

# RESPONS EMBRIOGENESIS MIKROSPORA TANAMAN TEBU (*Saccharum* spp.) PADA SUHU DAN LAMA INKUBASI CABANG MALAI DI DALAM MEDIUM B

Suaib\*), W. Mangoendidjojo\*\*), Mirzawan PDN\*\*\*), dan A. Indrianto\*\*\*\*).

\*) Fakultas Pertanian Universitas Haluoleo, Kendari. E-mail: suaib\_06@yahoo.co.id

\*\*) Fakultas Pertanian/Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\*\*\*) Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI), Pasuruan, Jawa Timur

\*\*\*\*) Fakultas Biologi/Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

## ABSTRACT

*Microspore embryogenesis under different temperature and time duration pretreatments of spike segments of Saccharum spp., clone PS862 has been studied in in-vitro laboratory of Faculty of Biology Gadjah Mada University, Yogyakarta. Combination pretreatments of a 4 and 34° C of temperatures, and 0, 2, 4, and 7 days duration of incubation of spike segments in the B medium were studied in this observation. A B<sub>3</sub> medium of Gamborg supplemented with 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D or 2 mg.l<sup>-1</sup> NAA was also studied on the formation of proembryos and embryos under 25° C temperature in the dark for at least 30 days. Results of the research showed that the percentage of viable microspores was decreased as simultaneously prolonged of the time of duration in the B medium either under low temperature or under high temperature pretreatments tested. Incubation of spike segments under low temperature after 4 days was decreased the percentage of viable microspores over 44%. In contrast, under high temperature pretreatment the percentage of viable microspores was decreased over 54%. The higher percentage (12.5%) of binucleate microspores was achieved after 7 days incubation of spike segments in the B medium under the low temperature compared to the high temperature (7.14%). Besides, the higher percentage (87.5%) of symmetrical binucleate microspores as proembryo and embryo precursor was obtained after 2 days incubation in the B medium under the low temperature compared to the high temperature (79.0%). Finally, only B<sub>3</sub> medium supplemented with 2 mg.l<sup>-1</sup> of NAA was yielded the proembryos and embryos after 30 days of incubation.*

**Key words:** microspore embryogenesis, stress pretreatments, sugarcane, spike segments

## PENGANTAR

Embriogenesis mikrospora adalah proses terbentuknya embrio dari mikrospora yang dikulturkan secara *in-vitro* di dalam medium yang kaya nutrisi bagi diferensiasi mikrospora. Pada kondisi *in-vivo*, mikrospora akan bermitosis dan menghasilkan inti vegetatif dan inti generatif, selanjutnya berkembang sebagai tepung sari atau sel jantan yang berfungsi membuahi inti sel betina. Sedangkan pada kondisi *in-vitro*, mikrospora akan bermitosis dan menghasilkan dua macam mikrospora, yakni: (i) mikrospora dengan inti vegetatif dan inti generatif, dan (ii) mikrospora dengan kedua intinya mirip inti vegetatif (*vegetative-like nuclear*). Secara teoretis dan didukung oleh bukti-bukti hasil penelitian menunjukkan bahwa mikrospora tipe pertama akan menghasilkan tepung sari fungsional dan mikrospora embriogenik, sedangkan mikrospora tipe kedua hanya akan menghasilkan mikrospora embriogenik melalui kultur *in-vitro*. Kyo dan Harada (1986) dan Touraev *et al.* (1996) melaporkan bahwa kultur mikrospora tanaman tembakau akan menghasilkan mikrospora embriogenik pada frekuensi yang tinggi apabila mikrospora tipe kedua berada pada frekuensi yang tinggi. Indrianto *et al.* (2001)

juga melaporkan fenomena yang sama bagi tanaman gandum. Sementara itu, Bhojwani dan Razdan (1983), Custers *et al.* (1994), Reynolds (1995), dan Forster *et al.* (2007) menguraikan lebih terperinci perkembangan mikrospora melalui jalur sporofitik membentuk mikrospora embriogenik bagi beberapa tanaman budi daya.

Baik mikrospora tipe pertama maupun tipe kedua, keduanya dapat diinduksi untuk menghasilkan mikrospora embriogenik. Akan tetapi, induksi embriogenesis pada mikrospora yang membentuk inti generatif dan vegetatif mengandung risiko terbentuknya embrio yang menghasilkan tanaman albino. Hal ini terjadi karena inti generatif yang melakukan pembelahan berulang-ulang membentuk embrio yang tidak mampu berdiferensiasi lebih lanjut atau berdiferensiasi tetapi membentuk *plantlet* albino. Reynolds (1995) dan Bhojwani dan Bhatnagar (1999) mengemukakan bahwa inti generatif tidak atau hanya mengandung sedikit plastida sebagai prekursor bagi sintesis zat hijau daun atau klorofil. Dengan demikian, *plantlet* yang dihasilkan dari embrio yang berkembang dari sel-sel inti generatif akan gagal memproduksi warna hijau pada tanaman.

Sementara itu, mikrospora yang membentuk dua *vegetative-like nuclear* akan berdiferensiasi membentuk

embrio dan tanaman hijau lengkap. Oleh karena itu, induksi mikrospora harus diarahkan agar membelah membentuk dua *vegetative-like nuclear* atau membelah secara simetris karena pembelahan inti ini secara terus-menerus akan menghasilkan embrio fertil dan tanaman hijau lengkap.

Berbagai perlakuan (praperlakuan, *pretreatment*) pada antera dan mikrospora yang bertujuan untuk merangsang perkembangan mikrospora dari jalur gametofitik ke jalur sporofitik telah diaplikasikan pada berbagai tanaman budi daya. Praperlakuan dimaksud dilakukan dengan cara: (1) starvasi (*starvation*, pelaparan) nitrogen dan karbohidrat, (2) penyinaran singkat, (3) tekanan osmotik, (4) suhu panas, dan (5) suhu dingin, serta (6) kimiawi (Ohnoutkova *et al.*, 2001).

Perlakuan stres dengan starvasi nitrogen, suhu panas dan dingin dapat meningkatkan kemampuan embriogenesis mikrospora pada tanaman gandum stres tekanan osmotik dengan *mannitol* pada *barley* (Castillo *et al.*, 2000; Ohnoutkova *et al.*, 2001). Sedangkan stres kimiawi dengan *gibberellin* berhasil membentuk embrio dan tanaman haploid pada frekuensi yang sangat tinggi bagi tanaman *Brassica napus* (Hays *et al.*, 2002). Demikian pula, penggunaan stres kimiawi berupa penambahan *colchicine* di dalam medium inisiasi embrio dapat meningkatkan jumlah embrio tanaman kopi yang dihasilkan melalui kultur mikrospora (Herrera *et al.*, 2002), dan pada *Brassica napus* oleh Zhou *et al.* (2002).

Di samping jenis praperlakuan yang diaplikasikan, konsentrasi jenis praperlakuan dan lama inkubasi eksplan dalam suatu praperlakuan juga menentukan keberhasilan pembentukan mikrospora embriogenik dan embrio mikrospora. Praperlakuan dingin pada suhu 8° C selama 10 hari pada beberapa kultivar gandum, dan 4° C selama 8–28 hari pada beberapa kultivar *barley* menghasilkan mikrospora embriogenik dalam jumlah yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan suhu dan lama inkubasi lainnya (Datta, 2005). Segui-Simarro dan Nuez (2007) mengemukakan bahwa antera yang diinkubasikan di dalam medium MS pada lemari tumbuh pada suhu 25° C dengan kondisi gelap selama sebulan, dan inkubasi bunga di dalam medium khusus pada suhu 7° C dengan kondisi gelap selama 6 hari memberikan hasil mikrospora embriogenik yang optimal bagi tanaman tomat.

Ogawa *et al.* (1995) dan Roy dan Mandal (2005) melaporkan bahwa malai padi *Indica* yang diinkubasikan berturut-turut pada suhu 10° C selama 21–28 hari, dan pada suhu 8° C selama 8 hari, menghasilkan polen embrio dalam jumlah yang sangat tinggi. Demikian juga, mengemukakan bahwa praperlakuan malai tanaman gandum pada suhu

4° C selama 28 hari, dan inkubasi antera pada suhu 28° C selama 7 hari, juga menghasilkan mikrospora embriogenik pada frekuensi yang sangat tinggi. Sementara itu, Gonzalez dan Jouve (2005) menguraikan bahwa praperlakuan malai tanaman *Triticale* pada suhu 4° C dan anteranya dikulturkan di dalam medium N<sub>6</sub> (Chu, 1978) menghasilkan embrio mikrospora dalam jumlah yang tinggi.

Pada tanaman tebu, Chen *et al.* (1979) menggunakan stres osmotik untuk inisiasi androgenesis mikrospora melalui kultur *in-vitro* antera dengan 200 g l<sup>-1</sup> sukrosa selama 40 hari, sedangkan Fitch dan Moore (1983) menggunakan stres dingin pada suhu 10° C juga selama 40 hari. Moore dan Fitch (1990) menduga bahwa stres dengan suhu tinggi, dan stres dengan hormon ABA dan *ethylene* dapat menstimulasi perkembangan androgenesis mikrospora pada tanaman tebu. Oleh karena itu, keberhasilan kultur mikrospora sangat ditentukan oleh pengalihan perkembangan mikrospora dari jalur pembentukan polen (gametofitik) ke jalur pembentukan embrio (sporofitik) melalui penerapan berbagai teknik praperlakuan stres pada eksplan yang dikulturkan.

Mikrospora berbagai spesies tanaman telah berhasil dikulturkan pada berbagai jenis media *in-vitro*. Ada spesies tanaman yang respons pada beberapa jenis media, ada pula spesies yang hanya sesuai bagi medium tunggal. Demikian pula, tanaman kelompok monokotil dan dikotil respons terhadap jenis medium tertentu. Dari kelompok monokotil masih dikelompokkan lagi ke dalam keluarga *gramineae* dan *non-gramineae*. Berdasarkan penelusuran kepustakaan menunjukkan bahwa kultur antera atau mikrospora kelompok *gramineae* seperti tanaman jagung, padi, dan *wheat*, kebanyakan menggunakan medium B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968) sebagaimana dilaporkan oleh Yang *et al.* (1980), Wang dan Hu (1984), dan Marassi *et al.* (1993). Tanaman tebu termasuk dalam keluarga *gramineae* sehingga pada penelitian ini digunakan medium B<sub>5</sub> bagi induksi embrio mikrospora melalui kultur mikrospora secara *in-vitro* sebagaimana dilaporkan oleh Fitch dan Moore (1984) dan Moore and Fitch (1990) meskipun melalui kultur antera beberapa spesies tanaman tebu.

Penggunaan zat pengatur tumbuh (ZPT) terutama dari kelompok auksin dan sitokinin merupakan suatu keharusan dalam kultur antera dan atau mikrospora. ZPT sebagai hara pelengkap medium kultur antera dan atau mikrospora berperan dan berfungsi dalam pembelahan sel ke berbagai arah. Svensson dan Johannson (1994) menggunakan BA (6-Benzylaminopurine), IAA (*Indole-3-acetic acid*), Kinetin, NAA (*α-Naphthaleneacetic acid*), dan 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) pada kultur

antara hibrida *Fragaria x Ananassa* untuk mendapatkan ZPT yang sesuai, melaporkan respons yang beragam di antara jenis ZPT yang ditambahkan dalam medium induksi mikrospora embriogenik.

Untuk pertama kalinya, tulisan ini melaporkan dan mendiskusikan hasil penelitian mengenai respons mikrospora tanaman tebu klon PS862 yang mendapat praperlakuan stres suhu 4° C dan 34° C di dalam medium starvasi B nir-nitrogen selama 0, 2, 4, dan 7 hari pada kondisi gelap terhadap kemampuan membentuk mikrospora embriogenik selama kultur *in-vitro*. Selain itu, juga dilaporkan kemampuan mikrospora embriogenik berdiferensiasi membentuk struktur seperti kalus atau embrio pada medium induksi embrio B<sub>5</sub> yang mengandung 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D atau NAA.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Penanaman Tebu Bahan Penelitian

Potongan batang atau bagal (*setts*) sepanjang dua buku tebu klon PS862 yang digunakan dalam penelitian ini, ditanam dengan posisi horizontal di dalam parit pada kedalaman ± 25 cm. Pemeliharaan dilakukan dalam bentuk pemberian pupuk Urea, SP36, dan KCl dengan dosis berturut-turut 200, 100, dan 100 kg per hektar atau berturut-turut 100; 50 dan 50 g per 500 cm panjang parit. Semua dosis Urea, SP36, dan KCl, diberikan dua bulan setelah tanam. Pengendalian hama dan penyakit dilakukan secara berkala. Demikian pula dilakukan penyiraman, dan pengendalian gulma serta pembumbunan tanah di sepanjang baris tanaman.

### Pembuatan Medium

Pembuatan medium praperlakuan starvasi B nir-nitrogen (Kyo dan Harada, 1986) yang terdiri atas: 1490 mg l<sup>-1</sup> KCl, 147 mg l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 250 mg l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 140 mg l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 54700 mg l<sup>-1</sup> *mannitol*, mengikuti prosedur Suaib *dkk.* (2006). Sebelum sterilisasi panas dan tekanan dengan *autoclave*, kemasaman medium starvasi B diatur pada pH 7,0. Sedangkan prosedur pembuatan medium induksi embrio mikrospora (medium B<sub>5</sub> dari Gamborg *et al.*, 1968) adalah: labu takar di atas *plate* yang berisi air destilasi sebanyak seperdua dari volume totalnya dan dengan batang magnet (*magnetic stirer*) tetap berputar, satu per satu garam-garam makro dimasukkan. Disusul dengan larutan baku garam-garam mikro, vitamin, ZPT, dan akhirnya sumber karbon berupa maltosa. Selanjutnya, air destilasi ditambahkan ke dalam labu takar hingga mencapai volume yang diperlukan. Komposisi medium

B<sub>5</sub>, tertera pada Lampiran 1. Kemasaman medium induksi embrio mikrospora diatur pada pH 5,8–6,0 dengan KOH 1N atau HCl 1N. Sterilisasi medium cair dilakukan dengan penyaringan menggunakan *micropore* 0,22 µm, sedangkan disterilisasi peralatan menggunakan *autoclave* pada suhu 121° C dan tekanan 1,2 kg cm<sup>-2</sup> atau 0,127 Mega Pascal (MPa), masing-masing selama 15 menit bagi medium dan 20 menit bagi peralatan.

### Sterilisasi Malai, Cabang Malai, dan Bulir

Baik malai (*panicle*) dengan cabang malai (*subpanicle/spike*) yang masih terbungkus di dalam kelopak daun bendera maupun yang telah muncul, dipotong pada 2–3 ruas di bawah pangkal malai. Malai tersebut dimasukkan ke dalam botol yang berisi air kran, lalu dibungkus dengan kertas koran yang lembap dan segera dibawa dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin pada suhu ± 5° C hingga perlakuan inkubasi cabang malai dilakukan atau maksimal 21 hari.

Sterilisasi malai dilakukan dengan: semua daun di bawah kelopak daun bendera dibuang, kemudian malai disemprot dengan alkohol 96% hingga merata pada seluruh permukaan kelopak daun bendera, lalu dimasukkan ke dalam LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*). Sementara itu, sterilisasi cabang malai dan bulir dilakukan dengan memotong malai beberapa bagian sepanjang ± 2 cm dengan menggunakan pisau steril. Cabang malai dari bungkus kelopak daun bendera dikeluarkan menggunakan dua pasang pinset steril, selanjutnya dimasukkan ke dalam gelas *Erlenmeyer* volume 250 ml yang berisi alkohol 70% selama 60 detik. Alkohol dibuang kemudian diganti dengan 100% *Bayclin* dan satu tetes “*tween-20*”, lalu gelas *Erlenmeyer* digoyang lembut selama 20 menit. *Bayclin* + *tween-20* dibuang kemudian cabang malai dicuci sebanyak tiga kali dengan air destilasi yang telah disterilkan menggunakan *autoclave* dengan masing-masing pencucian selama 5 menit.

### Perlakuan Stres

Praperlakuan stres dilakukan dengan memasukkan cabang malai sebanyak 20 potong berukuran ± 2 cm yang telah disterilkan ke dalam cawan Petri steril berdiameter 3 cm atau botol kultur steril berukuran kecil yang telah berisi 5 ml medium starvasi B nir-nitrogen. Cawan Petri atau botol kultur yang telah berisi potongan cabang malai, disegel dengan *parafilm* atau aluminium foil steril dan plastik tipis tembus pandang, kemudian diinkubasikan pada suhu rendah (4° C), atau suhu tinggi (34° C) selama 0, 2, 4, dan 7 hari.

Setelah mengalami praperlakuan stres, mikrospora diisolasi dengan masukkan cabang malai ke dalam tabung blender yang telah berisi 20 ml medium 0,3 M *mannitol* (Kasha *et al.*, 2001), kemudian diblender pada kecepatan 150.000 rpm selama 3–5 detik. Mikrospora ditampung di dalam tabung sentrifuge steril volume 10 ml dengan menyaring campuran hancuran serat *lemma* dan *palea* menggunakan nilon steril berpori 100  $\mu\text{m}$ , kemudian disentrifuge pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Larutan yang terdapat di atas endapan mikrospora dibuang kemudian dengan menggunakan pipet mikro, mikrospora disuspensikan dengan larutan 0,3 M *mannitol* dan disentrifuge kembali pada kecepatan dan lama sebagaimana yang diuraikan di atas yang disebut pencucian mikrospora. Prosedur pencucian mikrospora ini diulangi maksimal dua kali. Mikrospora hasil isolasi ini siap untuk dikulturkan ke dalam medium induksi embrio mikrospora atau siap diamati viabilitasnya melalui teknik pewarnaan aktivitas *esterase* mikrospora dengan metode FDA [*Fluorescein diacetate method*] (Heslop-Harrison dan Heslop-Harrison (1970)], dan DAPI [(4',6-diamidino-2-phenylindole-HCl) (Vergne *et al.*, 1987)]. Mikrospora viabel akan menampakkan intinya, sedangkan mikrospora nonviabel tidak memberikan reaksi pewarnaan atau mikrospora terlihat tanpa inti. Inti generatif berukuran lebih kecil dan dengan intensitas penyerapan warna yang lebih terang, sedangkan inti vegetatif berukuran lebih besar tetapi intensitas penyerapan warna yang kurang terang. Viabilitas dan status pembelahan inti mikrospora diamati menggunakan mikroskop *binokuler fluorescent*, dan didokumentasikan menggunakan kamera *Nikon Coolpix 5000*.

### Kultur Mikrospora/Induksi Embriogenesis

Induksi embrio dilakukan dengan menginkubasikan mikrospora embriogenik di dalam cawan Petri berukuran 35 mm yang berisi medium cair induksi embrio sebanyak 4 ml dengan kepadatan  $3 \times 10^4$  mikrospora per ml. Kepadatan mikrospora ditentukan melalui sistem pengenceran suspensi mikrospora, yakni dengan menambahkan beberapa mililiter medium embriogenesis ke dalam suspensi mikrospora hingga mencapai kepadatan yang diinginkan. Kepadatan mikrospora dihitung dengan:

$$D_m = \frac{\bar{X}(a)}{Y}$$

keterangan:  $D_m$  = *microspore density* (kepadatan mikrospora per ml)

$\bar{X}$  = rerata jumlah mikrospora per ruang besar *haemocytometer*

(a) = konstanta, yakni 1.000

Y = volume seluruh ruang besar *haemocytometer*, yakni 0,2 mm<sup>3</sup>

Cawan Petri yang telah berisi mikrospora embriogenik disegel dengan *parafilm*, kemudian diinkubasikan pada kondisi gelap pada suhu 25° C hingga terbentuknya embrio.

Dua macam medium induksi embrio yang digunakan adalah modifikasi medium dasar B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968), yakni B<sub>5</sub> yang mengandung 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D (2,4 *Dichlorophenoxy-acetic acid*), dan B<sub>5</sub> yang mengandung 2 mg l<sup>-1</sup> NAA (*Naphtalenacetic acid*). Setiap perlakuan medium diulang minimal 3 kali.

### Variabel Penelitian dan Analisis Data

Variabel penelitian bagi induksi mikrospora embriogenik adalah persentase: (1) mikrospora viabel, (2) mikrospora binukleat asimetris, dan (3) mikrospora binukleat simetris. Sedangkan variabel penelitian bagi induksi embrio mikrospora yang diamati adalah persentase embrio mikrospora yang dihasilkan pada akhir penelitian.

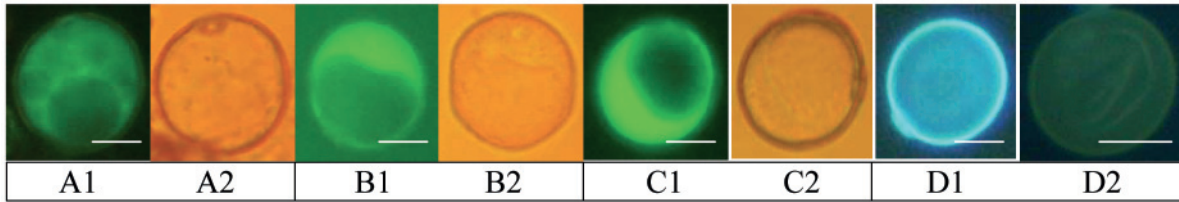
Data ditabulasi dan dihitung nilai rerata dan simpangan bakunya, kemudian dianalisis secara persentase berdasarkan pertimbangan Chew (1976), Mize dan Chun (1988), dan Compton (1994).

### HASIL

Mikrospora dinyatakan viabel apabila proses metabolisme di dalam sel mikrospora masih tetap berlangsung. Salah satu ciri morfologi yang dapat dipakai untuk menentukan viabel tidaknya mikrospora adalah mengamati aktivitas enzim *esterase* melalui teknik pewarnaan FDA. Mikrospora viabel akan menampilkan efek *fluorescent* yakni plasma selnya (sitoplasma) akan berwarna hijau ketika diamati dengan mikroskop *fluorescence*. Bagi mikrospora nonviabel, tidak akan menunjukkan efek *fluorescent* pada sel mikrospora sehingga mikrospora tampak suram (*ghost*) atau tidak bersinar ketika diamati dengan menggunakan mikroskop *fluorescence* (Gambar 1).

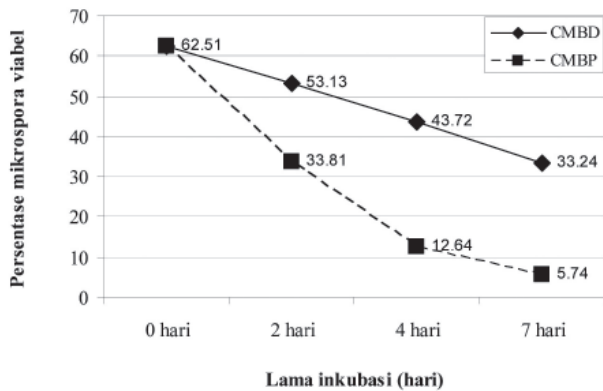
Mikrospora viabel terdiri atas mikrospora berinti satu dan atau berinti dua, sedangkan mikrospora nonviabel adalah mikrospora yang telah mengalami perubahan morfologi seperti rusak, plasmolisis, dan tidak menampakkan intinya. Selain itu, mikrospora nonviabel juga telah berinti tiga dan dipenuhi butir pati (gambar tidak ditampilkan).

Pengamatan viabilitas mikrospora setelah inkubasi cabang malai di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 4 dan 34° C selama 0, 2, 4, dan 7 hari dilakukan melalui teknik pewarnaan inti mikrospora. Teknik pewarnaan inti mikrospora yang diaplikasikan adalah melalui metode DAPI. Hasil penelitian menunjukkan (Gambar 2) bahwa inkubasi cabang malai tebu klon PS862 di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 4° C dapat



**Gambar 1.** Pemeriksaan viabilitas mikrospora segar (belum mendapat praperlakuan stres melalui teknik pewarnaan FDA (Fluorescein diacetate). Panel A1-C2 menunjukkan mikrospora viabel pada fase *late-uninucleate* dengan vacuola yang menempati sebagian besar ruang mikrospora. Panel A1, B1, dan C1 adalah tampilan mikroskop fluorescent, sedangkan panel A2, B2, dan C2 adalah tampilan mikroskop cahaya. Sedangkan panel D1 dan D2 adalah mikrospora nonviabel melalui pewarnaan DAPI; Bar = ± 10 µm.

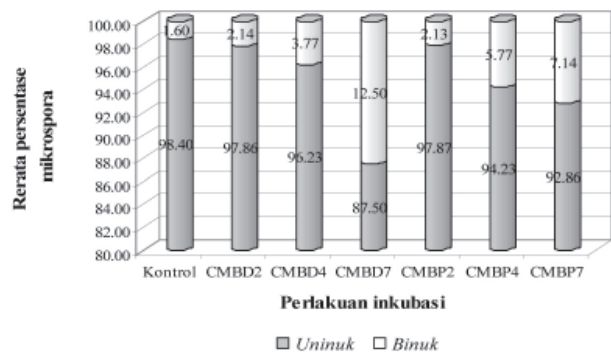
mempertahankan persentase viabilitas mikrospora yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan persentase mikrospora yang masih viabel pada suhu 34° C. Pada percobaan suhu 34° C menunjukkan persentase penurunan mikrospora viabel yang sangat drastis, yakni sisa sekitar 6% pada hari ke-7 (Gambar 2).



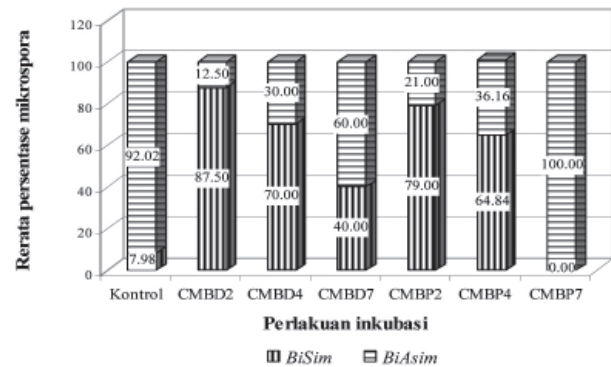
**Gambar 2.** Persentase (%) mikrospora viabel menurut lama inkubasi cabang malai klon PS862 di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 4° C dan pada suhu 34° C (paling kurang 300 mikrospora diamati pada setiap pengamatan; CMBD = cabang malai dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 4° C; CMBP = cabang malai dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 34° C.

Hasil pengamatan rerata persentase mikrospora uninukleat dan binukleat melalui praperlakuan inkubasi cabang malai di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 4 dan 34° C masing-masing selama 0, 2, 4, dan 7 hari, disajikan pada Gambar 3. Penurunan persentase mikrospora berinti satu dan meningkatnya persentase mikrospora berinti dua menunjukkan pola yang sama meskipun dengan frekuensi yang berbeda. Peningkatan persentase mikrospora berinti dua seiring dengan bertambahnya lama waktu inkubasi malai yang dicobakan dicapai dengan frekuensi yang lebih besar pada suhu 4° C dibandingkan dengan pada suhu 34° C. Sebaliknya, rerata persentase mikrospora berinti satu mengalami penurunan seiring dengan semakin

bertambahnya waktu inkubasi cabang malai pada kedua suhu yang dicobakan (Gambar 3).



**Gambar 3.** Rerata persentase (%) mikrospora uninukleat dan binukleat melalui perlakuan stres cabang malai di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu rendah (CMBD = cabang malai dalam medium B pada suhu dingin, 4° C) dan suhu tinggi (CMBP = cabang malai dalam medium B pada suhu panas, 34° C) selama 0, 2, 4, dan 7 hari inkubasi.



**Gambar 4.** Rerata persentase (%) mikrospora binukleat simetris, dan binukleat asimetris melalui perlakuan stres cabang malai di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu rendah (CMBD = cabang malai dalam medium B pada suhu dingin, 4° C) dan suhu tinggi (CMBP = cabang malai dalam medium B pada suhu panas, 34° C) selama 0, 2, 4, dan 7 hari inkubasi.

Mikrospora yang berinti dua terdiri atas: (1) dua inti simetris, dan (2) dua inti tidak simetris. Mikrospora dengan dua inti simetris dan asimetris menunjukkan pola

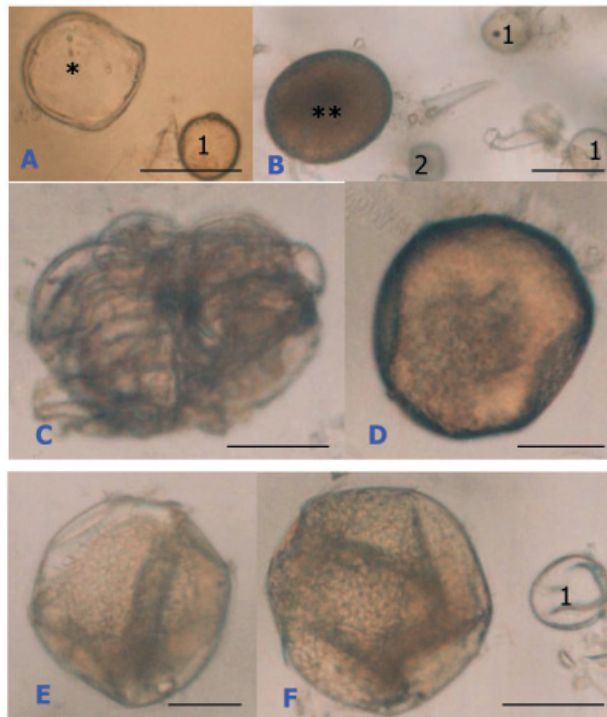
kecenderungan yang sama dengan mikrospora satu dan dua inti. Persentase mikrospora dua inti simetris dan asimetris akibat praperlakuan inkubasi cabang malai pada suhu dan lama starvasi yang sama maupun pada suhu dan lama starvasi yang berbeda, ditampilkan pada Gambar 4. Namun frekuensi mikrospora binukleat simetris mengalami pola penurunan seiring dengan bertambahnya lama waktu inkubasi cabang malai, baik di dalam kondisi suhu 4° C maupun suhu 34° C. Akan tetapi, inkubasi cabang malai di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 4° C selama 7 hari menghasilkan mikrospora binukleat simetris sebesar 40%, sedangkan pada suhu 34° C juga selama 7 hari bahkan menghasilkan 100% mikrospora binukleat asimetris (Gambar 4).

Hasil percobaan pengaruh jenis ZPT di dalam medium induksi embrio B<sub>5</sub> terhadap pembentukan embrio mikrospora (Tabel 1) menunjukkan bahwa hanya medium induksi embrio B<sub>5</sub> yang mengandung NAA 2 mg l<sup>-1</sup> yang mampu menghasilkan proembrio mikrospora (Gambar 5) dan embrio mikrospora (Gambar 6).

**Tabel 1.** Pengaruh 2,4-D dan NAA di dalam medium dasar (B<sub>5</sub>) terhadap induksi embrio mikrospora

Jenis medium dasar	Kepadatan mikrospora ml <sup>-1</sup>	Jumlah proembrio yang terbentuk
Gamborg (B <sub>5</sub> ) + 2 mg l <sup>-1</sup> 2,4-D	± 4 × 10 <sup>4</sup>	0
Gamborg (B <sub>5</sub> ) + 2 mg l <sup>-1</sup> NAA	± 4 × 10 <sup>4</sup>	8

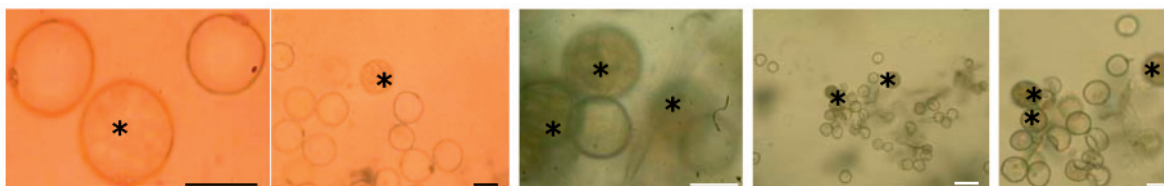
Mikrospora yang dikulturkan di dalam medium induksi embrio (B<sub>5</sub>) setelah lebih dari satu bulan, dipindahkan pada medium induksi embrio B<sub>5</sub> yang baru dan inkubasi dilanjutkan. Setelah lebih dari dua bulan di dalam medium induksi embrio B<sub>5</sub>, beberapa mikrospora yang telah berada pada kondisi seperti pada Gambar 5 mulai mengalami perubahan sebagaimana di tampilan pada Gambar 6a dan 6b. Mikrospora-mikrospora tersebut semakin besar ukurannya dan membentuk struktur seperti kalus atau embrio.



**Gambar 6.** Berbagai bentuk yang menyerupai embrio hasil kultur mikrospora tanaman tebu klon PS862 yang dikulturkan di dalam medium induksi embrio B<sub>5</sub> pada suhu 25° C selama ± 2 bulan pada kondisi gelap. A = mikrospora (\*) mengalami perubahan ukuran jika dibandingkan dengan mikrospora tahap uni-nukleat akhir (1), atau mikrospora nonviabel (2). B = mikrospora (\*\*) merupakan perkembangan lebih lanjut mikrospora (\*), C = struktur mirip kalus dari perkembangan mikrospora (\*\*), dan berturut-turut D, E, dan F = struktur seperti embrio (*embryo-like structure*), juga dari perkembangan mikrospora (\*\*); Bar = ± 50 µm.

**PEMBAHASAN**

Rendahnya mikrospora embriogenik yang diperoleh pada percobaan ini disebabkan oleh rendahnya tingkat viabilitas mikrospora dan jumlah mikrospora yang potensial untuk berkembang menjadi mikrospora embriogenik. Akibatnya, jumlah proembrio yang diperoleh pada percobaan ini sangat rendah, bahkan tidak terbentuk sama sekali pada salah satu medium induksi embrio yang dicobakan (Tabel 1). Besarnya perbedaan persentase mikrospora viabel dan nonviabel antara perlakuan suhu rendah dan suhu tinggi



**Gambar 5.** Mikrospora embriogenik (\*, morfologi berbeda berukuran lebih besar) pada pembentukan proembrio mikrospora yang dikulturkan di dalam medium induksi embrio B<sub>5</sub> selama lebih dari satu bulan induksi; Bar = ± 50 µm.

pada awal percobaan (perlakuan kontrol) dikarenakan oleh adanya praperlakuan suhu rendah sebelum pelaksanaan percobaan. Pada percobaan suhu rendah, malai disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 5° C selama 21 hari sebelum percobaan dilakukan, sedangkan pada percobaan suhu tinggi, mikrospora diisolasi secara langsung dari malai yang tidak mendapatkan perlakuan dingin sebelumnya.

Posisi kontrol pada percobaan suhu rendah dan suhu tinggi berfungsi sebagai titik awal atau patokan informasi akan status viabilitas mikrospora mula-mula. Selain itu, data yang diperoleh dari kontrol juga digunakan untuk mengukur besar perubahan persentase viabilitas mikrospora setelah mendapat perlakuan inkubasi. Dengan demikian, untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh inkubasi bulir terhadap viabilitas mikrospora, data awal harus tersedia atau isolasi mikrospora harus dilakukan sebelum bulir diinkubasikan.

Penurunan rerata persentase mikrospora viabel hingga lebih dari 50% setelah lebih dari dua hari inkubasi (praperlakuan stres) juga dilaporkan oleh peneliti lain pada beberapa tanaman budidaya. Indrianto *et al.* (2004) melaporkan bahwa inkubasi antera selama empat hari pada suhu 33° C bagi tanaman cabai merah besar menghasilkan 29% mikrospora embriogenik. Ini berarti 71% mikrospora sisanya adalah mikrospora non-embriogenik. Demikian pula, Gonzalez dan Jouve (2005) melaporkan bahwa antera tiga genotipe tanaman *triticale* yang mendapat perlakuan inkubasi selama tiga hari menyebabkan kematian mikrospora antara 40–60%. Pada penelitian yang dilakukan oleh Touraev *et al.* (1996) terhadap mikrospora tanaman tembakau yang dikulturkan pada medium starvasi B nir-nitrogen selama tiga hari pada suhu 33° C dilaporkan bahwa mikrospora viabel adalah sebesar 79%, yang berarti 21% sisanya adalah mikrospora nonviabel. Tidak ada perlakuan yang menunjukkan peningkatan jumlah mikrospora viabel seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi bulir. Besarnya viabilitas mikrospora setelah perlakuan inkubasi bulir di dalam medium B pada suhu 4° C dan suhu 34° C selama 0, 2, 4, dan 7 hari, tidak secara mutlak akan menggambarkan besarnya embrio yang dihasilkan bila dilanjutkan pada induksi embriogenesis.

Aspek lain yang ikut menentukan selain viabilitas mikrospora adalah perkembangan pembelahan inti mikrospora sebagai komponen utama dalam pembentukan mikrospora embriogenik. Semakin tinggi persentase mikrospora viabel dan mengalami pembelahan inti secara simetris, akan semakin tinggi pula persentase mikrospora yang berada dalam keadaan embriogenik yang dapat diketahui melalui teknik pewarnaan inti mikrospora. Dalam kondisi mikrospora embriogenik inilah yang mempunyai

peluang besar untuk menjadi embrio ketika dipindah-kulturkan ke dalam medium *in-vitro* yang kaya akan nutrisi bagi proses perkembangan mikrospora embriogenik selanjutnya.

Gambar 4 menunjukkan bahwa persentase tertinggi mikrospora binukleat akibat praperlakuan stres cabang malai di dalam medium starvasi B nir-nitrogen dicapai pada suhu dingin, jika dibandingkan dengan yang dicapai pada suhu panas. Ini dapat diartikan bahwa praperlakuan stres cabang malai tanaman tebu di dalam medium starvasi B nir-nitrogen lebih respons pada suhu dingin dilihat dari aspek proporsi mikrospora binukleat. Apabila dilihat dari proporsi mikrospora binukleat simetris dan asimetris, terlihat bahwa proporsi mikrospora binukleat simetris tertinggi dicapai melalui praperlakuan stres di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu dingin selama 2 hari (Gambar 4). Hasil uji-t *Student* beda rerata proporsi mikrospora binukleat simetris antara praperlakuan stres dingin dan panas di dalam medium starvasi B nir-nitrogen menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Dengan demikian, praperlakuan stres dingin dan panas bagi cabang malai tebu klon PS862 di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada penelitian ini dapat menghasilkan mikrospora binukleat simetris dalam proporsi yang relatif sama.

Embrio adalah struktur dari kumpulan sel yang tumbuh secara teratur berbentuk ELS (*embryo-like structure*, berukuran  $\pm 2$  mm), sedangkan kalus adalah struktur selain embrio yakni sel-sel yang berkembang secara tidak teratur. Pada percobaan induksi embrio mikrospora, perolehan embrio masih sangat rendah karena belum sesuai komposisi medium dasar yang dicobakan dan jumlah ulangan yang rendah. Bila dilihat morfologi mikrospora yang telah mengalami perkembangan lebih lanjut (Gambar 6), nampak bahwa mikrospora tersebut telah memasuki fase kalus (Gambar 6c) dan fase embrio (Gambar 6d, 6e, dan 6f) karena lapisan eksin-intin mikrospora sudah tidak teramati lagi.

Perubahan status pembelahan inti mikrospora embriogenik yang diinkubasikan di dalam medium induksi mikrospora mulai terlihat pada minggu kedua setelah inkubasi. Akan tetapi, karena rendahnya frekuensi mikrospora embriogenik (Gambar 5) di dalam masing-masing dua medium induksi embrio, pembentukan struktur yang menyerupai embrio (*embryo-like structure*) juga sangat terbatas (Gambar 6). Selain itu, hampir semua ulangan bagi setiap medium yang dicobakan (Tabel 1) juga mengalami kegagalan dalam menghasilkan embrio mikrospora karena terbatasnya mikrospora embriogenik hasil percobaan sebelumnya.

Dari aspek media induksi embrio mikrospora, kedua media mempunyai komposisi nutrisi penyusun yang sama dan perbedaannya hanya terletak pada jenis ZPT yang digunakan yakni 2,4-D atau NAA. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa hanya medium B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968) yang mengandung 2 mg l<sup>-1</sup> NAA yang memberi respons terhadap pembentukan struktur seperti embrio (Gambar 6). Ini berarti medium B<sub>5</sub> dengan 2 mg l<sup>-1</sup> NAA dapat menginduksi terbentuknya embrio, sedangkan dengan B<sub>5</sub> + 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D adalah medium yang belum dapat menginduksi terbentuknya embrio melalui kultur mikrospora bagi tanaman tebu klon PS862. Hasil ini tidak sesuai dengan laporan Moore dan Fitch (1990) bahwa pembentukan embrio dan kalus melalui kultur antera beberapa tanaman tebu tipe liar dan tebu hibrida disarankan untuk menggunakan medium MS. Demikian juga, Baksha *et al.* (2003) melaporkan bahwa medium MS (Murashige dan Skoog, 1962) adalah medium yang sesuai bagi pembentukan kalus tanaman tebu *S. officinarum* klon I 273-91 melalui kultur antera.

Adanya perbedaan respons terhadap medium induksi embrio yang digunakan bagi kedua kelompok peneliti di atas dan hasil penelitian ini disebabkan oleh adanya perbedaan genotipe tanaman tebu yang digunakan pada kedua penelitian. Selain itu, karena adanya perbedaan komposisi nutrisi dan ZPT yang digunakan sebagai bentuk modifikasi dari masing-masing medium yang dicobakan. Demikian pula, juga disebabkan oleh perbedaan respon dalam menghasilkan embrio atau kalus antara kultur antera dan kultur mikrospora (Castillo *et al.*, 2000). Sementara itu, melalui percobaan ini masih sulit untuk ditegaskan bahwa medium induksi embrio B<sub>5</sub> adalah medium yang paling sesuai bagi kultur mikrospora tanaman tebu hibrida klon PS862, karena keterulangannya belum dapat ditunjukkan.

Namun demikian, untuk mendapatkan frekuensi mikrospora embriogenik yang lebih tinggi bagi tebu klon PS862, diperlukan praperlakuan stres melalui inkubasi cabang malai di dalam medium starvasi B nir-nitrogen (Kyo dan Harada, 1986) pada suhu 4° C dan 34° C selama dua hari pada kondisi gelap. Sementara itu, untuk mendapatkan struktur seperti embrio mikrospora, diperlukan inisiasi mikrospora embriogenik di dalam medium induksi embrio B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968) yang diperkaya dengan 2 mg l<sup>-1</sup> NAA pada suhu 25° C kondisi gelap.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dikti atas pembiayaan yang diberikan bagi terlaksananya penelitian ini melalui Proyek DUE-Like Dikti.

## KEPUSTAKAAN

- Bhojwani SS dan Razdan MK, 1983. *Plant tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam – Oxford – New York – Tokyo.
- Bhojwani SS dan Bhatnagar SP, 1999. *The embryology of angiosperms*. 4<sup>th</sup> revised and enlarged edition. Vikas Publishing House PVT. LTD. pp. 308–321.
- Castillo AM, Valles MP, dan Cistue L, 2000. Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica*, 113: 1–8.
- Chen ZH, Qian C, Qin M, Wang C, Suo C, Chen F, dan Dheng Z, 1979. The induction of pollen plants of sugarcane. *Annual Report Institute of Genetics Academia Sinica*, pp. 91–93.
- Chew V, 1976. Comparing treatment means: a compendium. *HortScience*, 11: 348–57.
- Chu C, 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Dalam: Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture*, 43–50. Science Press, Peking.
- Compton ME, 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 217–42.
- Custers JBM, Cordewener JHG, Nollen Y, Dons JJM, dan Van Lookeren Campagne MM, 1994. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 13: 267–71.
- Datta SK, 2005. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 89(11): 1870–1878.
- Fitch MM dan Moore PH, 1983. Haploid production from anther culture of *Saccharum spontaneum* L. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 109: 197–206.
- Fitch MM dan Moore PH, 1984. Production of haploid *Saccharum spontaneum* L., - comparison of media for cold incubation of panicle branches and for float culture of anthers. *Journal of Plant Physiology*, 117: 169–78.
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, dan Touraev A, 2007. The resurgence of haploid in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12(8): 368–75.
- Gamborg OL, Miller RA, dan Ojima K, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cellular Research*, 50: 150–8.
- Gonzalez JM, dan Jouve N, 2005. Microspore development during in vitro androgenesis in triticale. *Biologia Plantarum*, 49(1): 23–8.
- Hays DB, Yeung EC, dan Haris RP, 2002. The role of gibberellins in embryo axis development. *Journal of Experimental Botany*, 53(375): 1747–51.
- Herrera JC, Moreno LG, Acuna JR, De Pena M, dan Osorio D, 2002. Colchicine-induced microspore embryogenesis in coffee. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 89–92.
- Heslop-Harrison J, dan Heslop-Harrison Y, 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, 45: 115–20.

- Hu T dan Kasha KJ, 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Chris. *Genome*, 42: 432–41.
- Indrianto A, Barinova I, Touraev A, dan Heberle-Bors E, 2001. Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta*, 212: 163–74.
- Indrianto A, Semiarti E, dan Surifah, 2004. Produksi galur murni melalui induksi embrio-genik mikrospora cabai merah dengan stres. *Zuriat*, 15(2): 133–9.
- Indrianto A, Heberle-Bors E, dan Touraev A, 1999. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryo-genesis in isolated wheat microspores. *Plant Science*, 143: 71–79.
- Kyo M dan Harada H, 1986. Control of the development pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta*, 168: 427–32.
- Marassi MA, Bovo OA, Lavia GL, dan Mroginski LA, 1993. Regeneration of rice doubled haploid using a one step culture procedure. *Journal of Plant Physiology*, 141: 610–4.
- Mize CW, dan Chun YW, 1988. Analysing treatment means in plant tissue culture research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 13: 201–17.
- Moore PH dan Fitch MM, 1990. Sugarcane (*Saccharum* spp.): anther culture studies. *Dalam: Bajaj, Y.P.S., (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 12. Haploid in Crop Improvement I. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg*, pp. 480–97.
- Murashige T dan Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–97.
- Ogawa T, Fukuoka H, dan Ohkawa Y, 1995. Plant regeneration through direct culture of isolated pollen grains in rice. *Breeding Science*, 45: 301–7.
- Ohnoutkova L, Novotny J, Mullerova E, Vagera J, dan Kucera L, 2001. Is a cold pretreatment really needed for induction of *in vitro* androgenesis in barley and wheat? *Dalam: Borut, B. (ed.). Biotechnological Approaches for Utilisation of Gametic Cells. Cost Action 824. Belgium*, pp. 33–37.
- Reinolds TL, 1995. Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33: 1–10.
- Roy B dan Mandal AB, 2005. Anther culture response in indica rice and variation in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local. *African Journal of Biotechnology*, 4(3): 235–40.
- Segui-Simarro JM dan Nuez F, 2007. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/erl271.
- Suaib, Indrianto A, Mirzawan PDN, dan Mangoendidjojo W, 2006. Viabilitas mikrospora tanaman tebu (*Saccharum* spp.) klon POJ3025 pada suhu dan lama inkubasi bulir yang berbeda di dalam medium B dan mannitol untuk pemuliaan haploid secara *in vitro*. *Habitat*, 17(4): 293–304.
- Svensson M dan Johannsson LB, 1994. Anther culture of *fragaria x ananassa*: environmental factors and medium components affecting microspore division and callus production. *Journal of Horticultural Science*, 69(3): 417–26.
- Touraev A, Pfosser M, Vicente O, dan Heberle-Bors E, 1996. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*, 200: 144–52.
- Vergne P, Delvallee I, dan Dumas C, 1987. Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Technology*, 72: 299–304.
- Wang X dan Hu H, 1984. The effect of potato II medium for triticales anther culture. *Plant Science Letters*, 36: 237–39.
- Yang XR, Wang JR, Li HL, dan Li YF, 1980. Studies on the general medium for anther culture of cereals and increasing of the frequency of green pollen plantlets – induction of *Oryza sativa* subsp hsien. *Acta Phytophysiology Sinica*, 6(1): 67–74 (English abstract).
- Zhou WJ, Hagberg P, dan Tang GX, 2002. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. *Euphytica*, 128: 27–34.

Reviewer: **Dr. Retno Mastuti**

**Lampiran 1.** Komposisi medium induksi embrio B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968)

No.	Nama Unsur	Mg <sup>l</sup> -1
1	KNO <sub>3</sub>	2.528,00
2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150,00
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,50
4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150,00
5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub>	134,00
6	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10,00
7	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,00
8	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,000
9	KI	0,75
10	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
11	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
12	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
13	Na <sub>2</sub> EDTA	37,30
14	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80
15	Mio-Inositol	100,00
16	Thiamine-HCl	10,00
17	Nicotinic acid	1,00
18	Pyridoxine-HCl	1,00
19	Maltosa	90.000,00
20	pH	5,80