

## INDUKSI MUTASI KULTUR *IN VITRO* *Amorphophallus muelleri* Blume DENGAN IRRADIASI GAMMA

YUYU S. POERBA<sup>1)</sup>, MARIA IMELDA<sup>2)</sup>, AIDA WULANSARI<sup>2)</sup> dan  
DIYAH MARTANTI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Peneliti di Pusat Biologi – LIPI

<sup>2)</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi - LIPI

Jl Raya Bogor Km 46.5 Cibinong Bogor 16911

### Abstract

*Amorphophallus muelleri* Blume (Araceae) is valued for its glucoman content for use in food industry (heathy diet food), paper industry, pharmacy and cosmetics. The cultivation of *A. muelleri* is hampered by limited genetic quality of seed. The species is triploid ( $2n=3x=39$ ), the seed is developed apomictically, and pollen production is low. The species is only propagated vegetatively. This may explain that the species is difficult to breed conventionally and genetic variability in the existing landraces cultivars is rather limited. Conservation of this species, therefore, is important for availability of the species in the future use of this plant. The objective of present research is to increase genetic variation by induce mutation using gamma-rays irradiation of shoot cultures of *A. muelleri* and to identify DNA polymorphism induced by gamma irradiation using random amplified polymorphic DNA (RAPD), so the mutants produced can be used for breeding purposes and for conservation program. Results of the experiment showed that gamma irradiation less than 5 gray was effective to induce mutation of *A. muelleri*. Four RAPD primers generated 35 scorable bands with 100% polymorphic bands. Size of the bands varied from 350bp to 2.0kbp. Clustering analysis was performed based on RAPD profiles using the UPGMA method. The range of genetic distance among individual genotypes was from from 0.00 to 0.72, while genetic variance of the population was  $0.21 + 0.13$ . The eighteen genotypes were proof to be mutants. The mutants produced in this experiment could be used as new germplasms for breeding purposes as well as for use in conservation strategy.

**Key words:** *Amorphophallus muelleri*, induced mutation, gamma-rays irradiation, RAPD

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Iles-iles (*Amorphophallus muelleri* Blume) adalah satu dari 27 jenis *Amorphophallus* di Indonesia dan dari 170 jenis yang dikenal di dunia<sup>10</sup>. *Amorphophallus muelleri* merupakan tanaman sumber karbohidrat alternatif

mengandung glukomanan tertinggi diantara jenis *Amorphophallus* lainnya di Indonesia<sup>13,27</sup>. Sebagian besar illes-iles Indonesia diekspor ke Jepang, yang membutuhkan illes-iles sedikitnya 3000 ton/tahun. Kebutuhan tersebut belum terpenuhi sehingga prospek

pengembangan dan peluang ekspor iles-iles ini masih cukup tinggi<sup>4)</sup>.

*Amorphophallus muelleri* secara alami merupakan tanaman tahunan dan memiliki kemampuan beregenerasi melalui *organ vegetatif* yaitu umbi atau potongan umbi, bulbil, dan secara generatif yaitu dengan biji. Tanaman ini merupakan tanaman *triploid* dengan kromosom dasar  $x = 131$ <sup>3)</sup>. Walaupun tanaman ini dapat bereproduksi melalui biji, tetapi biji yang dihasilkan adalah apomiksis, sehingga tanaman ini tidak mengalami rekombinasi genetik, dan keturunannya secara genetik identik dengan induk betinanya. Selain itu pollennya sedikit, kadang-kadang fertil. Dengan demikian perbaikan genetik tanaman ini tidak efektif dilakukan dengan pemuliaan konvensional. Salah satu alternatif dalam perbaikan genetik tanaman ini yaitu dengan induksi mutasi melalui kultur jaringan iles-iles. Radiasi gamma dapat digunakan untuk menginduksi mutasi sehingga tercipta keragaman genetik, yang selanjutnya dapat diseleksi untuk mendapatkan mutan yang diharapkan.

Kombinasi pemuliaan mutasi dan kultur *in vitro* (*in vitro mutagenesis*) telah terbukti membuat induksi dan seleksi mutasi somaklonal lebih efektif dan efisien<sup>1,2,7,9,15,16,17,25)</sup>. Metode ini memberikan beberapa keuntungan: (a) bahan tanaman dapat diperbanyak secara cepat untuk mendapatkan populasi yang cukup besar sebelum perlakuan; (b) meningkatnya frekuensi variasi somaklonal, (c) meningkatnya recovery sel-sel yang bermutasi dengan berkurangnya kompetisi somatik akibat dari modifikasi kondisi kultur, khususnya penggunaan zat pengatur tumbuh sitokinin dalam media, (d) meningkatnya efisiensi karena mempercepat produksi mutan sebagai akibat dari meningkatnya kecepatan perbanyakan dan jumlah generasi yang lebih besar per unit waktu dan tempat<sup>2)</sup>.

Salah satu faktor penentu keberhasilan mutagenesis secara *in vitro*

adalah keberhasilan teknik perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Imelda et al. (2007) telah melaporkan keberhasilan perbanyakan iles-iles secara *in vitro* sehingga dengan demikian aplikasi mutagen secara *in vitro* pada iles-iles sangat mungkin dilakukan.

Mutan hasil induksi mutasi pada berbagai tanaman dapat diidentifikasi dengan secara genetik dengan menggunakan berbagai marka molekuler termasuk *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)<sup>6,9,12,14,26)</sup>. RAPD merupakan metoda yang berdasarkan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan amplifikasi DNA yang menggunakan 'arbitrary primer' selama reaksi PCR. Produk PCR berupa sejumlah fragmen-fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda secara konvensional dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa yang diwarnai dengan etidium bromida. Metode ini sangat sederhana dan cepat. Dengan teknik ini dapat dibedakan ukuran fragmen DNA dengan mudah dan cepat, bahkan hanya dengan jumlah jaringan yang sedikit dan biasanya polimorfisme yang diperoleh relatif tinggi, tanpa perlu mengetahui sebelumnya sekuens DNA yang diamplifikasi<sup>30)</sup>. Williams et al.<sup>29)</sup> memperkenalkan penggunaan primer 10-mer (dekamer) yang mempunyai kegunaan umum pada teknik RAPD.

## 1.2. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk memperluas keragaman genetik dengan induksi mutasi pada kultur tunas *in vitro* *A. muelleri* dengan irradiasi gamma dalam rangka upaya konservasi dan pemuliaan *A. muelleri* mengidentifikasi genetik mutan *A. muelleri* dengan menggunakan marka *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Dengan meningkatnya keragaman genetik *A. muelleri*, upaya konservasi dan pemuliaan *A. muelleri* akan lebih efektif dan efisien.

## 2. METODOLOGI

### 2.1. Induksi Mutasi

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur tunas dan bakal tunas *A. muelleri* yang ditanam dalam media perbanyak tanaman sesuai dengan protokol yang telah dikembangkan<sup>11)</sup>. Media perbanyak tanaman yang digunakan yaitu adalah media dasar *Murashige and Skoog* (MS)<sup>19)</sup>, dengan sukrosa 30 g/l, 100 mg/l myo inositol, 4 mg/l thiamine HCl dan diberi zat pengatur tumbuh sitokinin thidiazuron (TDZ) 0.2 mg/l dan BA 0.5 g/l dalam media padat (gelrite 3 g/l), dengan pH medium sebelum ditambah gelrite 5.7-5.8. Medium disterilkan dalam otoklaf selama 20 menit dengan tekanan 15 psi. Setelah 6 minggu, kultur kemudian diperlakukan dengan berbagai dosis iradiasi gamma, sebagai berikut:

1. 0,5, 10, 15, dan 20 Gy
2. 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 Gy

Setiap perlakuan dilakukan terhadap 3 botol kultur, masing-masing mengandung 10-15 tunas dan sejumlah bakal tunas yang belum dapat dihitung. Setelah diradiasi tunas dan bakal tunas tersebut langsung dipindahkan ke media MS yang mengandung 1 mg/l BAP. Untuk menginduksi multiplikasi tunasnya, tunas hasil radiasi tadi disubkultur ke media MS<sup>19)</sup> yang dilengkapi dengan zat pengatur tumbuh *Benzyl Amino Purine* (BAP) sebanyak 1 mg/l. Setiap perlakuan dilakukan pada 10 eksplan. Semua kultur tersebut diinkubasikan dalam ruang ber-AC yang suhunya  $\pm 26^{\circ}\text{C}$  dan mendapat pencahayaan dari lampu TL 40 Watt selama 16 jam/hari. Subkultur ke media dengan komposisi serupa dilakukan setiap 4 minggu.

Proses aklimatisasi dilakukan bertahap sesuai dengan jumlah tanaman hasil radiasi yang tersedia dan siap untuk dikeluarkan. Planlet yang sudah cukup besar dan berakar banyak dibersihkan dari sisa-sisa agar dengan menambahkan air ke dalam botol kultur sehingga tidak banyak akar yang rusak. Selanjutnya akar planlet

tersebut dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas tisu, kemudian ditaburi Rootone agar cepat membentuk akar baru. Setelah itu ditanam dalam pot berisi berbagai media (pasir, kompos, tanah + kompos, tanah + kompos + sekam, tanah + kompos + pakis)

Selanjutnya pot-pot tersebut disiram sampai jenuh lalu disungkup dengan kantong plastik transparan selama 2 minggu sampai muncul daun baru. Pot-pot tersebut selanjutnya ditempatkan dalam kamar kaca.

### 2.2. Identifikasi genetik hasil induksi

#### 2.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah 18 sampel terseleksi '*putative mutant*' hasil induksi mutasi kultur tunas dan bakal tunas *A. muelleri* dengan iradiasi gamma (0, 1, 2, 3, 4 dan 5) Gy dan 2 sampel kontrol.

#### 2.2.1. Ekstraksi DNA

Protokol ekstraksi dan isolasi DNA genom *A. muelleri* dilakukan berdasarkan metoda CTAB<sup>8)</sup> (Delaporta *et al.*, 1983) yang dimodifikasi<sup>24)</sup>. Kuantitas setiap DNA hasil isolasi diukur dengan Fluorometer (Shimadzu UV1201), sedangkan kualitasnya dilihat pada gel elektroforesis 0.8%. Hasil ekstraksi DNA yang menghasilkan jumlah dan kualitas DNA yang cukup baik, dilanjutkan dengan PCR.

#### 2.2.2. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode Williams *et al.*<sup>29)</sup>. PCR dilakukan pada total volume 15  $\mu\text{l}$ . Masing-masing tabung PCR berisi 0.2 nM dNTPs; 1.5  $\mu\text{l}$  bufer reaksi; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 10 ng DNA sample; 5 pmole primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega). Primer yang digunakan yaitu empat primer dari Operon Technology: OPB-17, OPC-07, OPN-18E dan OPU-03.

Reaksi PCR dengan menggunakan *Thermocycler* (Takara) selama 45 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 94<sup>o</sup>C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45

siklus yang terdiri atas denaturasi 1 menit pada suhu 94°C, annealing 1 menit pada suhu 36°C, dan 2 menit ekstensi pada suhu 72°C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti 4 menit pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 4°C selama 30 menit. Hasil amplifikasi difraksinasi secara elektroforesis dengan menggunakan *Mupid Mini Cell* pada gel agarosa 2.0% dalam bufer TEA (Tris-EDTA) selama 60 menit pada 50 V. Kemudian direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi akhir 1µg/l/ml selama 10 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA dideteksi dan difoto menggunakan *Gel documentation system*. Sebagai standar digunakan DNA marker (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

### 2.2.3. Analisis data

Karena RAPD merupakan marka yang dominan, maka setiap pita RAPD dianggap sebagai satu lokus putatif biallel<sup>29</sup>. Hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk *scoring*: ada (1) dan kosong (0). Profil pita hasil amplifikasi dengan marka RAPD dibandingkan antara kontrol dan genotipe hasil mutasi. Matriks binari fenotipe RAPD ini kemudian disusun untuk digunakan pada berbagai analisis genetik. Matrik jarak genetik antar populasi

dihitung dengan menggunakan Nei's unbiased genetic distances<sup>21</sup>) dengan program POPGENE<sup>31</sup>). Phylogram yang dihasilkan dari analisis dilihat menggunakan program TREEVIEW<sup>22</sup>).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Induksi mutasi

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa dalam waktu 1-2 minggu setelah radiasi dengan dosis (5, 10, 15 dan 20 gray). umumnya tunas *in vitro* tersebut masih hijau. Namun, secara perlahan terjadi perubahan warna daun, yang semula hijau menjadi kuning-hijau, kemudian berubah menjadi coklat dan akhirnya menjadi coklat-hitam dan mati. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hingga dosis 20 gray, *A. muelleri* tidak dapat bertahan hidup. Olehkarenanya dosis radiasi gamma yang lebih rendah kemudian dicoba dengan dosis radiasi lebih rendah yaitu 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 Gy.

Dibandingkan dengan tunas yang tidak diradiasi, tunas *in vitro* hasil radiasi sinar gamma pertumbuhannya agak lambat, namun ternyata daya multiplikasi tunas tidak berkurang kecuali pada dosis 1 gray yang daya multiplikasinya hanya 1,73 (Tabel 1). Setelah tiga kali subkultur, plantlet yang bertahan hidup diaklimatisasi.

Tabel 1. Multiplikasi tunas *Amorphophallus muelleri* Blume hasil radiasi sinar gamma

Dosis radiasi (Gray)	Eksplan	Jumlah tunas		Daya Multiplikasi
		Sebelum radiasi	Setelah radiasi*)	
1	Mata tunas	22	38	1,73
2	Petiole	28	109	3,89
3	Petiole	35	183	5,23
4	Petiole	34	199	5,85
5	Petiole	26	80	3,08
	Mata tunas	13	90	6,92

Keterangan \* = 2 bulan setelah radiasi

Pengamatan yang dilakukan sampai umur 3 bulan setelah aklimatisasi menunjukkan bahwa sejumlah tanaman mutant teridentifikasi secara fenotipik. Mutant yang diamati terutama mutasi klorofil pada daun seperti albino, white streak atau daun variegata, terutama pada dosis 4 gray. Kondisi ini dimungkinkan karena adanya penurunan kemampuan sekumpulan sel pada daerah meristem akibat perubahan struktur DNA atau kerusakan DNA.

Mutagenesis dengan iradiasi sinar gamma dapat mengakibatkan mutasi fenotipik yang berat, bahkan menyebabkan kematian tanaman karena mutasi yang terjadi menyebabkan *large-scale deletions*, dan kadang-kadang rekonstitusi kromosom, seperti pada dosis radiasi gamma yang relatif tinggi<sup>18,20,26,28</sup>). Sedangkan pada dosis sinar gamma yang rendah dapat menyebabkan efek rangsang tumbuh, jadi walaupun mengalami *deletion*, tanaman masih bertahan hidup<sup>28</sup>). Fenomena ini juga terjadi pada tanaman *Curcuma zedoaria* yang diradiasi dengan gamma<sup>23</sup>).

### 3.2. Identifikasi genetik hasil induksi mutasi

#### Profil RAPD

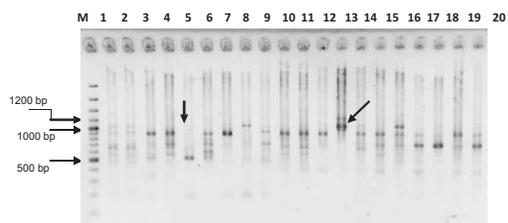
Hasil amplifikasi total genom DNA dengan menggunakan empat primer RAPD pada 20 sampel *A. muelleri* hasil induksi mutasi menghasilkan produk PCR yang dapat dibaca dan diskor, sehingga hasilnya dapat dianalisis (Gambar 1). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa diperoleh 35 fragmen DNA yang berukuran dari 350bp hingga 2.0 kb, yang semuanya (100%) merupakan pita polimorfik. Kelima primer menghasilkan 7-11 pita DNA yang dapat dideteksi dan diskor. Jumlah maksimum pita polimorfik 11 terdapat pada primer OPN-18E (Tabel 2).

Tabel 2. Primer yang digunakan dan jumlah pita DNA hasil amplifikasi dan tingkat polimorfisme pada 20 sampel mutan *Amorphophallus muelleri* Blume

Primer	Urutan basa 5' - 3'	Jumlah Pita	Pita polimorfik
OPB-17	AGGGAACGAG	7	7
OPC-07	CACACTCCAG	8	8
OPU-03	CTATGCCGAC	9	9
OPN-18E	AAGGTGAGTCA	11	11
	Jumlah	35	35 (100%)

Hasil penelitian identifikasi genetik pada genotip hasil *irradiasi* gamma menunjukkan adanya perubahan pola pita DNA seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Beberapa pita DNA tidak muncul pada genotipe hasil mutasi (OPB-171000), yang menunjukkan adanya *deletion*. Hal ini juga dilaporkan beberapa peneliti<sup>18,20,28</sup>) dimana mutagenesis dengan iradiasi sinar gamma dapat menyebabkan *deletions* dan rekonstitusi kromosom.

Hasil pengamatan juga menunjukkan adanya pita DNA baru pada genotipe hasil induksi mutasi (OPB1200), sedangkan pada kontrol pita DNA tersebut tidak muncul. Hilangnya atau munculnya pita DNA pada genotipe hasil radiasi juga terjadi pada *mutan Curcuma zedoaria*<sup>23</sup>).



Gambar 1. Produk PCR *Amorphophallus muelleri* Blume hasil induksi mutasi dengan iradiasi gamma dengan menggunakan primer OPB-17

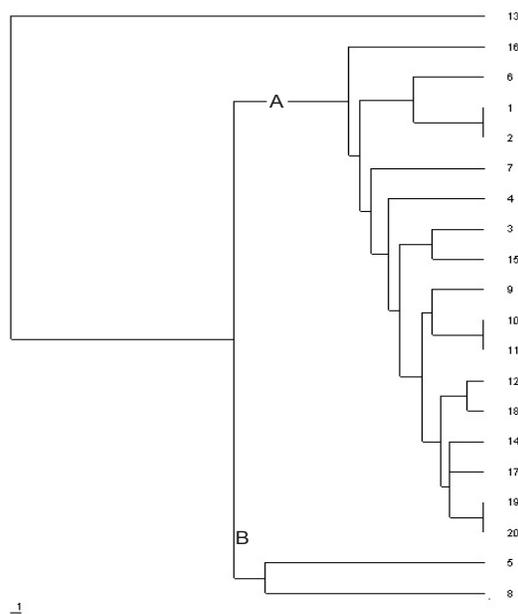
Keterangan: M = DNA marker (*GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Fermentas*), 1-2 = Kontrol; 3-5 = 1 Gy; 6-8= 2 Gy, 8-11= 3 Gy, 12-15= 4 Gy, 16-20= 5Gy

↓ = pita yang tidak muncul, ↘ = pita baru yang muncul

### Analisis kluster

Phylogram UPGMA (Gambar 2) menunjukkan hubungan genetik diantara individu berdasarkan matrik jarak genetik Nei<sup>(23)</sup>. Individu 13 terpisah dari seluruh sampel yang diuji. Individu 13 merupakan genotipe yang paling berbeda diantara genotipe-genotipe lainnya. Sedangkan sisanya terbagi kedalam dua kluster yaitu kluster A yang terdiri atas beberapa subkluster dan kluster B yang terdiri atas 2 genotipe (individu 6 dan 8), yang menunjukkan kesamaan properti genetik antar kedua individu tersebut.

Matrik jarak genetik (Nei)<sup>(23)</sup> antar individu terlihat pada Tabel 2. Nilai jarak genetik terbesar (0.72) terdapat antara individu 13 dan 20, sedangkan terkecil terdapat antara individu 1 dan 2 (kontrol), 10 dan 11, 19 dan 20 (0.0) (Tabel 2). Sedangkan nilai variabilitas genetik (Nei)<sup>(23)</sup> populasi yang diuji ini adalah  $0.21 + 0.13$ .



Gambar 2. Phylogram 20 sampel *Amorphophallus muelleri* Blume hasil induksi mutasi

Keterangan : 1-2 = Kontrol; 3-5 = 1 Gy; 6-8 = 2 Gy, 8-11 = 3 Gy, 12-15 = 4 Gy, 16-20 = 5Gy

Sinar gamma sangat berperan dalam menginduksi perubahan genetik dalam DNA pada berbagai tanaman<sup>(5)</sup>. Mutagenesis dengan iradiasi sinar gamma dapat mengakibatkan mutasi fenotipik yang berat karena mutasi yang terjadi menyebabkan *large-scale deletions*, dan kadang-kadang rekonstitusi kromosom<sup>(18,20,28)</sup>. Irradiasi gamma juga dapat meningkatkan pembentukan patahan DNA<sup>(18)</sup>. Perubahan yang terutama yang teramati pada profil RAPD yaitu munculnya atau tidak munculnya pita DNA dengan berbagai variasi, juga berbagai intensitasnya. Pengaruh ini mungkin berkorelasi dengan perubahan struktur dalam DNA yang disebabkan oleh berbagai macam kerusakan DNA. Variasi dalam intensitas pita DNA dan hilangnya beberapa pita DNA mungkin berkorelasi dengan tingkat fotoproduk dalam DNA template setelah perlakuan radiasi, yang dapat menurunkan jumlah binding sites untuk *Taq polymerase*<sup>(26)</sup>. Pada penelitian ini hilangnya pita DNA lebih banyak terjadi dibandingkan dengan munculnya pita DNA yang baru.

Penampilan pita DNA yang baru akibat induksi mutasi dapat dijelaskan sebagai akibat perubahan struktur DNA (patahan, transposisi atau delesi)<sup>(26)</sup>. Irradiasi gamma dapat menyebabkan perubahan kimia, terlepasnya fosfat dan/atau basa pada kompleks DNA, yang mempengaruhi molekul DNA secara keseluruhan, bahkan apabila deoxyribose yang terkena perubahan, akan menimbulkan patahnya/rusakannya double helix, sehingga menyebabkan patahnya rantai molekul DNA<sup>(3)</sup>. Pada penelitian ini adanya pita DNA yang muncul pada genotipe hasil radiasi terbatas pada beberapa genotipe secara acak, namun tidak terkonsentrasi pada dosis radiasi tertentu atau dosis radiasi yang lebih tinggi.

Dalam assay RAPD, fragment DNA yang diamplifikasi sangat tergantung atas sekuens primer dan atas sekuens pada genom DNA. Primer yang hanya berbeda satu nukleotida menghasilkan profil RAPD

yang berbeda pula. Olehkarenanya, teknik RAPD ini dapat mendeteksi perubahan satu basa dalam DNA genom jika digunakan cukup primer. Dalam penelitian ini, primer RAPD yang polimorfik sangat efektif digunakan untuk seleksi genotipe mutant *A. muelleri*. Seleksi yang dibantu marka molekuler ini membantu efisiensi seleksi dengan memungkinkannya dilakukan seleksi pada tahap awal, dan mengurangi ukuran populasi tanaman yang akan diseleksi<sup>14</sup>).

Analisis kluster pada 20 sampel *A. muelleri* hasil induksi mutasi menunjukkan pemisahan sampel ke dalam dua kluster dan satu individu yang terpisah menunjukkan adanya variasi genetik antara individu yang diuji. Pendugaan pertama adalah lokus polimorfik yang digunakan dalam analisis ini sudah dipilih yang memiliki polimorfisme yang tinggi. Selain itu, telah terjadi perubahan genetik yang terjadi akibat perlakuan radiasi, seperti juga terlihat pada profil pita DNA diatas (Gambar 1).

Populasi genotipe hasil mutasi ini memiliki nilai keragaman genetik yang lebih tinggi ( $0.21 + 0.13$ ) bila dibandingkan dengan populasi alami yang ada di Saradan yang merupakan populasi yang memiliki nilai keragaman genetik tertinggi di Jawa yaitu  $0.18+0.20$  (Poerba dan Martanti, *in press*). Hal ini mengindikasikan bahwa populasi *A. muelleri* hasil induksi mutasi dengan irradiasi gamma ini terdiri atas individu yang sangat bervariasi. Demikian pula dengan nilai jarak genetik antar individu ( $0.00 - 0.72$ ) mengindikasikan variasi genetik *A. muelleri* hasil radiasi gamma lebih tinggi apabila dibandingkan dengan individu yang berasal dari habitat alaminya ( $0.02 - 0.36$ ) (Poerba dan Martanti, *in press*).

Namun demikian, analisis lebih mendalam diperlukan dengan menggunakan aksesori dari populasi induksi mutasi dan dengan menggunakan primer yang lebih banyak untuk membuktikan hasil ini. Karena tanaman ini merupakan triploid apomiksis, populasi hasil induksi radiasi gamma ini memberikan

harapan dalam meningkatkan keragaman genetik *A. muelleri* yang terbatas. Dengan meningkatnya keragaman genetik *A. muelleri* program pemuliaan dan upaya konservasi tanaman ini akan lebih efektif dan efisien.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil irradiasi gamma kultur tunas *A. muelleri* menunjukkan bahwa dosis irradiasi gamma yang efektif digunakan untuk menginduksi mutasi adalah dibawah 5 gray. Genotipe hasil induksi mutasi terbukti merupakan genotipe mutant setelah diidentifikasi dengan adanya perubahan dalam pita DNA yang diamati dengan analisa molekuler dengan marka RAPD. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa diperoleh 35 fragmen DNA yang berukuran dari 350bp hingga 2.0 kb, yang semuanya (100%) merupakan pita polimorfik. Nilai jarak genetik antara genotipe *A. muelleri* yang diuji berkisar antara 0.00 hingga 0.72, sedangkan variasi genetik dari populasi ini adalah  $0.21 + 0.13$ .

Dengan diperolehnya populasi mutant *A. muelleri* yang bervariasi ini artinya keragaman genetik plasma nutfah *A. muelleri* meningkat dan menjadikan seleksi untuk mendapatkan kultivar baru akan lebih efektif dan efisien. Demikian pula upaya konservasi dan pembudidayaan *A. muelleri* dapat dilakukan secara efisien dan efektif dengan meningkatnya keragaman genetik *A. muelleri*. Seyogyanya seleksi terhadap populasi mutant ini dilanjutkan baik pada karakter agronomis maupun kualitas umbinya.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Proyek Kompetitif Sub Program Domestikasi Flora dan Fauna Indonesia, LIPI tahun 2006-2008. Penulis berterimakasih atas bantuan Sdri Atisha Novandini dalam penelitian ini.

Tabel 2. Matrik jarak genetik (Nei, 1978) pada 20 sampel *Amorphophallus muelleri* Blume hasil induksi mutasi dengan irradiasi gamma

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	***																			
2	0	***																		
3	0.2	0.2	***																	
4	0.17	0.17	0.2	***																
5	0.34	0.34	0.31	0.34	***															
6	0.11	0.11	0.14	0.17	0.34	***														
7	0.23	0.23	0.2	0.23	0.34	0.23	***													
8	0.37	0.37	0.46	0.37	0.31	0.49	0.31	***												
9	0.23	0.23	0.2	0.17	0.23	0.23	0.23	0.31	***											
10	0.14	0.14	0.17	0.14	0.31	0.2	0.2	0.34	0.09	***										
11	0.14	0.14	0.17	0.14	0.31	0.2	0.2	0.34	0.09	0	***									
12	0.2	0.2	0.17	0.14	0.26	0.2	0.14	0.4	0.14	0.11	0.11	***								
13	0.57	0.57	0.6	0.57	0.51	0.63	0.63	0.6	0.57	0.6	0.6	0.49	***							
14	0.17	0.17	0.2	0.17	0.34	0.23	0.17	0.37	0.11	0.09	0.09	0.09	0.6	***						
15	0.11	0.11	0.09	0.11	0.23	0.11	0.11	0.37	0.11	0.09	0.09	0.09	0.51	0.11	***					
16	0.23	0.23	0.2	0.23	0.34	0.29	0.29	0.37	0.17	0.2	0.2	0.2	0.57	0.17	0.17	***				
17	0.23	0.23	0.2	0.11	0.34	0.23	0.17	0.37	0.11	0.09	0.09	0.09	0.4	0.06	0.11	0.23	***			
18	0.17	0.17	0.14	0.11	0.29	0.17	0.11	0.37	0.11	0.09	0.09	0.03	0.57	0.06	0.06	0.17	0.06	***		
19	0.23	0.23	0.14	0.17	0.34	0.23	0.17	0.43	0.11	0.09	0.09	0.09	0.51	0.06	0.11	0.17	0.06	0.06	***	
20	0.26	0.2	0.15	0.19	0.42	0.26	0.19	0.56	0.12	0.09	0.09	0.09	0.72	0.06	0.12	0.19	0.06	0.06	0	***

Keterangan: 1-2 = Kontrol; 3-5 = 1 Gy; 6-8 = 2 Gy; 8-11 = 3 Gy; 12-15 = 4 Gy; 16-20 = 5Gy

## DAFTAR PUSTAKA

1. Abdel-Hady, M.S., and Ali. 2006. *Effects of Gamma Irradiation on Wheat Immature Culture Regenerated Plants*. Journal of Applied Sciences Research 2(6):310-316.
2. Ahloowalia, B., 1995. *In vitro Mutagenesis for the Improvement of Vegetatively Propagated Plants*. In: *Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement*. Proceedings of International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. Staff of the IAEA (Editor). Internatioal Atomic Energy Agency, Vienna, 531-541.
3. Ahnström, G., 1977. *Radiobiology*. In: *Manual on Mutation Breeding*. Technical Reports Series No 119. IAEA, Vienna. P. 21-27.
4. Anonimus. 2001. *Tanaman iles-iles bernilai ekspor tinggi*. Suara Merdeka, Kamis, 22 Nopember 2001.
5. Azer, S.A., 2001. *Radio-sensitivity of some wheat cultivars irradiated with gamma rays*. Annals Agric. Sci. Ain Shams Univ., Cairo 46(2): 663-679.
6. Barcaccia, G., S. Tavoletti, M. Pezotti, M. Falcecinelli and F. Veronesi. 1994. *Fingerprinting of alfalfa meiotic mutants using RAPD markers*. Euphytica 80:19-25.
7. Das, A., Gossa, S.S., Sindhu, J.S., and Dhaliwal, H.S.,. 2000. *Induced mutations for heat tolerance in potato by using in vitro culture and radiation*. Euphytica 114, 205-209.
8. Delaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., 1983. *A plant DNA minipreparation*. Version II. Plant Molecular Biology Reporter 4:19-21.
9. Hautea, D.M., Molina, G.C., Balatero, C.H., Coronado, N.B., Perez, E.B., Alvarez, M.T.H., Camara, A.O., Akuba, R.H., Quilloy, R.B., Frankie, R.B., and Caspillo, C.S., 2002. *Analysis of induced mutants of Phillipine bananas with molecular markers*. In: *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations*. Science Publishers, Inc. Jain, M. and R. Swennen (Editor). Enfield (NH) USA, Plymouth, UK.45-57.
10. Hettterscheid, W., And Ittenbach, S., 1996. *Everything you always wanted to know about Amorphophallus, but were afraid to stick your nose into !!!*. Aroideana 19:7-131.
11. Imelda, M., Wulansari, A., dan Poerba, Y.S., 2007. *Mikropropagasi tanaman iles-iles (Amorphophallus muelleri Blume)*. Berita Biologi 8:271-278.
12. Ishak. 1998. *Identifikasi keragaman DNA genom mutan padi Atomita-2 dan tetuanya menggunakan RAPD marker*. Zuriat 9(2): 91-99.
13. Jansen, P.C.M., van der Wilk, C., & Hettterscheid, W.L.A., 1996. *Amorphophallus Blume ex Decaisne*. In: *Plant Resource of South East Asia, No 9, Plant Yielding non-seed carbohydrates*. Flach M dan Rumawas, F (Editor). Prosea, Bogor, Indonesia. 46-50.
14. Khawale, R.N., Yerramili, V., and Singh, S.K. 2007. *Molecular marker-assisted selection of in vitro chemical mutagen-induced grapevine mutants*. Current Science 92(8):1056-1060.
15. Lee, I.S., Kim, D.S., Hyun, D.Y., Lee, S.J., Song, H.S., Lim, Y.P., and Lee, Y.I.. 2003. *Isolation of gamma-induced rice mutants with increased tolerance to salt by anther culture*. Journal of Plant Biotechnology 5: 51-57.
16. Lee, Y.I., Lee, I.S., Lim, Y.P., 2002. *Variations in sweetpotato regenerates from gamma-ray irradiated embryogenic callus*. J. Plant Biotechnol 4:163-170.

17. Maluszynski, M., 1990. *Induced Mutation an Integrating Tool. In: Gene Manipulation in Plant Improvement.* J.P. Gustafson (Editor). Plenum Press, New York and London.
18. Matsukura, C., Yamaguchi, I., Inamura, M., Ban, Y., Kobayashi, Y., Yong-gen, Y., Saito, T., Kuwata, C., Imanishi, S., and Nishimura, S., 2007. *Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (Solanum lycopersicum L.) cultivar 'Micro-Tom'.* Plant Biotechnology 24:39–44.
19. Murashige, T., and Skoog, F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.* Physiology Plantarum 5:473-497.
20. Naito, K., Kusaba, M., Shikazono, N., Takano, T., Tanaka, A., Tanisaka, T., and Bishimura, M., 2005. *Transmissible and nontransmissible mutations induced by  $\gamma$ -rays and carbon ions.* Genetics 169:881-889.
21. Nei, M., 1978. *Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small numbers of individuals.* Genetics 89:583-590.
22. Page, RDM., 1996. *TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers.* Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
23. Poerba, Y.S., 2007. *Identifikasi genetik Curcuma zedoaria hasil induksi mutasi.* Laporan Teknik Pusat Penelitian Biologi – LIPI. Tidak diterbitkan.
24. Poerba, Y.S., dan Yuzammi. 2008. *Pendugaaan keragaman genetik Amorphophallus titanum Becc. dengan marka Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).* Biodiversitas 9(2):103-107.
25. Saleem, M.Y., Muhktar, Z., Cheema, A.A., and Atta, B.M., 2005. *Induced mutation and in vitro techniques as a method to induced salt tolerance in Basmati rice (Oryza sativa L.).* Int J Environ Sci Tech 2:141-145.
26. Selvi B.S., Ponnuswami, V., and Sumathi, T., 2007. *Identification of DNA polymorphism induced by gamma rays irradiation in Amla (Emblica officinalis Gaertn.) grafts of V1M1 and V2M1 generation.* Journal of Applied Science Research 3(12):1933-1935.
27. Sumarwoto. 2004. *Beberapa Aspek Agronomi Iles-iles (Amorphophallus muelleri Blume).* Disertasi Doktor. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. 150 h.
28. Vizir, I.Y., and Mulligan, B.J., 1999. *Genetics of gamma-irradiation-induced mutation in Arabidopsis thaliana: Large chromosomal deletions can be rescued through the fertilization of diploid eggs.* The American Genetic Association 90:412-417.
29. Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalsky, J.A., and Tingev, S.V., 1990. *DNA plolymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.* Nucl. Acid Res. 18(22):6531-6535.
30. Wolff, K., 1996. *RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum.* Euphytica 89: 159-164.
31. Yeh, F.C., Yang, R.C., and Boyle, T., 1999. *Popgene Version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis.* Available at: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>.