempitnya lahan pertanian karena tekanan penduduk sehingga terjadi konversi untuk berbagai kepentingan lain.

Upaya meningkatkan produksi pangan dimasa yang akan datang tidak akan menjadi lebih mudah karena lahan subur yang tersedia akan makin berkurang karena konversi untuk kepentingan perumahan, industri, perkantoran, dan infrastruktur. Laju konversi lahan pertanian ke non pertanian di Indonesia diperkirakan mencapai

106.000 hektar selama 5 tahun. Laju konversi tersebut paling pesat terjadi di sekitar kota-kota besar di Pulau Jawa. Solusinya adalah memanfaatkan lahan sub-optimal yang sangat diluar Pulau Jawa (Sumatera, Kalimantan, dan Papua). Lahan sub-optimal mempunyai banyak kendala, salah satu kendalanya adalah lahan masam (pH rendah). Oleh sebab itu pengembangan varietas adaptif untuk lahan sub-optimal perlu dilakukan, penelitian ini akan memberi luaran (*out put*) yaitu mendapatkan beberapa genotipe padi tenggang AI dan pH rendah yang dapat diaplikasikan pada lahan masam.

#### 1.3.2.2. Manfaat bagi Institusi

Bagi Institusi sendiri penelitian ini sangat bermanfaat untuk pengembangan diri, antara lain :

1. Pengembangan Laboratorium Kultur Jaringan yang sudah ada sekarang ini sehingga kualitasnya lebih meningkat. Indikator peningkatan kualitas Laboratorium ini ditandai dengan mobilitas kerja yang tinggi. Mobilitas kerja yang tinggi akan dapat dicapai dengan tersedianya bahan-bahan yang akan digunakan serta alat-alat yang akan dipakai. Melalui penelitian ini akan dapat menyediakan bahan dan alat yang tidak bersifat investasi.
2. Menunjang proses belajar dan mengajar bagi mahasiswa yang mengambil mata kuliah kultur jaringan (matakuliah wajib bagi mahasiswa non kependidikan). Matakuliah ini disamping bobot teorinya sebanyak 3 sks, tetapi juga ada praktiknya 1 sks.
3. Mempercepat penyelesaian masa studi mahasiswa karena dalam penelitian ini akan melibatkan beberapa orang mahasiswa untuk penelitian di Laboratorium dalam rangka penyusunan tugas akhir (skripsi).
4. Mempercepat kenaikan pangkat/jabatan seorang peneliti (dosen) karena penelitian ini akan memberikan kredit point untuk kum B.
5. Menaikkan peringkat Universitas di tingkat nasional berdasarkan banyak proposal penelitian yang diterima di pusat (*track record*).

## BAB II. STUDI PUSTAKA

### 2.1. Pertumbuhan dalam Kultur Jaringan (*In Vitro*)

Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali (Bhojwani dan Razdan, 1983). Pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman secara *in vitro* ditentukan oleh beberapa faktor kompleks di antaranya : (1) susunan genetik dari spesies tanaman, (2) nutrisi, (3) faktor-faktor pertumbuhan fisik, (4) beberapa senyawa organik seperti zat pengatur tumbuh, vitamin dan sebagainya.

Gunawan (1992) menyatakan bahwa keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat bergantung pada media yang digunakan. Media kultur jaringan tersusun dari : hara makro dan mikro, vitamin, gula, asam amino dan N organik, persenyawaan kompleks alamiah (air kelapa, juice tomat), buffer organik, arang aktif, zat pengatur pertumbuhan dan bahan pematid media.

Pengaruh komposisi media dapat disebabkan oleh keseimbangan komponen yang menyusun media di antaranya zat pengatur tumbuh. Salah satu mekanisme yang mengatur organogenesis adalah taraf relatif auksin (IAA, NAA, dan 2,4-D) dan sitokinin (BAP, zeatin dan thidiazuron) dalam media. Sebagai contoh, pada tembakau dengan nisbah auksin terhadap sitokinin dalam media (IAA/kinetin) tinggi, akan membentuk akar dan apabila sebaliknya akan terbentuk tunas, sedangkan apabila nisbah auksin/sitokinin sama akan terbentuk kalus (Bhojwani dan Razdan, 1983). George dan Sherrington (1983) juga menyatakan bahwa pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* diatur oleh interaksi dan keseimbangan antara suplai zat pengatur tumbuh dalam media dan yang diproduksi secara endogen oleh sel-sel yang dikultur.

Pertumbuhan dimanifestasikan sebagai peningkatan permanen dalam hal ukuran, atau berat. Ukuran tidak hanya kriteria yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan, misalnya pertumbuhan sel dalam kultur suspensi dapat dinilai dengan mengukur bobot segar jaringan yang hidup. Pertumbuhan dari zigot akan menyebabkan terjadinya penambahan volume, bobot, jumlah sel, jumlah

protoplasma dan juga kompleksitas. Pengukuran pertumbuhan dapat dilakukan terhadap faktor-faktor tersebut walaupun yang banyak digunakan adalah pengukuran penambahan bobot kering (Salisbury dan Ross, 1995; Taiz dan Zeiger, 1991).

## 2.2. Pengaruh Keracunan Al

Kendala utama dalam peningkatan produksi pangan pada lahan kering atau lahan marginal adalah rendahnya ketersediaan hara N, P, K, Ca, Mg dan Mo (Raper dan Kramer, 1987; Marschner, 1995). Pada lahan dengan tingkat kemasaman tinggi, pertumbuhan tanaman dihambat oleh ion-ion logam seperti Al, Fe dan Mn. Namun di antara ion-ion tersebut Al merupakan unsur penting karena merupakan faktor utama dalam penghambatan pertumbuhan dan bersifat racun bagi tanaman. Menurut Marschner (1995) lebih dari 70 % tanah masam tropis mengalami defisiensi Ca dan Mg sehingga memiliki kapasitas fiksasi P yang amat tinggi.

Salah satu penyebab kerusakan pada akar oleh ion polimer Al adalah terbentuknya ikatan antar polimer Al dengan membran plasma akar yang menyebabkan kerusakan pada membran dan kebocoran  $K^+$  dari sel akar (Matsumoto, Yamamoto dan Kasai, 1992).

Efek kerusakan Al pada tanaman diawali dengan gangguan terhadap tudung akar yang mempunyai sinyal dan merupakan detektor gaya gravitasi serta halangan mekanis sehingga pada gilirannya akan mengurangi sekresi musilage sel tudung akar dimana sel tersebut merupakan sumber pengatur endogen pertumbuhan. Pada tingkat molekuler, Al berhubungan dengan DNA sehingga interaksi Al dengan DNA akan mempengaruhi sifat-sifat fisikokimia dan fungsi biologis seperti menghentikan pembelahan sel pada meristem akar, perpanjangan sel, sintesis DNA dan RNA. Hal ini juga didukung oleh hasil penelitian Matsumoto (1991) yang menyatakan bahwa Al menghambat pembelahan sel dengan mengganggu penggandaan DNA.

Pada dinding sel, penghambatan terjadi karena Al menggantikan kedudukan  $Ca^{2+}$  pada lamela tengah.  $Ca^{2+}$  mempunyai peranan penting dalam transpor ion melewati membran plasma sebab Ca merupakan "second messenger" dalam aktivitas  $H^+$  - ATPase dengan bantuan calmodulin. Dalam hal ini dengan digantikannya  $Ca^{2+}$  yang melekat pada calmodulin akan terjadi perubahan aktivitas enzim. Ikatan Al dengan karboksil ( $RCOO^-$ ) membentuk ikatan kuat sehingga sel tidak mampu

membesar. Selain itu Al juga berhubungan dengan membran lipid bilayer pada sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur membran karena  $\text{Ca}^{2+}$  digantikan oleh  $\text{Al}^{3+}$  yang akhirnya mempengaruhi penyerapan hara (Marschner, 1995).

### 2.3. Mekanisme Toleransi Al

Menurut Taylor (1991) dan Marschner (1995) ada dua mekanisme toleransi tanaman terhadap Al yaitu mekanisme eksklusi dan mekanisme toleransi internal. Dalam hal ini mekanisme eksklusi terdiri dari : immobilisasi pada dinding sel, permeabilitas selektif dari membran plasma, meningkatnya pH dalam rizosfir atau apoplas akar, eksudasi ligan kelat, eksudasi fosfat dan effluk Al; sedang mekanisme toleransi internal termasuk kelatisasi Al oleh asam organik (asam malat) pada sitoplasma, kompartementasi Al dalam vakuola, isoenzim toleran, sintesis protein spesifik pengikat Al yang akan menurunkan serapan Al ataupun peningkatan effluk Al. Pembentukan kompleks Al dengan asam organik merupakan salah satu mekanisme toleransi tanaman terhadap Al. Asam organik berperan dalam eksklusi Al melalui pelepasannya dari akar dan detoksifikasi Al dalam simplas dimana asam organik tersebut dapat mengkelat Al dan mereduksi atau mencegah pengaruh racun Al. Taylor (1991) juga mengemukakan bahwa tanaman yang toleran Al cenderung meningkatkan pH di daerah rizosfir. Perubahan pH pada daerah rizosfir ini berhubungan dengan kemampuan tanaman dalam penyerapan  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$  (Harjadi dan Yahya, 1988). Bila  $\text{NO}_3^-$  lebih banyak diserap maka pH sitosol akan turun sehingga menyebabkan meningkatnya aktivitas enzim malat untuk menstimulir terjadinya dekarboksilasi malat menjadi piruvat. Penyerapan  $\text{NO}_3^-$  yang lebih besar juga menyebabkan terjadinya pelepasan ion hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) atau ion bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) ke arah perakaran sehingga sekaligus juga meningkatkan pH, yang pada gilirannya akan mengurangi kelarutan Al.

Selanjutnya dari studi pada tingkat molekuler yang dilakukan oleh Richards *et al.* (1998) pada bibit *Arabidopsis thaliana* terbukti bahwa ada empat gen yang terekspresi yang sifatnya transien menginduksi peroksidase, glutathione-S-transferase, protein yang mengikat tembaga biru, protein homolog pada retikulum dan enzim oksidoreduktase. Hasil ekspresi gen tersebut menyimpulkan bahwa perlakuan Al pada *Arabidopsis* menginduksi stres oksidatif. Dalam hal ini stres oksidatif merupakan reaksi tanaman terhadap level toksik Al.

## 2.4. Keragaman Somaklonal

Metode kultur jaringan selain menghasilkan propagula yang bermutu, juga dapat menghasilkan keragaman somaklonal yang dapat dipergunakan dalam pemuliaan tanaman secara *in vitro*. Keragaman somaklonal tanaman didefinisikan sebagai keragaman genetik dari tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan (Larkin dan Scowcroft, 1981).

Keragaman somaklonal yang dihasilkan dari penerapan teknik kultur jaringan dalam budidaya tanaman, merupakan suatu bukti bahwa melalui perbanyakan secara vegetatif terdapat kemungkinan diperoleh individu baru yang tidak seperti induknya. Dua keuntungan dari perubahan kromosom yang diperoleh melalui keragaman somaklonal yaitu : (1) keragaman yang diperoleh kemungkinan tidak akan diperoleh pada *gene pool* yang ada, (2) perubahan beberapa sifat yang akan memperbaiki penampilan. Melalui teknik kultur jaringan terdapat dua hal yang berbeda kepentingannya bagi pemuliaan tanaman yaitu mempertahankan kestabilan genotipe dan merangsang keragaman genetik. Kestabilan genotipe dapat dicapai dengan mendorong sesingkat mungkin fase pertumbuhan tak berdiferensiasi (fase kalus, sel bebas), sedangkan keragaman genetik dapat dicapai pada fase tak berdiferensiasi yang relatif panjang. Sejumlah mutan diduga dapat terbentuk pada fase kalus dan sel bebas, dari sini dapat diseleksi turunan yang sangat berguna bagi pemuliaan tanaman. Oleh karena itu dari hasil kultur jaringan dapat diseleksi genotipe yang berguna bagi pemuliaan tanaman seperti sifat-sifat tahan penyakit, toleransi terhadap salinitas dan ion-ion yang meracuni tanaman (seperti Al, Mn, Pb, Fe), kekeringan serta herbisida (Gunawan, 1992).

Pada kultur jaringan keadaan eksplan dan keseimbangan zat pengatur tumbuh dalam media dapat mempengaruhi kestabilan genetik materi kultur (Ancora dan Sonuino, 1987). Menurut D'Amoto (1978) dan Bayliss (1980) kultur jaringan merupakan sumber potensial untuk mendapatkan keragaman, yaitu dengan cara mengatur komposisi media, keseimbangan zat pengatur tumbuh, dan lama mengkulturkan. Terdapat tiga cara memperoleh keragaman somaklonal dari eksplan yang telah berhasil dikerjakan yaitu : (1) eksplan yang beregenerasi langsung membentuk tunas dan akar, (2) menginduksi kalus terlebih dahulu kemudian dilanjutkan penanaman sel tunggal, dan (3) kultur protoplasma (Jacobsen, 1987).

Reisch (1983) mengungkapkan bahwa kultur kalus dapat menghasilkan keragaman somaklonal. Keragaman ini dapat ditingkatkan dengan menggunakan mutagen. Mutagen yang digunakan dapat berupa mutagen fisik seperti sinar-x dan sinar gamma, maupun mutagen kimia dapat berupa bahan kimia antara lain etil metan sulfonat (EMS), dietil sulfat (DES) dan nitroso metil urea (NMU) (Ancora dan Sonuino, 1987).

## 2.5. Mutagen

Keragaman somaklonal yang terjadi tidak hanya mengandalkan pada cara spontan, tetapi dapat ditingkatkan dengan cara induksi dari luar dengan menggunakan mutagen fisik maupun kimia, dan mutasi yang diperoleh merupakan mutasi buatan (*induced mutation*) (Ismachin, 1988). Penggunaan mutagen dalam pemuliaan tanaman dimulai tahun 1940an. Di antara peneliti yang telah melakukannya adalah Freisleben dan In Halle dari Jerman. Mereka berhasil mendapatkan mutan barley yang tahan *mildew*. Pada saat yang sama Tolenaar berhasil mendapatkan mutan dari tanaman tembakau yang diradiasi sinar-x di Deli Medan (Ismachin, 1988).

Sinar-x dan sinar gamma (mutagen fisik) adalah gelombang elektro magnetik, dimana protonnya akan meresap kedalam materi dengan suatu proses dimana sebagian atau seluruh energi proton ditransfer ke energi kinetik suatu elektron. Elektron ini kemudian kehilangan energinya karena berinteraksi dengan atom molekul materi tadi dan melepaskan elektron lain. Beberapa elektron ini dapat menghasilkan energi yang cukup untuk mengionisir partikelnya sendiri. Proses ionisasi ini menghasilkan radikal ion positif dan ion bebas. Dalam sistem biologi elektron tersebut akan terjebak dalam sistem polar, sehingga cukup waktu bagi ion radikal yang lebih dan aktif itu untuk bereaksi dengan molekul lain atau masuk ke dalam susunan jaringan (Ismachin, 1988).

Materi biologi selalu mengandung air yang cukup banyak. Dengan demikian penyerapan sinar pengion dalam materi biologi akan melibatkan proses fisika dan kimia sebagai sumber kerusakan gen (Ismachin, 1988). Bagi para pemulia tanaman perlu diketahui tinggi rendahnya kecepatan dosis atau laju dosis iradiasi. Dosis terserap untuk setiap sinar pengion adalah jumlah energi yang diserap per berat

benda yang disinari. Satuan sinar radiasi adalah Gray (Gy) atau rad.

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg per gr} = 10 \text{ joule per kg}$$

$$1 \text{ Gy} = 100\text{rad} = 0,1 \text{ krad}$$

Kecepatan dosis adalah jumlah dosis terserap persatuan waktu (rad per detik atau Gy per detik). Dosimeter adalah alat pengukur besarnya dosis radiasi. Dosimeter standar yang umum digunakan adalah dosimeter Fricke, tetapi dosimeter ini hanya untuk pengukuran dosis sinar gamma antara 40-400 Gy. Diluar dosis itu dosimeter sudah tidak tepat lagi. Pengukuran dosis diluar selang tersebut dilakukan kalibrasi dengan perhitungan atas laju dosis dan waktu penyinaran (Ismachin, 1988).

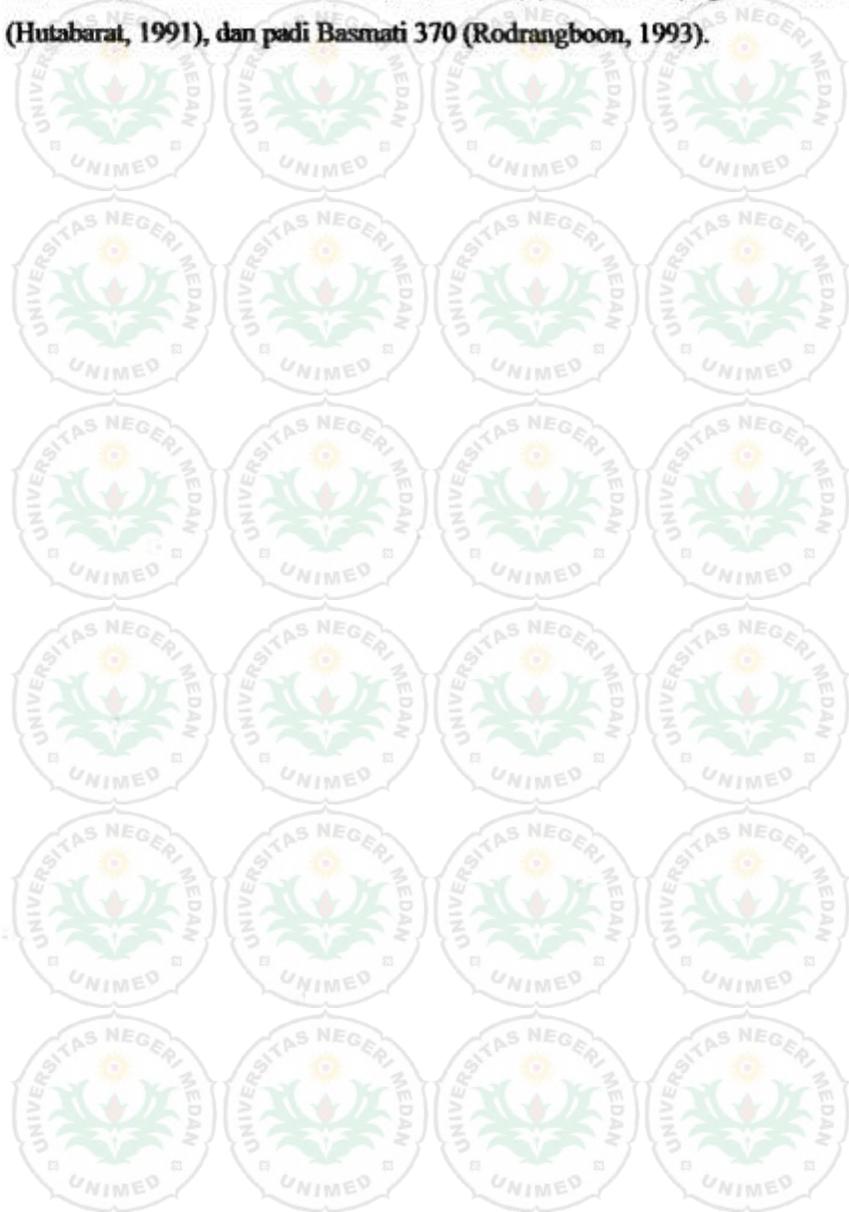
## 2.6. Studi Pendahuluan/Kemajuan yang Telah Dicapai

Studi pendahuluan/kemajuan yang telah dicapai untuk penelitian ini telah banyak dilakukan untuk memberikan gambaran dalam mencapai tujuan jangka panjang dan target khusus yang diinginkan. Berikut ini berbagai penelitian pendahuluan/kemajuan yang telah dicapai.

Penelitian pendahuluan tentang keragaman somaklonal pada padi dapat ditingkatkan melalui kultur kalus dan iradiasi sinar gamma (Edi, 2004), mutasi induksi dengan sinar gamma ( $\text{Co}^{60}$ ) dapat meningkat keragaman somaklonal (Soedjono, 2003), pemanfaatan kultur *in vitro* untuk meningkat keragaman genetik tanaman nilam (Mariskan dan Gati, 20003).

Beberapa penelitian seleksi *in vitro* yang dilakukan untuk mendapatkan ketahanan antara lain : (a) seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap tanah masam dan Al pada tanaman kedelai, dari hasil penelitian didapatkan varietas kelinci yang tahan terhadap tanah masam (Hutabarat dan Ratma, 1996), (b) pengaruh sinar gamma terhadap toleransi Al pada padi varietas sentani melalui teknik kultur jaringan, dari hasil penelitian didapatkan mutan tahan Al pada perlakuan 10 Gy + 8 ppm Al dan 20 Gy + 14 ppm Al (Hutabarat, 1991), (c) induksi keragaman somaklon ke arah ketenggangan terhadap keracunan Al pada tanaman jagung, dari hasil penelitian didapatkan terjadinya peningkatan daya ketenggangan tanaman jagung somaklon terhadap keracunan Al sampai taraf 800  $\mu\text{M AlCl}_3$  (Sutjahjo, 1994), dan (d) seleksi varietas padi peka menjadi tahan Al menggunakan keragaman somaklonal, didapatkan tanaman padi genotipe Aiwu yang tahan terhadap Al pada konsentrasi 250 dan 1000  $\mu\text{ML}^{-1}$  pada pH 3,85 (Van Sint Jan *et al*, 1997).

Beberapa hasil penelitian penggunaan radiasi pada eksplan kultur jaringan yang menghasilkan keragaman somaklonal adalah pengaruh sinar gamma pada nilam (*Pogostemon cablin* Bent.) (Mariska *et al.*, 1997), pisang ambon kuning (Wardiyati *dkk*, 2000), *Catharantus roseus* (L.) Don. (Syukur, 2000), padi varietas Sentani (Hutabarat, 1991), dan padi Basmati 370 (Rodrangboon, 1993).



## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca Jurusan Biologi FMIPA UNIMED. Penelitian dimulai bulan Maret 2011 sampai November 2013.

### 3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang akan digunakan berupa 3 macam varietas padi Ladang asal Kepulauan Nias yaitu : nias-1, nias-2, nias-3 dan T 309 (kontrol *in vitro*). Sebagai perbandingan dilapangan digunakan varietas Dupa (tenggang AI dan pH rendah) dan varietas Salun pikit (peka AI dan pH rendah). Bahan kimia yang diperlukan sesuai dengan formula media Murashige & Skoog (1962), bahan kimia untuk membuat media pengujian pada kultur *in vitro*, bahan kimia untuk pengujian pada larutan hara dan bahan kimia untuk pengujian progeni. Zat pengatur tumbuh yang digunakan meliputi : Auksin (IAA, NAA, 2,4-D), sitokinin (BAP, kinetin dan zeatin). Asam amino campuran yaitu casein hydrolysate (CH). Bahan sterilisasi meliputi : deterjen, benlate, alkohol, sunklin dan akuades steril. Bahan untuk tutup botol kultur antara lain aluminium foil, plastik wrap dan karet gelang.

Alat yang akan digunakan sebagian besar berupa alat gelas standar seperti: botol kultur, erlemeyer, petridis, pipet isap, labu ukur, corong, saringan, timbangan analitik, autoklaf, pH meter, kompor listrik, oven, alat diseksi (pisau, pinset dan gunting), kotak pindah (laminar air flow cabinet), lampu spritus dan rak kultur.

Bahan dan alat yang digunakan di rumah kaca adalah : a) untuk aklimatisasi : tanah kebun dan pupuk kompos, polibag kecil ukuran 12 x 12 cm, gelas akua untuk tutup planlet, b) untuk pengujian planlet pada larutan hara seleksi : botol kultur ukuran 500 ml, gabus dan busa tutup botol, aerator, slang kecil dan c) untuk pengujian tanaman pada tanah asam menggunakan tanah podsolik merah kuning (PMK), kapur pertanian (kaptan), pupuk buatan (urea, SP 36, KCl), pot plastik besar, ayakan dan bahan pengendalian hama dan penyakit (Azodrin 1 cc/l dan Dithane M-45 1 g/l).

### 3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode yang sesuai dengan tujuan penelitian yaitu mendapat varietas tanaman padi yang tenggang terhadap Al dan pH melalui keragaman somaklonal yang diinduksi melalui kultur *in vitro* (kultur kalus) dan iradiasi sinar gamma. Untuk mencapai tujuan tersebut berbagai metode digunakan, antara lain :

#### Tahun I :

1. Metode induksi keragaman somaklonal melalui kultur kalus. Kultur kalus menggunakan metode Edi (2004). **Luaran** untuk mendapat *kalus* yang *embriogenik* dengan penampilan yang beragam. **Indikator** pengamatan adalah kalus segar dengan *pertumbuhan cepat, renggang (freabel), bening, warna kuning keputihan, nodul jelas dan adanya spot hijau*. Induksi kalus dilakukan dengan cara pemberian zat pengatur tumbuh yang seimbang pada kultur *in vitro*. Pemakaian zat pengatur tumbuh dari golongan auksin kuat (2,4-D dan NAA) dan sitokinin kuat (BAP dan thidiazuron) mendorong pertumbuhan sel kalus lebih cepat dengan keragaman yang tinggi. Pertumbuhan dan perbanyakkan kalus yang cepat diharapkan adanya penyimpangan pembelahan mitosis, sehingga sel yang satu berlainan dengan sel yang lain dan memunculkan keragaman baru.
2. Iradiasi sinar gamma dilakukan untuk meningkat keragaman sudah ada pada sel-sel kalus (Edi, 2004). **Luaran** adalah *kalus hidup* setelah iradiasi. **Indikator** yang diamati setelah 1 minggu adalah : *kalus segar, mengkilat, tidak hancur* bila diraba pakai pingset.
3. Pengujian kalus pada tingkat *in vitro* menggunakan metode Van Sint Jan *et al.* (1997). **Luaran** mendapat *kalus* yang *tenggang* terhadap Al dan pH rendah setelah *seleksi in vitro*. **Indikator** yang diamati setelah 12 minggu dalam media seleksi adalah adanya *kalus segar dan tumbuh dengan baik*. Pengujian dalam kultur *in vitro* dilakukan dengan menambahkan Al dengan berbagai konsentrasi ke dalam media seleksi pada pH 4.
4. Regenerasi kalus menggunakan metode Herkules dan Edi (2009). Kalus hasil seleksi *in vitro* dipindahkan ke media regenerasi yang menginduksi tunas dan akar. **Luaran** untuk mendapatkan *planlet* (tanaman) padi pada tingkat *in vitro*. **Indikator** yang diamati adalah *planlet (tanaman) padi yang lengkap (tunas dan*

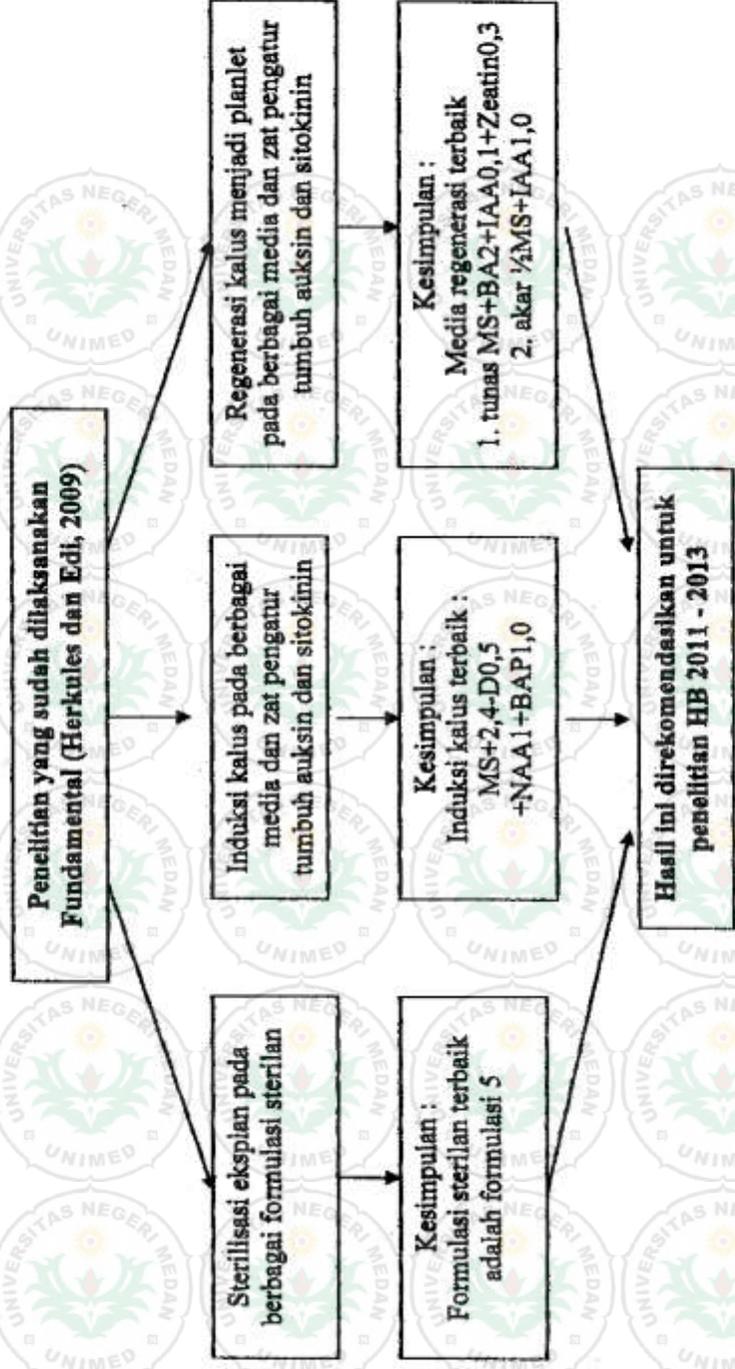
*akar*) dengan berbagai *penampilan* (performance) atau keragaman yang tinggi. Pertama kalus di subkultur ke media yang dapat menginduksi tunas yaitu media yang mengandung sitokinin. Setelah tunas terbentuk, selanjutnya tunas ini dipindahkan ke media yang dapat menginduksi akar. Dalam sistem generasi kalus, yang pertama diinduksi adalah tunas karena kalau akar duluan yang diinduksi maka kalus tersebut sangat sukar untuk bertunas.

#### Tahun II :

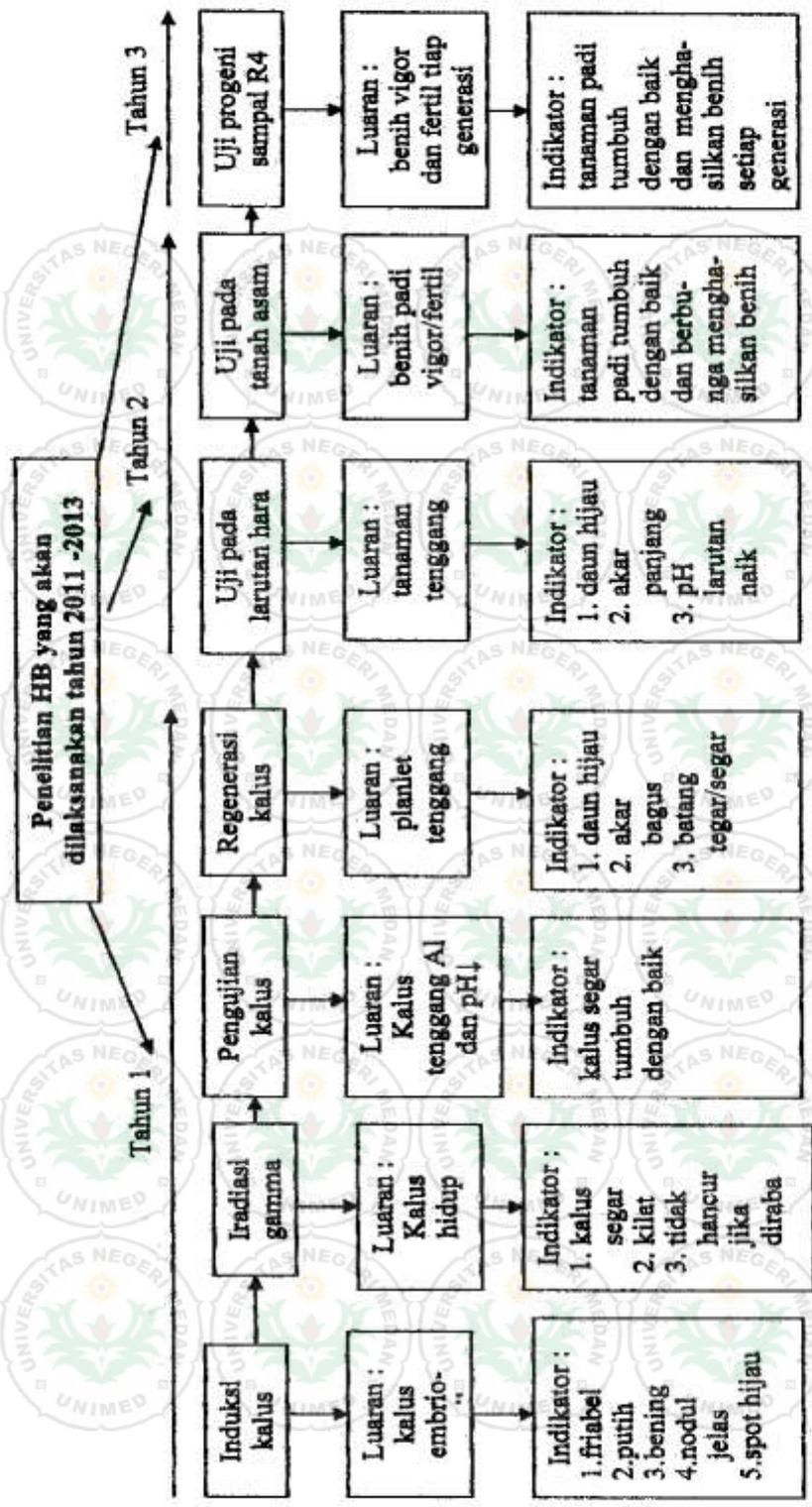
5. Pengujian pada larutan hara menggunakan metode Van Sint Jan *et al.* (1997) untuk unsur makro dan Yoshida *et al.* (1976) untuk unsur mikro. **Luaran** untuk mendapatkan *tanaman padi tenggang Al dan pH rendah* pada larutan hara seleksi selama 12 minggu. **Indikator** yang diamati adalah *tanaman padi yang berwarna hijau, akar bertambah panjang dan pH larutan naik*.
6. Untuk mendapatkan biji (R1) tanaman tenggang dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur dengan kompos (2 : 1) selama 8 minggu.
7. Pengujian pada tanah masam menggunakan metode Sarkarung (1986) dengan cara mencampur tanah podsolik merah kuning dengan kapur pertanian berdasarkan hasil analisis tanah. Kemudian biji padi (R1) hasil seleksi larutan hara ditanam selama 16 minggu. **Luaran** untuk mendapat *tanaman padi* yang dapat *menghasilkan benih*. **Indikatornya** adalah *tanaman padi yang tumbuh baik, berbunga dan menghasilkan benih vigor dan fertil*. Benih padi vigor dan fertil (R2) yang dihasilkan akan digunakan untuk uji selanjutnya.

#### Tahun III :

8. Uji Progeni menggunakan metode Costa *et al.*, (1997). Uji ini dilakukan untuk menstabilkan sifat tenggang Al dan pH rendah yang sudah didapat sampai regenerasi keempat (R4). **Luarannya** menghasilkan benih padi vigor dan fertil tiap generasi *tanaman padi* dengan *sifat tenggang Al dan pH rendah yang stabil*. **Indikatornya** adalah *tanaman padi berwarna hijau* setelah diseleksi dengan Al 1500  $\mu\text{mol}$  dan pH 4 selama 80 hari, selanjutnya menghasilkan *biji yang vigor dan fertil* jika dipindahkan pada tanah masam yang dicampur kompos. Gambar 1 dan 2 memperlihatkan *Bagan Alir* penelitian yang menggambarkan apa yang sudah dilaksanakan dan apa yang akan dikerjakan secara multitahun. Bagan alir penelitian dilengkapi *luaran (output)* dan indikator capaian yang terukur.



**Gambar 1. Bagan Alir Penelitian yang sudah dilaksanakan**



**Gambar 2. Bagan Alir Penelitian yang akan dilaksanakan**

## 1.4. Percobaan

### 3.4.1. Percobaan di Laboratorium (*In vitro*)

Inti dari percobaan di Laboratorium adalah untuk menginduksi keragaman somaklonal melalui kultur kalus, sekaligus mendapat media dan zat pengatur tumbuh terbaik. Dari hasil penelitian fundamental didapat media dan zat pengatur tumbuh terbaik pada media MS+2,4-D0,5 +NAA1+BAP1,0.

### 3.4.2. Iradiasi kalus dengan sinar gamma

Untuk meningkatkan keragaman pada kalus, maka dilakukan iradiasi sinar gamma pada dosis 1,5 krad. Dosis ini digunakan berdasarkan hasil penelitian Edi tahun 2004.

### 3.4.3. Seleksi kalus pada media yang mengandung Aluminium (Al) dan pH 4

Konsentrasi Al yang digunakan : 0, 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm untuk keempat varietas yang digunakan. Terdapat 24 (6 x 4) kombinasi perlakuan dengan ulangan 6 kali (botol kultur) untuk setiap kombinasi perlakuan. Setiap botol kultur berisi 7 buah eksplan (embrio). Menggunakan RAL faktorial. Peubah yang diamati : persentase (jumlah) kalus yang hidup. Kemudian dihitung standar deviasi. Untuk melihat perbedaan rata-rata diuji dengan BNT 5 %.

### 3.4.4. Regenerasi kalus menjadi planlet

#### 3.4.4.1. Regenerasi kalus menjadi tunas

Regenerasi kalus menjadi planlet menggunakan media MS + BA 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l + Zeatin 0.3 mg/l (sesuai dengan hasil penelitian fundamental). Peubah yang diamati : jumlah (%) kalus bertunas dan jumlah tunas per kalus.

#### 3.4.4.2. Induksi akar

Induksi akar menggunakan media  $\frac{1}{2}$ MS + IAA 1,0 mg/l (sesuai dengan hasil penelitian fundamental). Peubah yang diamati : jumlah akar dan panjang akar.

### 3.4.5. Percobaan di Rumah Kaca

#### 3.4.5.1. Aklimatisasi planlet

Aklimatisasi dilakukan untuk mendapatkan tanaman yang tahan terhadap

kondisi luar (alami) yang sangat berbeda dengan kondisi sebelumnya yaitu kondisi *in vitro* (kondisi laboratorium) yang steril. Perlakuannya adalah media tanam menggunakan campuran tanah kebun dan kompos (2 : 1). Peubah yang diamati adalah : jumlah (%) tanaman tenggang (hidup) setelah proses akhir aklimatisasi. Hasil aklimatisasi akan digunakan untuk pengujian pada larutan hara seleksi.

#### 3.4.5.2. Pengujian tanaman pada larutan hara seleksi

Tanaman hasil aklimatisasi diuji menggunakan larutan hara seleksi selama 12 minggu. Konsentrasi Al yang ditambahkan sesuai dengan yang ditambah pada media seleksi. Larutan hara seleksi diperbarui setiap minggu dan optimasi pH 4 (pH awal) dilakukan dengan penambahan 0.1 N NaOH atau 0.1 N HO. Untuk menghindari terjadinya pengendapan pada larutan hara digunakan aerator. Peubah yang diamati adalah pertambahan panjang akar dan perubahan pH larutan.

Pengamatan pertambahan panjang akar dan perubahan pH dilakukan sekali dua hari. Data pertambahan panjang akar dan perubahan pH ditampilkan dalam bentuk grafik.

#### 3.4.5.3. Biji R1

Untuk menghasilkan biji R1, maka tanaman dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur kompos (2 : 1). Biji ini digunakan untuk uji selanjutnya pada tanah masam.

#### 3.4.5.4. Pengujian tanaman pada tanah masam

Tanaman yang tenggang terhadap larutan hara seleksi dipindahkan kedalam pot plastik besar berisi tanah podsolik merah kuning dan untuk kontrol ditambah kapur berdasarkan hasil analisis tanah untuk ditumbuhkan sampai menghasilkan biji R2. Selanjutnya rasio bobot gabah per rumpun (RBGR) dihitung dengan persamaan :

$$RBGR = \frac{\text{Bobot gabah per rumpun pada keadaan tercekam Al}}{\text{Bobot gabah per rumpun pada keadaan tanpa Al}} \times 100 \%$$

Berdasarkan nilai skoring RBGR, tanaman dikelompokkan berdasarkan sifat ketenggangannya terhadap Al mengikuti metode Sarkarung (1986) yang telah dimodifikasi, yaitu skor 0 > 90% (sangat tenggang), 1 = 81 — 90 % (tenggang), 2 = 71 - 80% (agak tenggang), 3 = 61 - 70% (agak peka), 4 = 51 - 60 (peka) dan 5 = < 50% (sangat peka).

### 3.4.5.5. Uji Progeni

Untuk menentukan kestabilan sifat tenggang Al dan pH rendah pada progeni tanaman R1, maka biji R2 didekambahkan pada kertas filter yang dibasahi dengan air tanpa mineral. Planlet yang berumur 10 hari dipindahkan kelarutan hara selektif dengan kandungan Al 1500  $\mu\text{mol}$  selama 80 hari. Menurut Costa *et al.*, 1997 ada tiga kategori tanaman hasil seleksi : (i) Tanaman yang tahan (RPs) menunjukkan warna hijau, (ii) tanaman memperlihatkan nekrosis daun sebagian (HPs), dan (iii) tanaman yang sensitif (SPs) terlihat semuanya nekrosis. Sesudah periode seleksi generasi 1 (R1), hanya RPs yang dipindahkan ke dalam campuran tanah/kompos untuk ditumbuhkan menjadi biji, dan biji yang mempunyai vigor dan fertil RPs yang digunakan untuk uji dua generasi berikut (R3 dan R4) dengan menggunakan prosedur yang sama. Selama uji progeni, pencahayaan dan temperatur dicatat.

## 3.5. Prosedur Penelitian

### 3.5.1. Pembuatan Media Kultur

Dalam penelitian ini digunakan media padat dari Murashige & Skoog (1962) untuk induksi kalus dengan penambahan zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan. Keasaman media (pH) diatur sebesar 5,8 sebelum diautoklaf dengan menambahkan beberapa tetes 0,1 N NaOH atau 0,1 N HCl ke dalam media.

Untuk membuat menjadi padat dengan menambahkan gelrite konsentrasi 0,25 % (2,5 g/l). Media dipanaskan di atas tungku listrik untuk melarutkan agar dan sukrosa. Setelah media mendidih yang berupa larutan jernih, selanjutnya dimasukkan ke dalam botol kultur yang sudah disterilkan sebelumnya sebanyak 25 ml setiap botol. Setelah itu botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C pada tekanan 20 psi.

Proses pembuatan media uji sama dengan proses pembuatan media untuk induksi kalus, yang berbeda adalah komposisi unsur makro dan konsentrasi gelrite. Penambahan gelrite disesuaikan dengan konsentrasi Al yang ditambahkan (makin tinggi konsentrasi Al, gelrite yang ditambahkan semakin banyak). Keasaman media (pH) diatur sebesar 4.0 sebelum diautoklaf.

Pembuatan larutan hara uji digunakan untuk menguji planlet yang tenggang terhadap Al dan pH rendah, komposisi unsur makro sesuai dengan yang dikemukakan Van Sint Jan *et al.* (1997) dan unsur mikro yang dikemukakan Yoshida *et al.* (1976). Konsentrasi Al sesuai dengan media seleksi yaitu 0, 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm, kemasaman larutan hara seleksi (pH) diatur 4.0 dengan penambahan 0.1 N NaOH atau 0.1 N HCl. Larutan hara seleksi diperbarui setiap minggu.

### 3.5.2. Prosedur Percobaan

Induksi kalus, biji-biji yang sudah mengalami pembengkakan segera diisolasi (dibuang endosperm), kemudian embrionya diinokulasi pada media induksi kalus (sesuai perlakuan) masing-masing 8 eksplan per botol kultur. Selanjutnya semua botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam ruang pertumbuhan. Suhu ruang pertumbuhan sudah diatur sekitar  $(26 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  dan diberikan cahaya lampu TL 40 watt selama 16 jam per hari. Setelah satu minggu semua kalus yang terbentuk diperiksa dan skutelum yang tumbuh diujung kalus dipotong dan dibuang. Selanjutnya kalus dikulturkan kembali di dalam media yang sama selama 10 minggu (2 kali sub kultur).

Selanjutnya dilakukan iradiasi sinar gamma dengan dosis 1,5 krad, setelah iradiasi kalus dipindahkan ke media segar tanpa zat pengatur tumbuh (MS0) selama 1 minggu. Kalus yang masih hidup selanjutnya dilakukan pengujian pada media yang mengandung Al dan pH rendah.

Pengujian kalus pada media yang mengandung Al dan pH rendah, kalus yang keadaannya bagus (kalus mengkilap, warna putih kekuningan, kompak artinya tidak hancur bila diraba dengan pinset) akan dipindahkan ke dalam media uji. Kalus dibiarkan tumbuh dan berkembang selama 12 minggu (enam kali subkultur). Pada media seleksi ini sebagian besar kalus akan mati yang ditandai dengan warna kalus yang menghitam, hanya kalus-kalus yang tenggang akan dapat berkembang secara terus-menerus.

Regenerasi kalus akan dilakukan setelah melewati seleksi. Kalus yang masih tumbuh dengan baik (kalus tenggang) ditandai dengan warna kalus kekuning-kuningan. Pertama-tama kalus diinduksi untuk menghasilkan tunas yang ditandai dengan berobahnya warna kalus dari kuning menjadi putih kekuning-kuningan, tahap selanjutnya akan muncul spot-spot hijau yang nantinya akan muncul tunas.

Aluminium akan menghambat pertumbuhan akar, oleh karena itu tunas yang sudah tumbuh dengan baik akan dipindahkan ke media pengakaran guna menginduksi pertumbuhan akar. Planlet yang sudah mempunyai akar banyak dan kuat akan segera diaklimatisasi.

Aklimatisasi dilakukan untuk penyesuaian dengan lingkungan luar yang tidak steril. Sebelum planlet dipindahkan ke lingkungan luar, terlebih dahulu disiapkan media tanam yang terdiri dari campuran tanah kebun dengan kompos (2 : 1), kemudian campuran tanah dan kompos diayak dan dimasukkan ke dalam polibag kecil (12 x 12 cm). Setelah itu permukaan tanah disiram dengan benlate 1 g/L. Planlet yang ada dalam botol kultur dikeluarkan, media kultur yang masih ada pada akar planlet secara perlahan-lahan dicuci pada air mengalir. Selanjutnya planlet ditanam pada pot-pot yang telah disiapkan. Untuk menjaga penguapan yang terlalu besar, planlet ditutupi dengan gelas akua dan paranet yang berwarna hitam selama 10 hari. Setelah 10 hari secara berangsur-angsur tutup gelas dan paranet dibuka sedikit demi sedikit sampai akhirnya tanpa penutup sama sekali. Tanaman yang sudah dapat bertahan diruangan terbuka akan dipindahkan ke larutan hara seleksi (seleksi planlet).

Pengujian planlet pada kultur larutan hara, pembuatan larutan hara seleksi dilakukan dengan cara menimbang dan mencampur bahan kimia makro dan mikro serta melarutkannya dalam akuades. Selanjutnya larutan hara seleksi dimasukkan ke dalam botol kultur besar sebanyak 400 ml. Gabus dan busa digunakan sebagai penyangga tanaman di atas permukaan botol, setiap botol satu tanaman. Suplai oksigen dilakukan dengan menggunakan aerator yang dihubungkan oleh slang kecil ke tiap-tiap botol kultur. Larutan diperbarui setiap minggu, selama 12 minggu. Kemudian tanaman tenggang dipindahkan ke tanah podsolik merah kuning yang dicampur kompos (2 : 1) selama 8 minggu sampai menghasilkan biji R1.

Pengujian biji R1 pada tanah masam, tanah yang digunakan adalah tanah Podsolik Merah Kuning (PMK). Untuk tanaman kontrol digunakan tanah yang sama tetapi diberi pengapuran setara 1 x  $Al_{44}$ . Media tanam dipersiapkan dalam pot-pot plastik dengan volume 10 kg tanah per pot. Selanjutnya tanaman hasil seleksi kultur larutan hara dipindahkan ke pot-pot plastik untuk ditumbuhkan sampai menghasilkan benih R1 (Gambar 3). Pemupukan dilakukan sehari sebelum tanam dengan dosis 5 g Urea, 4 g SP36 dan 4 g KCl per pot. Penyiraman dilakukan dua hari sekali,

sedangkan pengendalian hama dan penyakit dilakukan secara kontinyu setiap dua minggu atau apabila tanaman menunjukkan gejala serangan.

Untuk menentukan kestabilan sifat tahan Al dan pH rendah pada progeni tanaman RO, maka biji R1 dikecambahkan pada kertas filter yang dibasahi dengan air tanpa mineral. Planlet yang berumur 10 hari dipindahkan ke larutan hara selektif dengan kandungan Al 1500  $\mu\text{mol}$  selama 80 hari. Pemilihan lamanya waktu stres dan konsentrasi Al didasarkan pada studi pendahuluan oleh Costa *et al.* (1997) karena telah menunjukkan bahwa evaluasi melalui nekrosis lebih dapat dipercaya jika pemeliharaan tanaman dalam jangka waktu yang lama (80 hari) dan konsentrasi Al yang tinggi (1500  $\mu\text{mol}$ ). Tanaman ditumbuhkan pada tangki berisi 25 l larutan yang diperbaharui setiap minggu dengan rata-rata 30 tanaman/tangki.

### 3.6. Komposisi Media Kultur dan Larutan

Media # 1 terdiri dari media MS (Murashige & Skoog, 1962) ditambah dengan 100  $\text{mg L}^{-1}$  myoinositol, 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  asam nikotinat, 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  pyridoxin HCl, 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  tiamin HCl, 3 % sukrosa dan 0,25 % gelrite, auksin dan sitokinin (sesuai perlakuan). Media # 2 dan media # 3 merupakan media regenerasi yang terdiri dari media MS ditambah auksin dan sitokinin (sesuai perlakuan).

Komposisi media seleksi adalah sebagai berikut : 2,4  $\text{g L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1,9  $\text{g L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ , 370  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 13  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 28  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; yang lain garam, vitamin, sukrosa dan regulator pertumbuhan seperti pada medium # 1. Perbedaan konsentrasi  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0 - 500 ppm), pH 4,0, gelrite 2,5 - 17  $\text{g L}^{-1}$  yang ditambahkan sebelum diautoklaf.

Larutan hara seleksi digunakan untuk seleksi tanaman berisi : 240,7  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 228,6  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 41,02  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 27,8  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 16,09  $\text{mg L}^{-1}$  KCl, 6,16  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0 dan 45 ppm), pH 4,0 dan mikroelemen Yoshida *et al.* (1976).

**SURAT PERJANJIAN PENGGUNAAN DANA (SP2D)**

No. : 129 /UN33.8/PL/2011

Pada hari ini Rabu tanggal satu bulan Juni tahun dua ribu sebelas, kami yang bertanda tangan di bawah ini :

1. Dr. Ridwan Abd. Sani, M.Si :Ketua Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan,dan atas nama Rektor Unimed, dan dalam perjanjian ini disebut PIHAK PERTAMA.
2. Ir. Hercules, M.S :Dosen FMIPA bertindak sebagai Peneliti/Ketua pelaksana penelitian, selanjutnya disebut PIHAK KEDUA.

Kedua belah pihak secara bersama-sama telah sepakat mengadakan Surat Perjanjian Penggunaan Dana (SP2D) untuk melakukan penelitian yang dibiayai dari Dirjen Dikti Tahun anggaran 2011 sesuai surat perjanjian penugasan Nomor 036/SP2H/PL/Dit.Litabmas/IV/2011, tanggal 14 April 2011, DP2M Dikti Depdiknas untuk Penelitian Hibah Bersaing dengan ketentuan sebagai berikut :

**Pasal 1  
JENIS PEKERJAAN**

PIHAK PERTAMA memberikan tugas kepada PIHAK KEDUA, dan PIHAK KEDUA menerima tugas tersebut untuk melaksanakan penelitian dengan judul: " Peningkatan Keragaman Somaklonal Melalui Kultur In Vitro dan Iradiasi Sinar Gamma ke Arah Ketenggangan Terhadap Aluminium dan Pb Rendah pada Tanaman Padi." yang menjadi tanggungjawab PIHAK KEDUA dengan masa kerja 5 (lima) bulan, terhitung mulai bulan Juli s/d Nopember 2011.

**Pasal 2  
DASAR PELAKSANAAN PEKERJAAN**

Pekerjaan dilaksanakan oleh PIHAK KEDUA atas dasar ketentuan yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari SP2D ini, yaitu:

1. Sesuai dengan proposal yang diajukan
2. UU RI No. 17 Tahun 2003, tentang Keuangan Negara
3. UU RI No. 1 Tahun 2004, tentang Perbendaharaan Negara
4. UU RI No. 15 Tahun 2004, tentang pemeriksaan pengelolaan dan tanggungjawab keuangan Negara.
5. DIPA No. 0541/023-04.1.01/00/2011, Tanggal 20 Desember 2010, DP2M.

**Pasal 3  
PENGAWASAN**

Untuk pelaksanaan pengawasan dan pengendalian pekerjaan adalah Lembaga Penelitian Unimed dan Sistem pengendalian Internal (SPI) Unimed.

**Pasal 4  
NILAI PEKERJAAN**

1. PIHAK PERTAMA memberikan dana penelitian tersebut pada pasal 1 sebesar Rp.35.000.000,- (Tiga puluh lima juta rupiah) secara bertahap.
2. Tahap pertama sebesar 70% yaitu Rp. 24.500.000,- (Dua puluh empat juta lima ratus ribu rupiah) dibayarkan sewaktu Surat Perjanjian Penggunaan dana (SP2D) ini ditandatangani oleh kedua belah pihak.
3. Tahap kedua sebesar 30% yaitu Rp. 10.500.000,- (Sepuluh juta lima ratus ribu rupiah) dibayarkan setelah PIHAK KEDUA menyerahkan laporan hasil penelitian dan bukti pengeluaran/penggunaan dana penelitian kepada PIHAK PERTAMA.
4. PIHAK KEDUA membayar pajak (PPh) sebesar 15% dari jumlah dana penelitian yang diterima dan fotocopy bukti pembayaran diserahkan ke Lembaga penelitian 2 rangkap.

Pasal 5  
JANGKA WAKTU PELAKSANAAN

1. PIHAK KEDUA menyelesaikan dan menyerahkan laporan hasil penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 SP2D ini selambat-lambatnya tanggal 14 Nopember 2011.

Pasal 6  
LAPORAN

1. PIHAK KEDUA menyerahkan laporan kemajuan pelaksanaan penelitian paling lambat tanggal 08 Agustus 2011 dan PIHAK KEDUA menyampaikan draft laporan akhir penelitian paling lambat tanggal 17 Oktober 2011. Untuk pelaksanaan seminar yang dikordinasi oleh Lemlit dan laporan akhir penelitian sebagaimana disebut dalam pasal 1 sebanyak 8 (delapan) eksamplar beserta Soft Copy.
2. PIHAK KEDUA harus menyampaikan naskah artikel hasil penelitian dalam bentuk compact disk (CD) untuk diterbitkan pada jurnal Nasional terakreditasi dan bukti pengiriman disertakan dalam laporan.
3. Sebelum laporan akhir penelitian diselesaikan PIHAK KEDUA melakukan diseminasi hasil penelitian melalui forum yang dikordinasikan oleh Lembaga Penelitian dengan kontribusi dana sebesar 1% dari jumlah dana penelitian yang tertulis dalam pasal 2 dan pembiayaannya dibebankan kepada PIHAK KEDUA.
4. Seminar penelitian dilakukan di Lembaga Penelitian dengan mengundang dosen dan mahasiswa sebagai peserta seminar lembaga penelitian.
5. Bahan pelaksanaan seminar dimaksud (makalah) disampaikan ke Lembaga Penelitian sebanyak 2 (dua) exemplar.
6. Bukti pengeluaran keuangan (kuitansi) dan RAB menjadi arsip pada PIHAK KEDUA dan 1 (satu) rangkap diserahkan ke Lembaga penelitian Unimed dalam bentuk laporan penggunaan dana penelitian paling lambat tanggal 10 Agustus 2011 yang pembiayaannya dibebankan kepada PIHAK KEDUA.
7. Dana penelitian tahap II tidak dapat dicairkan jika bukti pengeluaran keuangan belum diserahkan oleh peneliti, dan dikembalikan ke kas Negara jika melewati batas akhir SP2D.
8. Sistematis Laporan Akhir penelitian harus memenuhi ketentuan sebagai berikut:

Laporan hasil penelitian yang tersebut dalam pasal 4 harus memenuhi ketentuan sbb:

- a. Bentuk kuwarto
- b. Warna cover disesuaikan dengan ketentuan yang ditetapkan Ditjen Dikti
- c. Dibawah bagian kulit/cover depan ditulis : Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, sesuai dengan surat Perjanjian Hibah Penugasan Penelitian Hibah Bersaing No. 036/SP2H/PL/Dit.Litabmas/IV/2011 tanggal 14 April 2011
- d. Melampirkan Surat Perjanjian Penggunaan Dana (SP2D) pada lampiran laporan.

Pasal 7  
SANKSI

Apabila PIHAK KEDUA dalam penelitian tidak dapat menyelesaikan penelitian sebagaimana tersebut dalam pasal 5 maka PIHAK KEDUA dikenakan sanksi:

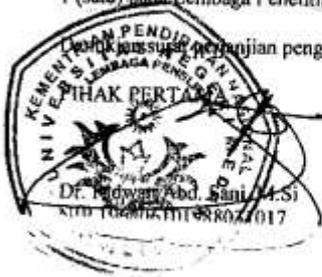
1. Denda sebesar 1 % perhari dengan maksimum denda sebesar 5 % dari nilai Surat Perjanjian Penggunaan dana (SP2D)
2. Tidak akan diikutsertakan dalam pelaksanaan penelitian atau kegiatan lainnya.
3. Apabila pelaksana program melalaikan kewajiban baik langsung atau tidak langsung yang merugikan keuangan negara diwajibkan mengganti kerugian yang dimaksud.
4. Apabila ketua peneliti berhalangan melaksanakan desiminasi karena suatu hal, maka wajib menunjuk salah seorang anggota yang mampu.

Pasal 8

Laporan Akhir Penelitian ini dibuat rangkap 5 (lima) dengan ketentuan sebagai berikut :

- 1 (satu) pada Perpustakaan Nasional
- 1 (satu) pada PDII (LIPI)
- 1 (satu) pada BAPENAS
- 1 (satu) perpustakaan perguruan tinggi
- 1 (satu) pada Lembaga Penelitian Unimed

Untuk surat perjanjian penggunaan dana (SP2D) ini diperbuat untuk diketahui dan dilaksanakan sebagaimana mestinya.



METERAI TEMPEL  
6000  
PIHAK KEDUA  
Ir. Hercules, MS  
NIP. 196210191988031004