

Seleksi *In Vitro* Mutan Alfalfa Hasil Iradiasi Sinar Gamma pada Cekaman Asam

In Vitro Selection of Mutants Alfalfa Result in Gamma-Ray Irradiation in Acid Stress

Desima Natalia Harianja*, Panca Dewi Manu Hara Karti, Iwan Prihantoro

Department Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16689 Jawa Barat

*Email korespondensi: desimaharianja7@gmail.com

(Diterima 01-07-2021; disetujui 28-11-2021)

ABSTRAK

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) telah digunakan sebagai makanan ternak yang efektif dan bergizi. Kondisi cekaman asam membatasi pertumbuhan dan produksi alfalfa dalam banyak sistem budidaya. Perbaikan genetik melalui iradiasi sinar gamma dan seleksinya dengan AlCl_3^{3+} dihasilkan keragaman genetik toleran cekaman asam. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik mutan alfalfa hasil iradiasi sinar gamma yang diberi AlCl_3^{3+} sebagai simulasi cekaman asam. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial. Faktor pertama adalah dosis iradiasi sinar gamma yaitu 0Gy, 100Gy, 200Gy, 300Gy, 400Gy dan 500Gy. Faktor kedua adalah level AlCl_3^{3+} yaitu 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm dan 500ppm. Variabel yang diamati meliputi viabilitas, tinggi vertikal, jumlah daun, kelayuan daun, penyusutan media, bobot basah, warna daun dan perubahan pH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mutan alfalfa teriradiasi sinar gamma memberikan karakteristik terbaik dibanding alfalfa tanpa iradiasi sinar gamma terhadap peningkatan level AlCl_3^{3+} . Hingga abang batas tertentu peningkatan dosis sinar gamma dapat meningkatkan pertumbuhan dan ketahanan alfalfa pada kondisi tercekam asam. Dapat di simpulkan bahwa induksi mutasi dengan iradiasi sinar gamma dapat dihasilkan mutan alfalfa yang tahan pada kondisi tercekam asam hingga level AlCl_3^{3+} 500ppm, dengan dosis iradiasi sinar gamma terbaik pada dosis 400Gy.

Kata Kunci: alfalfa, sinar gamma, alcl^{3+} , in vitro

ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) has been used as an effective and nutritious animal feed. Acid stress conditions limit alfalfa growth and production in many cultivation systems. Genetic improvement through gamma-ray irradiation and its selection with AlCl_3^{3+} resulted in acid stress-tolerant genetic diversity. This study aims to determine the characteristics of alfalfa mutants resulting from gamma irradiation given AlCl_3^{3+} as a simulation of acid stress. The design used in this study was a completely randomized design (CRD) with a factorial pattern. The first factor is the gamma-ray irradiation dose, namely 0Gy, 100Gy, 200Gy, 300Gy, 400Gy, and 500Gy. The second factor is the level of AlCl_3^{3+} , namely 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm and 500ppm. The variables observed included viability, vertical height, number of leaves, leaf wilting, media shrinkage, wet weight, leaf color, and changes in pH. The results showed that the alfalfa mutant irradiated with gamma rays gave the best characteristics compared to alfalfa without gamma irradiation to increase the level of AlCl_3^{3+} . Up to a certain threshold, increasing the dose of gamma rays can increase the growth and resistance of alfalfa under acid stress conditions. It can be concluded that mutation induction with gamma-ray irradiation can produce alfalfa mutants that are resistant to acid stress

Keywords: alfalfa, gamma rays, alcl^{3+} , invitro



PENDAHULUAN

Hijauan adalah salah satu tanaman yang paling penting bagi umat manusia, meskipun buah, sayuran, dan biji-bijian yang dipanen lebih dikenal secara luas oleh masyarakat. Dua jenis hijauan pakan yang umum digunakan yaitu rumput-rumputan dan leguminosa (kacang-kacangan). Legum hijauan memiliki keunggulan dalam fixasi N² melalui simbiosis dengan berbagai spesies Rhizobia dan cenderung lebih tinggi konsentrasi proteinnya dibandingkan rumput-rumputan (Putnam & Orloff, 2014).

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) adalah legum hijauan terpenting di dunia dan sering disebut 'Ratu hijauan' karena adaptasinya yang luas, hasil yang tinggi, dan kualitas yang tinggi, serta kandungan nutrisi yang tinggi seperti protein, vitamin, dan mineral. Tanah pH netral dan drainase baik menjadi kondisi paling baik untuk alfalfa beradaptasi. pH tanah merupakan faktor pembatas utama budidaya alfalfa. pH tanah 6,5-7.5 dianggap ideal untuk menumbuhkan alfalfa di tanah asam. Daerah dengan curah hujan tinggi sering memiliki perbedaan budidaya alfalfa karena tanah jenuh dan pH rendah (Kumar, 2011; Putnam & Orloff, 2014). Keasaman tanah menentukan ketersediaan unsur mineral seperti fosfor (P) dan unsur-unsur-unsur beracun seperti aluminium (Al), mangan (Mn), dan besi (Fe). Tingkat keasaman juga menjadi faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan dan produksi mutan legum pada banyak sistem pertanian, mengurangi ketersediaan P dan meningkatkan kandungan Al yang mengakibatkan berkurangnya fiksasi nitrogen.

Pemuliaan dan produksi mutan hijauan yang lebih baik dapat dilakukan dengan induksi mutasi. Pemuliaan mutasi berguna dalam memperbaiki beberapa sifat mutan tanpa merubah bagian besar sifat tetua. Metode pemuliaan dengan mutasi induksi efektif untuk memperbaiki satu atau beberapa sifat yang tidak menguntungkan (Harsanti & Yulindar, 2015). Mutasi spontan melalui iradiasi sinar gamma telah dihasilkan kandidat mutan alfalfa. Sinar gamma merupakan sinar elektromagnetik berenergi tinggi yang dapat merusak sel mutan, sehingga terjadi perubahan susunan gen didalam jaringan. Perubahan genetik mutan dapat terlihat dari penampilan sifat mutan yang berbeda (mutan) (Astutik, 2009).

Seleksi *in vitro* menggunakan AlCl³⁺ sebagai simulasi cekaman asam diharapkan dapat menghasilkan keragaman genetik toleran dengan produksi yang tetap tinggi pada kondisi tercekam asam. Cekaman asam dengan menambahkan unsur

Al dapat diberikan dalam bentuk AlCl³.6H²O atau garam mineral lainnya (Yusnita, 2015). Metoda seleksi *in vitro* merupakan salah satu cara seleksi yang lebih efektif karena dapat dilakukan pada tingkat sel, dan dalam populasi yang besar sehingga dapat diperoleh kandidat somaklon yang tahan dalam jumlah yang banyak (Lestari *et al.*, 2006). Keragaman genetik yang terjadi secara spontan disebabkan oleh terjadinya mutasi, rekombinasi, dan migrasi gen. Mutasi spontan ialah mutasi yang terjadi secara alami yang berhubungan dengan proses replikasi DNA, yaitu kesalahan dalam replikasi DNA, kerusakan DNA, kesalahan saat pembelahan sel, perubahan tautomerik, dan perpindahan materi genetik atau elemen loncat (Devy & Sastra, 2006). Berdasarkan latar belakang tersebut dilakukan penelitian untuk mendapatkan varian somaklonal mutan alfalfa toleran cekaman asam dengan pertumbuhan yang tetap tinggi.

MATERI DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama dalam penelitian yang digunakan merupakan Mutan alfalfa (*Medicago sativa* L.) hasil seleksi iradiasi sinar gamma di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, MS (Murashige Skoog), biji alfalfa, agar, gula, NaOH 2%, TDZ (Thidiazuron), aquades dan AlCl³⁺ (Aluminium chloride). Alat penelitian yang digunakan meliputi aluminium foil, autoklaf, beaker glass, botol selai, botol kultur, cawan petri, gunting, kompor, laminar air flow, labu Erlenmeyer, magnetic stirrer, munsell Color Chart, neraca Ohaus Digital, pembakar spiritus, penggaris, pipet tetes, pipet ukur, pinset, scalpel, spatula sendok, spon dan timbangan analitik.

Prosedur penelitian

Mutan alfalfa hasil iradiasi sinar gamma di multiplikasi dengan teknik subkultur di dalam laminar air flow. Botol kultur berisi 1-2 mutan. Dosis 0Gy (kontrol) didapatkan dengan menanam biji pada media kultur (MS0). Lama multiplikasi berlangsung selama ±2 bulan. Pembuatan media asam terdiri dari MS 4.43 g l⁻¹, agar 7 g l⁻¹, gula 30 g l⁻¹, NaOH 2% 0,2 ml, TDZ 0,2 ml dan AlCl³⁺ dengan level 100ppm (pH 3,8) 200ppm (pH 2,9), 300ppm (pH 2,8), 400ppm (pH 2,7) dan 500ppm (pH 2,5). Pengukuran pH media dilakukan sebelum pemanasan dengan pH meter. Semua bahan di campur ke dalam beaker glass dengan aquades hingga 1000ml, dan dipanaskan dengan magnetic stirrer dengan suhu 380°C dan putaran 250 rpm.

Botol kultur diisi ±10 ml dan di tutup dengan aluminium foil. Botol kultur dan alat yang digunakan selama penelitian di sterilisasi dengan suhu 121°C dan tekanan 17.5 psi selama 15 menit menggunakan autoklaf. Mutan alfalfa yang tidak kontaminasi pada tahap multiplikasi di tanam ke media $AlCl_3^{3+}$ sesuai level perlakuan. Setiap botol berisi satu mutan alfalfa yang ditanam dengan bantuan spon untuk berdiri tegak. Pertumbuhan di amati selama ±2 bulan didalam ruang kultur jaringan dengan suhu ± 25°C, pencahayaan selama 16 jam dan intensitas cahaya 700 Lux cahaya putih.

Rancangan percobaan

Rancangan yang digunakan dalam penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan faktor pertama adalah dosis sinar gamma (0 Gy, 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy, 400 Gy, dan 500 Gy) dan faktor kedua adalah level $AlCl_3^{3+}$ (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm) pada tahap pertama.

Parameter penelitian

Evaluasi karakteristik pada cekaman asam meliputi viabilitas, tinggi vertikal, jumlah daun, kelayuan daun, penyusutan media, bobot basah, warna daun dan perubahan pH.

Analisi data

Data analisis menggunakan analisis ragam (ANOVA), selanjutnya jika terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas

Viabilitas menggambarkan kemampuan tanaman dalam beradaptasi dan bertahan hidup terhadap lingkungan, utamanya dalam merespon lingkungan abiotik dan biotik (Tabel 1). Viabilitas mutan menurun seiring bertambahnya level $AlCl_3^{3+}$, dengan nilai terendah pada dosis 0Gy (tanpa iradiasi sinar gamma) pada level 500ppm dan tertinggi pada dosis 300Gy dan 400Gy pada level 100ppm. Perubahan viabilitas mutan terhadap penambahan level cekaman hingga 500ppm menunjukkan adanya upaya mutan dalam beradaptasi dan bertahan hidup. **Perubahan** genetik yang terjadi pada kondisi cekaman asam menunjukkan adanya adaptasi dan toleransi. Induksi mutasi oleh iradiasi sinar gamma membentuk genetik dalam bertahan dan tumbuh pada kondisi di luar kondisi optimal. Mutasi mengakibatkan perubahan genetik pada

urutan basa nukleoida (DNA) yang mengalami perubahan susunan asam amino dan merubah pola protein (Havidzati, 2017). Kondisi cekaman tinggi Al mempengaruhi mutan dalam menyerap nutrisi dan air di media. Peningkatan level $AlCl_3^{3+}$ mengikat ion yang diperlukan bagi mutan untuk tumbuh dan berkembang sehingga ketersediaannya terbatas. Aluminium membentuk ikatan dengan adenosin trifosfat (ATP) yang mengakibatkan energi tidak tersedia bagi tanaman (Marschner, 2012).

Tabel 1. Viabilitas Mutan Alfalfa pada Kari ke-30 Setelah Tanam Terhadap Dosis Iradiasi Sinar Gamma dan Level $AlCl_3^{3+}$

Level $AlCl_3^{3+}$ (ppm)	Dosis Iradiasi Sinar Gamma (Gy)					
	0	100	200	300	400	500
100	60	80	86,67	100	100	93,33
200	53,33	80	80	93,33	93,33	86,67
300	40	73,33	80	86,67	86,67	80
400	40	53,33	60	73,33	80	73,33
500	33,3	40	46,67	73,33	73,33	66,67

Tinggi vertikal

Tinggi tanaman menjadi indikator pertumbuhan karena adanya proses pembelahan, pembesaran dan diferensiasi sel dalam unsur genetik, fisiologis, morfologi dan interaksinya (Tabel 2). Tinggi vertikal mutan tertinggi pada dosis 500Gy pada level 100ppm. Iradiasi sinar gamma berpengaruh nyata terhadap daya kecambah, tinggi tanaman dan panjang akar, serta dosis optimal iradiasi sinar gamma adalah 531,89Gy (Nur et al., 2015). Tinggi mutan teriradiasi sinar gamma lebih tinggi dibanding kontrol (0Gy). Mutasi yang terjadi menginduksi mutan dalam meningkatkan toleran tercekam asam. Iradiasi sinar gamma membuat **persenyawaan** radikal hidroksil dan hidrogen peroksida yang menumpang pada rantai nukleotida **mengakibat-**kan DNA putus dan mengalami perombakan genetik (Qosim et al., 2007). Penelitian yang dilakukan Wang et al. (2016) mengungkapkan bahwa legum alfalfa yang diberi perlakuan Al^{3+} menyebabkan penurunan panjang akar, berat akar, siklus akar, dan klorofil total yang terkandung pada daun. Pada kondisi cekaman asam ketersediaan hara sangat terbatas, dan juga kemampuan tanaman untuk menyerap hara juga dibatasi oleh ion Al^{3+} pada $AlCl_3^{3+}$ di dalam membran sel sehingga menghambat membran plasma sel dalam **men-**transport nutrisi terutama pada keasaman di bawah pH 5.5 (Utama, 2008).

Tabel 2. Tinggi Vertikal Mutan Alfalfa pada hari ke-30 Setelah Tanam Terhadap Dosis Iradiasi Sinar Gamma dan Level AlCl³⁺

Level AlCl ³⁺ (ppm)	Dosis Iradiasi Sinar Gamma (Gy)						Rataan
	0	100	200	300	400	500	
100	1,81±0,29 ^a	7,48±0,43 ^{cdef}	7,92±0,50 ^{cdef}	12,17±0,69 ^{ef}	13,03±0,40 ^{ef}	13,66±0,60 ^f	9,34±0,56
200	1,44±0,53 ^a	6,96±0,50 ^{cdef}	7,69±0,56 ^{cdef}	9,17±0,62 ^{cdef}	10,07±0,70 ^{ef}	10,76±0,69 ^{ef}	7,68±0,62
300	1,27±0,16 ^a	5,95±0,28 ^{bcd}	5,72±0,39 ^{abcd}	9,12±0,61 ^{cdef}	7,81±0,75 ^{cdef}	7,93±0,55 ^{cdef}	6,30±0,52
400	1,13±0,41 ^a	5,16±0,59 ^{abcd}	5,49±0,65 ^{abcd}	6,27±0,68 ^{bcd}	7,77±0,40 ^{cdef}	7,07±0,51 ^{cdef}	5,48±0,55
500	1,11±0,10 ^a	2,80±0,83 ^{ab}	4,58±0,46 ^{abc}	6,15±0,47 ^{bcd}	6,54±0,61 ^{cdef}	5,27±0,44 ^{abcd}	4,41±0,53
Rataan	1,35±0,33	5,67±0,55	6,28±0,51	8,57±0,62	8,94±0,60	9,04±0,58	

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaaan secara signifikan ($p < 0,05$)

Jumlah daun

Jumlah daun menunjukkan respon tanaman dalam memanfaatkan nutrien yang terdapat pada lingkungan (Tabel 3). Jumlah daun tertinggi pada dosis iradiasi sinar gamma 400Gy dan 500Gy, dan nilai terendah pada dosis 0Gy (tanpa iradiasi sinar gamma). Induksi mutasi dengan iradiasi sinar gamma mempengaruhi ketahanan mutan terhadap cekaman asam hingga level AlCl³⁺ 500ppm setara dengan pH 2.5. Mutasi yang terjadi memiliki keragaman yang baik dibanding kontrol (0Gy). Tanaman yang terinduksi mutasi sinar gamma menunjukkan perlakuan mutasi berpengaruh nyata terhadap tinggi tanaman dan jumlah daun (Saragih et al., 2020). Level 400ppm dan 500ppm memberikan pengaruh cekaman asam tertinggi dengan rendahnya jumlah daun. Konsentrasi 400 ppm Al jumlah daun majemuk yang bertambah lebih rendah (Manpaki et al., 2017). Cekaman asam akibat tingginya kandungan almunium menyebabkan fosfor didalam media menjadi tidak tersedia. Ion Al³⁺ yang terdapat pada AlCl³⁺ bergabung dengan berbagai senyawa organik (asam organik, protein, lipid) dan inorganik (PO₄⁻³, SO₄⁻²) menimbulkan terhambatnya hara yang terserap.

Kelayuan daun

Kelayuan daun menunjukkan daya adaptasi tanaman dalam menyerap unsur hara terhadap keracunan aluminium (Tabel 4). Persen kelayuan daun meningkat seiring bertambahnya level AlCl³⁺ dengan nilai kelayuan tertinggi pada dosis 0Gy (tanpa iradiasi sinar gamma) pada level AlCl³⁺ 500ppm. Kemampuan suatu tanaman dalam merespon radiasi berbeda-beda. Seperti yang kita ketahui bahwa radiasi dapat memberikan pengaruh, positif maupun negatif dan terhadap sifat-sifat tanaman (Due et al., 2019). Peningkatan AlCl³⁺ dalam media menghambat mutan dalam menyerap nutrien dan air, sehingga daun menjadi layu dan rontok. Mutan mengalami tingkat jenuh pada cekaman asam dengan menghilangkan warna hijau klorofil akibat dari terhambatnya penyerapan hara dan air. Racun yang disebabkan oleh almunium ini mengakibatkan tingginya keterikatan almunium dengan zat ekstraseluler dan asam organik. Perbedaan ini menunjukkan adanya indikasi mekanisme fisiologis dari tanaman untuk menggugurkan daun yang disebabkan karena keracunan aluminium. Persentase kerontokan daun sangat erat hubungannya dengan pertambahan jumlah daun secara berlawanan arah, sehingga ada interaksi negatif antara keduanya (Manpaki et al., 2017).

Tabel 3. Jumlah Daun Mutan Alfalfa pada Hari ke-30 setelah Tanam Terhadap Dosis Iradiasi Sinar Gamma dan Level AlCl³⁺

Level AlCl ³⁺ (ppm)	Dosis Iradiasi Sinar Gamma (Gy)						Rataan
	0	100	200	300	400	500	
100	2,60±1,92 ^{ab}	4,27±2,71 ^{bcd}	4,53±1,81 ^{cde}	6,80±1,42 ^{gh}	7,73±1,10 ^h	7,47±1,85 ^{gh}	5,57±2,63
200	1,47±2,13 ^a	3,60±1,45 ^{bcd}	4,33±2,22 ^{cde}	5,93±1,39 ^{efg}	7,33±1,84 ^{gh}	7,67±2,06 ^h	5,06±2,85
300	1,33±1,29 ^a	3,40±2,13 ^{bc}	4,07±1,98 ^{bcd}	5,13±1,73 ^{def}	6,67±2,26 ^{fgh}	7,20±2,65 ^{gh}	4,63±2,82
400	1,20±2,07 ^a	3,27±2,15 ^{bc}	3,67±1,40 ^{bcd}	4,47±1,73 ^{cde}	6,60±3,18 ^{fgh}	6,93±3,03 ^{gh}	4,36±3,02
500	1,13±1,41 ^a	3,07±1,58 ^{bc}	3,20±1,37 ^{bc}	4,40±2,13 ^{cde}	6,67±2,02 ^{fgh}	4,13±2,07 ^{bcd}	3,77±2,42
Rataan	1,55±1,83	3,52±2,01	3,96±1,80	5,35±1,89	7,00±2,17	6,68±2,65	

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaaan secara signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 4. Kelayuan Daun Mutan Alfalfa pada Hari ke-30 Setelah Tanam Terhadap Dosis Iradiasi Sinar Gamma dan Level AICI³⁺

Level AICI ³⁺ (ppm)	Dosis Iradiasi Sinar Gamma (Gy)						Rataan
	0	100	200	300	400	500	
100	35,32±25,00 ^{ab}	29,93±27,03 ^{ab}	38,53±11,73 ^{abc}	30,91±17,72 ^{ab}	20,91±7,71 ^a	35,12±13,09 ^b	31,79±18,79
200	59,68±32,92 ^{efg}	57,82±26,12 ^{efg}	41,15±11,30 ^{bcd}	34,46±12,59 ^{ab}	30,44±6,23 ^{ab}	36,30±11,97 ^b	43,31±21,96
300	62,78±34,63 ^{fgh}	57,99±27,71 ^{efg}	49,27±22,60 ^{def}	43,57±16,82 ^{bcd}	34,49±21,37 ^{ab}	38,97±15,87 ^c	47,84±25,44
400	67,30±39,34 ^{fgh}	74,70±29,13 ^{ghi}	74,22±22,05 ^{ghi}	46,11±22,73 ^{cde}	34,05±24,09 ^{ab}	46,55±22,42 ^e	57,16±30,87
500	80,44±26,09 ^{hi}	73,94±15,00 ^{ghi}	80,89±17,92 ^{hi}	56,94±26,86 ^{efg}	43,30±17,74 ^{cd}	88,76±17,75 ⁱ	70,71±25,58
Rataan	61,10±34,51	58,87±29,71	56,81±24,65	42,40±21,51	32,64±18,09	49,14±25,99	

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaaan secara signifikan ($p < 0,05$)

Penyusutan media

Penyusutan media berhubungan dengan penyerapan nutrien dalam metabolisme pertumbuhan (Tabel 5). Hasil sidik ragam pada penyusutan media berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap dosis iradiasi sinar gamma dan level AICI³⁺. Penyusutan media tertinggi terdapat pada dosis 500Gy pada level AICI³⁺ 100ppm dan terendah terdapat pada dosis 0Gy pada level AICI³⁺ 500ppm. Hingga level AICI³⁺ 500ppm penyusutan tertinggi terdapat pada dosis 400Gy. Mutan dengan berat penyusutan yang tinggi mengindikasi pertumbuhan yang tinggi. Iradiasi gamma memungkinkan terjadinya berbagai macam mutasi, yaitu mutasi gen, genom, hingga tingkat kromosom (Soeranto, 2003). Pada dosis 0Gy (tanpa iradiasi sinar gamma) peningkatan level AICI³⁺ sebagai simulasi cekaman asam menunjukkan penurunan penyusutan media yang diikuti dengan peningkatan level AICI³⁺. Penambahan level AICI³⁺ meningkatkan cekaman asam pada mutan yang mengakibatkan mutan menjadi stres dan menghambat penyerapan nutrien untuk tumbuh dan berkembang. Mutan yang mengalami peningkatan dan penurunan dalam penyusutan media berhubungan dengan terganggunya proses pertumbuhan (Manpaki, 2017). Semakin meningkatnya pertumbuhan maka penyusutan media meningkat, sebaliknya jika pertumbuhan menurun maka nilai penyusutan media rendah.

Bobot Basah

Bobot basah menjadi salah satu indikator pertumbuhan dalam melihat tingkat toleransi terhadap kondisi tercekam seperti penambahan AICI³⁺ (Tabel 6). Bobot basah tanaman tertinggi pada dosis 500Gy pada level AICI³⁺ 200ppm dan terendah pada dosis 0Gy (tanpa iradiasi sinar gamma). Bobot basah tanaman teriradiasi sinar gamma lebih tinggi dibanding kontrol (0Gy). Dosis iradiasi sinar gamma pada tanaman mampu meningkatkan bobot basah hingga level AICI³⁺ 500ppm dengan nilai tertinggi pada dosis 400Gy dan 500Gy. Pada tanaman yang teriradiasi sinar gamma terjadi proses mutasi pada tingkat DNA yang membentuk genetik tanaman yang toleran cekaman asam. Sinar gamma merupakan mutagen fisik yang kerap digunakan dalam metode mutagenesis tumbuhan. Sinar radioaktif yang menyentuh jaringan tanaman mengakibatkan adanya ionisasi molekul air, selanjutnya mengoksidasi gula dalam DNA kemudian rangkaian nukleotidanya patah (Devy dan Sastra, 2006). Nilai bobot basah tanaman yang menurun seiring dengan penambahan level AICI³⁺ menunjukkan adanya interaksi. Semakin tinggi level AICI³⁺ maka media tumbuh akan semakin asam. Cekaman asam yang tinggi akibat penambahan AICI³⁺ menghambat perpanjangan zona meristematik tanaman yang berakibat pada susunan sel yang tidak teratur dan bentuk sel yang cacat namun tidak menghambat pembelahan sel dan tanaman akan tetap berupaya hingga batas toleransi dengan berhentinya aktivitas fisiologis dan kematian sel (Wang et al., 2016).

Tabel 5. Penyusutan Media Mutan Alfalfa pada Hari ke-30 Setelah Tanam Terhadap Dosis Iradiasi Sinar Gamma dan Level AICI³⁺

Level AICI ³⁺ (ppm)	Dosis Iradiasi Sinar Gamma (Gy)						Rataan
	0	100	200	300	400	500	
100	0,89±0,46 ^{def}	1,05±0,29 ^{fgh}	1,11±0,26 ^{gh}	1,16±0,31 ^{ghi}	1,21±0,26 ^{ghi}	1,33±0,26 ⁱ	1,12±0,33
200	0,77±0,21 ^{cd}	0,99±0,19 ^{efg}	1,07±0,38 ^{fgh}	1,15±0,18 ^{ghi}	1,19±0,25 ^{ghi}	1,23±0,23 ^{hi}	1,07±0,29
300	0,59±0,17 ^{abc}	0,87±0,27 ^{def}	1,03±0,33 ^{fgh}	1,14±0,34 ^{ghi}	1,17±0,29 ^{ghi}	1,13±0,18 ^{ghi}	0,99±0,33
400	0,55±0,17 ^{ab}	0,71±0,20 ^{bcd}	0,81±0,19 ^{def}	1,12±0,16 ^{ghi}	1,16±0,28 ^{ghi}	1,12±0,24 ^{ghi}	0,91±0,31
500	0,47±0,15 ^a	0,69±0,24 ^{bcd}	0,77±0,10 ^{cd}	1,11±0,18 ^{ghi}	1,15±0,23 ^{ghi}	1,05±0,27 ^{fgh}	0,88±0,32
Rataan	0,65±0,29	0,86±0,28	0,96±0,30	1,14±0,24	1,18±0,26	1,17±0,25	

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaaan secara signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 6. Penyusutan Media Mutan Alfalfa pada Hari ke-30 Setelah Tanam Terhadap Dosis Iradiasi Sinar Gamma dan Level AlCl³⁺

Level AlCl ³⁺ (ppm)	Dosis Iradiasi Sinar Gamma (Gy)						Rataan
	0	100	200	300	400	500	
100	0,15±0,07 ^a	0,17±0,07 ^a	0,19±0,07 ^a	0,79±0,28 ^{de}	1,01±0,15 ^f	1,03±0,23 ^f	0,56±0,43
200	0,14±0,05 ^a	0,16±0,07 ^a	0,17±0,09 ^a	0,67±0,26 ^{cd}	0,97±0,24 ^f	0,99±0,17 ^f	0,52±0,41
300	0,13±0,05 ^a	0,16±0,07 ^a	0,17±0,06 ^a	0,61±0,32 ^{bc}	0,93±0,25 ^{ef}	0,91±0,15 ^{ef}	0,48±0,39
400	0,12±0,04 ^a	0,15±0,09 ^a	0,16±0,08 ^a	0,55±0,24 ^{bc}	0,89±0,19 ^{ef}	0,81±0,24 ^e	0,45±0,36
500	0,11±0,02 ^a	0,14±0,07 ^a	0,16±0,08 ^a	0,53±0,25 ^b	0,81±0,19 ^e	0,51±0,20 ^b	0,38±0,31
Rataan	0,13±0,05	0,16±0,07	0,17±0,08	0,63±0,28	0,92±0,22	0,85±0,27	

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaaan secara signifikan ($p < 0,05$)

Warna Daun

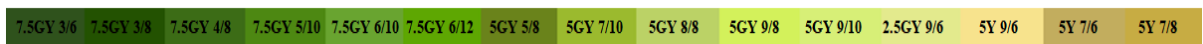
Warna daun menjadi indikator penanda visual untuk menilai pertumbuhan tanaman dan keberhasilan suatu regenerasi. Perbedaan warna daun juga menunjukkan tingkat perkembangan fase pertumbuhan yang terjadi di sel (Tabel 7). Persen warna hijau tua menurun seiring dengan meningkatnya level AlCl³⁺. Persen warna daun berwarna hijau tua tertinggi pada dosis 300Gy dan 400Gy pada level AlCl³⁺ 500ppm lebih tinggi dibanding dosis 0Gy (tanpa iradiasi sinar gamma). Warna daun tanaman tanpa iradiasi sinar gamma (0Gy) menunjukkan adanya pengaruh yang nyata terhadap peningkatan level AlCl³⁺. Perubahan warna akibat mutasi merupakan ekpresi mutasi yang terjadi pada tingkat DNA. Mutasi menyebabkan adanya perubahan rantai basa DNA yang mengakibatkan modifikasi pada sifat fenotipik ataupun genotipik (Tounekti *et al.*, 2017). Warna daun mengalami perubahan seiring dengan penambahan level AlCl³⁺, yaitu dari berwarna hijau tua, hijau, hijau muda kuning, dan coklat. Pada AlCl³⁺ ion Al³⁺ yang bergabung dengan senyawa anorganik seperti PO₄⁻³ dan SO₄⁻² dan senyawa organik seperti asam organik, protein dan lipid mengakibatkan absorpsi hara menjadi terganggu dalam proses metabolisme. Menurut Lestari dan Mariska (2003) warna yang berubah dari kecoklatan atau kuning menjadi putih kekuningan selanjutnya menjadi kehijauan, merupakan tanda adanya morfogenesis atau tanda adanya proses regenerasi. Adapun warna coklat disebabkan adanya proses penuaan. Sel-sel muda yang sehat berwarna kuning berubah menjadi coklat seiring dengan pertumbuhannya akan semakin tua. Perubahan warna daun sebagai bentuk respon stres pada eksplan terhadap penambahan level AlCl³⁺ yang diberikan, sehingga menstimulasi enzim tertentu untuk membentuk senyawa fenol dalam membentuk pertahanan diri yang mengakibatkan terjadinya degradasi klorofil pada sel-sel tanaman.

Perubahan pH

Pengambilan atau penyerapan berbagai macam komponen dalam media dipengaruhi oleh nilai pH yang mengatur reaksi biokimia yang terjadi dalam kultur sel dan jaringan (Tabel 8). Peningkatan pH dengan nilai tertinggi terdapat pada jenis mutan 400Gy pada level AlCl³⁺ 400ppm dan penurunan pH dengan nilai terendah pada dosis 0Gy (tanpa iradiasi sinar gamma) pada level 400ppm dan 500ppm. Nilai pH akhir mengalami penurunan seiring dengan penambahan level AlCl³⁺ terhadap perubahan pH. Meski penambahan level AlCl³⁺ menurunkan nilai pH akhir dan perubahan pH, namun nilai pH media pada tanaman teriradiasi sinar gamma lebih baik dibanding tanpa iradiasi sinar gamma (0Gy). Nilai pH mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan morfologi dari kultur (Utama, 2008). Perubahan yang tinggi pada nilai perubahan pH menunjukkan tanaman teradaptasi pada kondisi cekaman asam, dan membentuk tanaman yang toleran. Perubahan kemasaman media merupakan salah satu mekanisme toleransi aluminium (Manpaki *et al.*, 2017). Kondisi tercekam asam akan memicu tanaman untuk melakukan proses adaptasi dengan menaikkan dan menurunkan pH. Perubahan pH media berhubungan dengan kemampuan tanaman untuk mensintesis asam organik. Tanaman yang mampu beradaptasi diyakini sebagai tanaman yang toleran pada cekaman asam. Kondisi tercekam Al terhadap perubahan pH dapat disebabkan adanya penyerapan nitrat (NO₃⁻) dan amonium (NH₄⁺). Perbedaan ini menentukan tingkat toksisitas terhadap Al dalam metabolisme tanaman. Pada tanaman yang toleran penurunan pH diikuti dengan pengambilan amonium (NH₄⁺) yang lebih banyak yang menyebabkan menurunnya aktifitas nitrat reduktase. Apabila amonium yang diserap lebih sedikit dari nitrat (NO₃⁻), maka pH meningkat yang menyebabkan ekskresi OH⁻ (Utama, 2008). Spesies toleran terhadap cekaman Al terkait efisiensi reduksi amonium yang lebih rendah dari nitrat.

Tabel 7. Warna Daun Mutan Alfalfa pada Hari ke-30 Setelah Tanam Terhadap Dosis Iradiasi Sinar Gamma dan Level AICI³⁺

Level AICI ³⁺ (ppm)	Dosis Iradiasi Sinar Gamma (Gy)					
	0	100	200	300	400	500
%					
	6,67	33,33	53,34	73,3	60	33,33
100	26,66	13,33	13,33	20	13,33	26,67
	20	26,67	13,33	6,67	26,67	6,67
	6,67	6,67	6,67			20
	40	20	13,33			13,33
200	6,67	6,67	6,67	33,34	60	26,67
	13,33	20	26,67	13,33	13,33	33,33
	33,33	33,33	33,33	13,33	26,67	6,67
	46,67	20	13,33	33,33		6,67
		20	20	6,67		26,67
300	20	20	20	20	60	33,33
	13,33	26,66	20	20	13,33	6,67
	6,67	20	40	40	26,67	40
	60	6,67	20	6,67		20
		26,67		13,33		
400	6,67	13,33	33,33	6,67	60	33,33
	33,33	13,33	20	53,33	13,33	20
	60	26,67	6,67	6,67	26,67	20
		46,67	40	13,33		13,33
				20		13,33
500	33,33	6,67	13,33	60	60	13,33
	66,67	26,66	13,33	13,33	13,33	6,67
		20	26,67	26,67	26,67	13,33
		6,67	46,67			33,33
		40				33,33



Keterangan: Color Chart Warna Daun

Tabel 8. Perubahan pH Media Mutan Alfalfa pada hari ke-30 Setelah Tanam Terhadap Dosis Iradiasi Sinar Gamma dan level AICI³⁺

Level AICI ³⁺ (ppm)	Dosis Iradiasi Sinar Gamma (Gy)						Rataan
	0	100	200	300	400	500	
100	0,18±0,00 ^{ab}	0,17±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^a	0,21±0,00 ^{ab}	0,52±0,00 ^{cdef}	0,20±0,00 ^{ab}	0,22±0,31
200	0,20±0,00 ^{ab}	0,88±0,00 ^{efghij}	0,80±0,00 ^{efghi}	1,01±0,00 ^{hijk}	1,10±0,00 ^{ijk}	0,90±0,00 ^{ghij}	0,82±0,36
300	0,19±0,00 ^{ab}	0,40±0,00 ^{abcd}	0,90±0,00 ^{ghij}	0,70±0,00 ^{efgh}	1,21±0,00 ^{jk}	1,00±0,00 ^{hijk}	0,73±0,43
400	0,11±0,00 ^a	0,40±0,00 ^{abcd}	0,90±0,00 ^{ghij}	0,50±0,00 ^{bcde}	1,30±0,00 ^k	0,71±0,00 ^{efgh}	0,65±0,44
500	0,11±0,00 ^a	0,40±0,00 ^{abcd}	0,88±0,00 ^{efghij}	0,30±0,00 ^{abc}	0,90±0,00 ^{ghij}	0,60±0,00 ^{defg}	0,53±0,38
Rataan	0,16±0,24	0,45±0,37	0,70±0,42	0,54±0,36	1,00±0,37	0,68±0,34	

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaaan secara signifikan ($p < 0.05$)

KESIMPULAN

Peningkatan dosis sinar gamma dapat meningkatkan keragaman mutan alfalfa terhadap karakteristik pertumbuhan pada kondisi tercekam asam. Induksi mutasi dengan iradiasi sinar gamma dapat dihasilkan mutan alfalfa yang toleran cekaman asam hingga level AICI³⁺ 500ppm dengan dosis iradiasi sinar gamma terbaik pada dosis 400Gy.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan dengan hubungan keuangan, pribadi, atau lainnya dengan orang atau organisasi lain yang terkait dengan materi yang dibahas dalam naskah.

DAFTAR PUSTAKA

Astutik, A. 2009. Peningkatan kualitas bibit pisang kepok melalui radiasi sinar gamma secara in vitro. *Buana Sains* 9(1):69-75.

Devy, L. & D.R. Sastra. 2006. Pengaruh radiasi sinar gamma terhadap kultur in vitro tanaman jahe. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 8(1).

Due, M.S., A. Yunus, & A. Susilowati. 2019. Keragaman pisang (*Musa spp.*) hasil iradiasi sinar gamma secara in vitro berdasarkan penanda morfologi. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* Volume 5. Nomor 2. ISSN: 2407-8050 Halaman: 347-352. DOI: 10.13057/psnmbi/m050236

Harsanti, L. & Y. Yulidar. 2015. Pengaruh iradiasi sinar gamma terhadap pertumbuhan awal tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) varietas Denna 1. *Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir* 9:59-63.

Havidzati, N., P.D.M.H. Karti, & I. Prihantoro. 2017. Morphology Response of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Based on Level Gamma

Ray Irradiation with Tissue Culture Methods. *Proceedings Book*. 52.

Kumar, S. 2011. Biotechnological advancements in alfalfa improvement. *J Appl Genetics* 52:111-124.

Lestari, E.G., I. Mariska, I. Roostika, & M. Kosmiatin. 2006. Induksi Mutasi Dan Seleksi In Vitro Menggunakan Asam Fusarat Untuk Ketahanan Penyakit Layu Padapisang Ambon Hijau. *Berita Biologi*. 8(1). 27-35.

Manpaki, S.J., P.D.M.H. Karti, & I. Prihantoro. 2017. Respon pertumbuhan eksplan mutan lamtoro (*Leucaena leucocephala* Cv. Tarramba) terhadap cekaman keasaman media dengan level pemberian aluminium melalui kultur jaringan. *J Sains Peternakan Indonesia*. 12(1):71-82.

Marschner, H. 2012. Mineral Nutrition of Higher Plants. 3th ed. Academic Press Harcourt Brace and Company Publishers. London.

Nur, A., K. Syaruhddin, & Herawati. 2015. Pengaruh Radiosensivitas Iradiasi Sinar Gamma Terhadap Perkembangan Kecambah dan Pertumbuhan Vegetatif Tanaman M1 Sorgum Manis (*Sorghum Bicolor* L.). *Prosiding Seminar Nasional Serealia*.

Qosim, W.A., R. Purwanto, G.A. Wattimena, & Witjaksono. 2007. Effect of gamma irradiation on regeneration capacity of mangosteen nodular callus. *J Hayati of Biosci* 14(4):140-144.

Putnam, D.H. & S.B. Orloff. 2014. Forage Crops in *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Pages 381-405.

Saragih, S.H.Y., K. Rizal, & K.D. Sitanggang. 2020. Induksi Mutasi Kara Benguk (*Mucuna pruriens* L.) Menggunakan Iradiasi Sinar Gamma. *Agrosains* 22(2):105-108.

Soeranto. H. 2003. Peran Iptek Nuklir dalam Pemuliaan Mutan untuk Mendukung Industri Pertanian.

Tounekti, T., M. Mahdhi, T.A. Al-Turki, & H. Khemira. (2017). Genetic diversity analysis of coffee (*Coffea arabica* L.) Germplasm accessions growing in the Southwestern Saudi Arabia using quantitative traits. Natural Resources 8(5):321-336.

Utama. M.Z.H. 2008. Mekanisme Fisiologi Toleransi Cekaman Aluminium Spesies Legum Penutup Tanah terhadap Metabolisme Nitrat (NO₃⁻). Amonium (NH⁴⁺). dan Nitrit (NO₂⁻). Jurnal Agronomi Indonesia 36(2):

Wang, S., X. Ren, B. Huang, G. Wang, P. Zhou, & Y. An. 2016. Aluminium-induced reduction of plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L) is mediated by interrupting auxin transport and accumulation in roots. Scientific reports 6(1): 1-13.

Yusnita. Y. 2015. Kultur Jaringan Mutan Sebagai Teknik Penting Bioteknologi untuk Menunjang Pembangunan Pertanian. Aura Publishing. Banda Lampung.