

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI
TAHUN 2008



**INDUKSI EMBRIOGENESIS MIKROSPORA ANGGREK
Phalaenopsis amabilis, (L) Bl.: UPAYA UNTUK MENDAPATKAN
TANAMAN GALUR MURNI DALAM SATU GENERASI**

Oleh :

Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si., M.Si.
Junairiah, S.Si., M.Kes.
Dra. Edy Setiti Wida Utami, M.S.
Drs. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.

DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2008
Nomor: 436/J03.2/PG/2008 Tanggal : 29 April 2008

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN 2008

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI
TAHUN 2008



**INDUKSI EMBRIOGENESIS MIKROSPORA ANGGREK
Phalaenopsis amabilis, (L) BI.: UPAYA UNTUK MENDAPATKAN
TANAMAN GALUR MURNI DALAM SATU GENERASI**

Oleh :

Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si., M.Si.
Junairiah, S.Si., M.Kes.
Dra. Edy Setiti Wida Utami, M.S.
Drs. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.

DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2008
Nomor: 436/J03.2/PG/2008 Tanggal : 29 April 2008

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN 2008

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN TAHUNAN

1. Judul usulan :

Induksi Embriogenesis Mikrospora Anggrek *Phalaenopsis amabilis*, (L.), Bl.: Upaya Untuk Mendapatkan Tanaman Galur Murni dalam Satu Generasi

2. Ketua peneliti :

- a. Nama Lengkap : Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si., M.Si.
 b. Jenis Kelamin : Perempuan (P)
 c. NIP : 132318834
 d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
 e. Jabatan Struktural : -
 f. Bidang Keahlian : Kultur Jaringan Tumbuhan
 g. Fakultas/Departemen : Saintek/Biologi
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 i. Tim Peneliti

NO	NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/DEPARTEMEN	PERGURUAN TINGGI
1.	Junairiah, S.Si. M.Kes.	Taksonomi Tumbuhan	Saintek/Biologi	Universitas Airlangga
2.	Dra. Edy Setiti Wida Utami, M.S.	Kultur Jaringan Tumbuhan	Saintek/Biologi	Universitas Airlangga
3.	Drs. H. Hery Purnobasuki, M.Si. Ph.D.	Anatomi Tumbuhan	Saintek/Biologi	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka Waktu Penelitian yang diusulkan : 2 tahun
 b. Biaya total yang diusulkan : Rp 100.000.000,-
 c. Biaya yang disetujui tahun 2008 : Rp 35.000.000,-

Surabaya, 9 Desember 2008



Ketua Peneliti

Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si. M.Si.
 NIP. 132318834

Menyetujui
 Ketua Lembaga Penelitian



Dr. Bambang Sektiari L., DEA. drh.
 NIP. 131 837 004

A. LAPORAN HASIL PENELITIAN

RINGKASAN

RINGKASAN

Penelitian Induksi Embriogenesis Mikrospora Anggrek *Phalaenopsis amabilis*, (L.), Bl.: Upaya Untuk Mendapatkan Tanaman Galur Murni dalam Satu Generasi, pada tahun pertama ini bertujuan mengetahui stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. selama perkembangan bunga berdasarkan ukuran kuncup bunga, mengetahui metode yang tepat untuk mengisolasi mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl., mengetahui kemampuan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. untuk diinduksi menjadi mikrospora embriogenik, mengetahui stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. yang responsif terhadap induksi embriogenesis dengan stres suhu dan medium starvasi dan mengamati perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. menjadi mikrospora embriogenik. Penentuan stadium perkembangan mikrospora dilakukan dengan pengecatan DAPI. Kuncup bunga dikelompokkan menjadi lima kelompok. Kelompok I berukuran 0,4-0,8 cm, kelompok II berukuran 0,9-1,2 cm, kelompok III berukuran 1,3-1,6 cm, kelompok IV berukuran 1,7-2,0 cm, dan kelompok V berukuran 2 cm-mekar. Mikrospora dari kelima kelompok tersebut diisolasi dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan *glassroad*. Perlakuan dingin 4°C dilakukan pada kucup bunga selama 7 hari. Perlakuan suhu panas 35°C dan medium starvasi (medium B) diberikan pada mikrospora terisolasi selama 4 hari. Setelah perlakuan suhu panas dan medium B mikrospora dikultur dimedium AG. Mikrospora diamati dalam keadaan segar, dihitung jumlah mikrospora yang viabel dan diamati perkembangan inti pada setiap tahap perlakuan induksi. Dari penelitian ini diperoleh hasil kuncup bunga anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dengan ukuran 0,4-1,6 cm berada pada stadium uninukleat, ukuran 1,7 cm sampai mekar berada pada stadium binukleat, metode yang tepat untuk mengisolasi mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. adalah metode *glassroad*, mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dapat diinduksi menjadi mikrospora embriogenik dengan stres suhu dan medium starvasi, stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. yang responsif terhadap induksi embriogenesis dengan stres suhu dan medium starvasi adalah uninukleat akhir, perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. menjadi mikrospora embriogenik ditandai dengan adanya perubahan struktur morfologi mikrospora berupa hilangnya granula-granula pada sitoplasma, ukuran membesar dan adanya pembelahan simetri (tidak terbentuk inti vegetatif dan inti generatif).

Kata Kunci: *P. amabilis* (L.) Bl, Orchid, androgenesis, mikrospora

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkat limpahan rahmat-Nya penelitian ini telah terlaksana walaupun belum sebagaimana penulis harapkan. Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga.
2. Pimpinan Fakultas Sains Teknologi Universitas Airlangga.
3. Ketua Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
4. Pengelolah Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Departemen Biologi Fakultas Sains Teknologi Universitas Airlangga.
5. Kepala Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.
6. Rekan-rekan yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini yang belum penulis sebutkan satu persatu.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan dari tulisan ini. Akhirnya, semoga karya penelitian ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Desember 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN	iii
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Embriogenesis Mikrospora (Androgenesis).....	5
2.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Androgenesis.....	6
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	9
3.1 Tujuan Penelitian	9
3.2 Manfaat Penelitian	9
BAB IV METODE PENELITIAN	10
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	10
4.2 Bahan Penelitian	10
4.4 Bagan alir rencana penelitian tahun pertama.....	11
4.5 Prosedur Penelitian	12
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	15
5.1 Stadium Perkembangan Mikrospora Berdasarkan Ukuran Kuncup Bunga.....	15
5.2 Penentuan Metode Isolasi yang Tepat untuk Mikrospora Anggrek <i>P. amabilis</i> (L.) Bl.	19
5.3 Perkembangan Mikrospora Setelah Perlakuan Dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).....	20
5.4 Induksi Embriogenesis Mikrospora Dengan Stres Suhu Panas (35°C) dan Medium Starvasi	21
5.5 Pembelahan Simetri dan Perkembangan Kultur pada Medium AG	24
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	28
6.1 Kesimpulan.....	28
6.2 Saran.....	28
DAFTAR PUSTAKA.....	29
LAMPIRAN	30
B. DRAF ARTIKEL ILMIAH.....	36
C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN.....	53

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel	
5.1 Stadium perkembangan mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga.....	18
5.2 Jumlah mikrospora terisolasi dengan metode <i>glassroad</i> dan <i>magnetic stirer</i>	19
5.3 Stadium perkembangan mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga.....	20
5.4 Stadium perkembangan mikrospora setelah mendapatkan stres panas dan medium starvasi.....	21
5.5 Jumlah mikrospora viabel setelah mendapatkan perlakuan panas dan medium starvasi dalam prosentase.....	24
5.6 Stadium perkembangan inti mikrospora setelah 2 minggu kultur di medium AG.....	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tiga jalur perkembangan mikrospora selama androgenesis.....	5
5.1 Bunga anggrek <i>P. amabilis</i> (L.) Bl. berbagai ukuran.....	15
5.2 Mikrospora segar selama perkembangan bunga.....	17
5.3 Mikrospora anggrek <i>P. amabilis</i> (L.) Bl dengan pengecatan DAPI.....	19
5.4 Mikrospora setelah mendapatkan perlakuan panas dan stadium starvasi.....	22
5.5 Mikrospora tanpa pengecatan setelah 2 minggu kultur di medium AG	25
5.6 Mikrospora dengan pengecatan DAPI setelah 2 minggu kultur di medium AG.....	26
5.7 Mikrospora setelah satu bulan di medium AG.....	27

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Anggrek adalah tanaman yang terkenal akan keindahan bunganya, sehingga mempunyai nilai ekonomi dan estetika yang tinggi (Suryowinoto, 1995). Indonesia mempunyai sekitar 5000 jenis anggrek alam dan sekitar 25.000-30.000 jenis yang ada di dunia (Gunadi, 1985). Anggrek alam Indonesia dikenal mempunyai nilai estetika yang tinggi sehingga menjadi incaran para kolektor dan penggemar anggrek dari seluruh dunia.

Pengelolaan yang benar, dengan memperhatikan aspek ekologi, botani, dan teknologi, kekayaan anggrek Indonesia dapat menjadi aset ekspor yang layak untuk dibanggakan. Penganggrek Indonesia juga akan menjadi pelopor bisnis peranggrekan.

Ironisnya saat ini masyarakat Indonesia hanya menjadi penikmat anggrek-anggrek silangan dari manca negara, yang mana keindahan anggrek tersebut berasal dari induk silangan anggrek alam Indonesia. Hal ini dapat dilihat dari anggrek-anggrek impor yang membanjiri toko-toko bunga. Bahkan untuk induk silangan, penganggrek Indonesia masih banyak yang menggunakan anggrek manca negara.

Hasil diskusi panel "Selamatkan Anggrek Spesies Indonesia" di Taman Anggrek Indonesia Permai TMII tanggal 14 Februari 2006, saat ini Anggrek Indonesia dihadapkan pada permasalahan sebagai berikut: 1)hilangnya anggrek alam (anggrek spesies) karena rusaknya ekosistem (konservasi alam, penebangan hutan, kebakaran hutan) dan pengambilan tanpa batas dari alam karena tingginya minat terhadap anggrek asli Indonesia, 2)ekspor anggrek alam secara illegal, 3)perlu perbaikan dalam praktek Implementasi CITES (*Convention on International Trade in Dangered Species of Wild Flora and Fauna* terutama untuk jenis anggrek yang termasuk dalam apendiks II CITES, tapi otoritas tidak melarang seluruh ekspor anggrek non hibrida, 4)penelitian dan pengembangan belum mendukung tersedianya bibit baru dan budidaya yang dapat berkompetisi, walaupun Indonesia memiliki plasma nutfah anggrek yang besar, 5) budidaya anggrek asli Indonesia oleh pihak luar negeri, tidak ada *benefit sharing* bagi masyarakat, 6)tingginya anggrek silangan dari luar negeri yang masuk ke Indonesia melalui pintu impor.

Untuk mengatasi hal tersebut diperlukan usaha konservasi yang ditopang kemampuan penyediaan bibit dengan membudidayakan tanaman anggrek secara *in situ* maupun *ex situ* dan upaya pemuliaan tanaman dengan mempertahankan sifat aslinya (Iswanto, 2001).

Anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. adalah salah satu jenis yang sangat terkenal akan keindahannya sehingga dinobatkan sebagai **Puspa Pesona Bangsa Indonesia**. *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. berbunga besar, berwarna putih, membulat saat mekar penuh sehingga tampak seperti bulan, mempunyai bibir (labelum) kuning menyala, bunganya tahan lama serta mampu berbunga sepanjang tahun. Keistimewaan tersebut menyebabkan anggrek ini sangat populer dijadikan sebagai induk dalam persilangan. Pelaku hibridisasi anggrek banyak yang menggunakan anggrek ini untuk mendapatkan anggrek hibrida berwarna putih. Warna putih sangat diperlukan untuk memperoleh perpaduan harmonis dengan warna lain dalam satu rangkaian bunga (Dressler, 1993).

Di Indonesia terdapat 6 ekotipe *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. yang endemik di Pulau Jawa, Kalimantan, Sumatra, Sulawesi, Maluku dan Papua (Dressler, 1993), namun anggrek itu semakin sulit dijumpai di habitat aslinya, karena adanya eksploitasi secara besar-besaran di hutan menyebabkan destruksi pada habitatnya dan populasi *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. menjadi sedikit, bahkan terancam punah. Dari daftar tumbuhan langka, *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. tercatat menempati urutan 160 dari 240 tumbuhan langka di Indonesia (Dressler, 1993). Oleh karena itu perlu dilakukan upaya pemuliaan tanaman dengan mempertahankan sifat aslinya.

Pengembangan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. dapat dilakukan secara generatif, dengan perbanyakan tanaman melalui biji. Pengembangan secara generatif sangat menguntungkan dalam bisnis karena dalam satu buah anggrek dapat dihasilkan biji yang jumlahnya jutaan (2-3 juta biji/buah), namun karena tidak adanya galur murni mengakibatkan biji yang dihasilkan mempunyai variasi genetik yang besar sehingga sulit memprediksi hasil silangan yang didapat (Suryowinoto., 1995).

Tiga dasawarsa terakhir ini berkembang teknik kultur mikrospora. Berkembangnya teknik ini membawa angin segar pada kemajuan bioteknologi, yang tentunya akan meningkatkan dunia industri dan pertanian yang memanfaatkan kemajuan bioteknologi (Grout & Robert, 1995).

Kultur mikrospora mempunyai kegunaan dalam praktek agroindustri. Manfaat utamanya adalah mengurangi waktu dalam pembentukan varietas baru. Pemuliaan

tanaman konvensional membutuhkan 10 tahun untuk membentuk varietas baru, sedangkan dengan teknik kultur mikrospora membutuhkan 3-4 tahun (Ulrich *et al.*, 1984). Yang kedua adalah dapat mempercepat sifat-sifat dalam keadaan homozigot dibanding dengan metode *backcross*. Yang ketiga, efisiensi seleksi dapat memperlihatkan fenotip tanaman yang tidak tampak karena efek dominan. Yang keempat adalah tanaman dihaploid dari penyaringan rekombinan yang layak didapat dalam jumlah besar, padahal pada populasi diploid konvensional sangat sedikit (Dunwell, 1985; Kasha *et al.*, 1996).

Terbentuknya tanaman homozigot dari teknik kultur mikrospora menyediakan sarana studi diferensiasi sel dan alternatif generasi dari mikrospora, dari perkembangan normal (gametofitik) ke arah perkembangan sporofitik. Ini berarti menyediakan sarana penelitian pergantian generasi dan penurunan ekspresi gen serta regulasi selama dua fase siklus hidup (Dunwell, 1985). Keberhasilan perakitan jalur hidup tersebut memungkinkan dibuatnya tanaman transgenik (Indrianto *et al.*, 1999) atau kultivar baru (Omerod & Caligari, 1994) yang tahan terhadap penyakit dan kondisi yang ekstrim (Isnaeni, 1988).

Haploidi yang dihasilkan dari kultur mikrospora dapat digunakan untuk studi kuantitatif genetika, antara lain deteksi interaksi gen, estimasi variasi genetik, deteksi *linkage*, estimasi jumlah efek gen dari karakter kuantitatif dan lokasi poligen (Dunwell, 1985; Ferrie & Keller, 1995) sehingga memudahkan mendeteksi terjadinya mutasi (Bhojwani & Bhatnagar, 1981; Gunawan, 1988; Isnaeni, 1988; Zhang *et al.*, 1994). Aplikasi terbaru untuk pemetaan genome, ini tentunya strategis untuk pemuliaan tanaman khususnya dalam transformasi gen (Kasha *et al.*, 1996).

Keberhasilan kultur mikrospora telah banyak dilaporkan keberhasilannya dengan metode yang terus berkembang. Nitsch *et al.* (1972) dalam Raghavan (1997) menyimpulkan bahwa penggunaan hormon untuk induksi mikrospora sudah tidak begitu esensial. Penggunaan hormon yang tidak efektif digantikan dengan perlakuan suhu. Kyo & Harada (1986) membuktikan bahwa penggunaan medium starvasi gula dan nitrogen (medium B) sangat efektif digunakan untuk induksi embriogenesis mikrospora tembakau.

Selanjutnya penggunaan kombinasi perlakuan stres suhu dingin, panas dan medium starvasi telah banyak digunakan. Stres suhu dingin $\pm 4^{\circ}\text{C}$, panas $\pm 33^{\circ}\text{C}$ dan medium starvasi gula dan nitrogen berhasil menginduksi embriogenesis mikrospora *Triticum aestivum* (Indrianto *et al.* 1999). Stres suhu panas 35°C berhasil menginduksi embriogenesis mikrospora *Brassica campestris* (Hamaoka *et al.*, 1991). Keberhasilan penggunaan stres suhu dan medium starvasi untuk induksi embriogenesis mikrospora membuat teknik embriogenesis mikrospora menjadi sangat ekonomis dan lebih murah.

Penelitian ini menekankan pada tujuan untuk mikropropagasi melalui embriogenesis mikrospora untuk pemuliaan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., sehingga perlu dilakukan penelitian awal tentang mekanisme pembentukan dan perkembangan embrio mikrospora yang akan memberikan informasi dasar yang menunjang penentuan langkah-langkah pemuliaan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. baik secara konvensional maupun teknik molekuler.

Diharapkan embrio mikrospora yang dihasilkan dari penelitian ini mampu berkecambah menjadi planlet sehingga dapat digunakan sebagai sumber induk silangan yang akan membantu usaha pemuliaan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

Embriogenesis mikrospora telah banyak dilaporkan pada beberapa spesies tanaman, namun penelitian mengenai embriogenesis mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. belum pernah dilaporkan.

Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini akan menggali potensi plasma nutfah anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. sebagai induk silangan berupa galur murni dari perkembangan sel mikrospora melalui induksi embriogenesis mikrospora secara *in vitro*. Hasil yang didapat dari penelitian ini diharapkan akan membawa perkembangan dunia peranggrekan Indonesia sehingga ekspor anggrek meningkat dan akhirnya meningkatkan pendapatan negara.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, pada penelitian tahap pertama dapat diambil permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. selama perkembangan bunga ?
2. Bagaimana mengisolasi mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dengan metode yang tepat ?
3. Dapatkah mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. diinduksi untuk menjadi mikrospora embriogenik?
4. Pada stadium apa mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. responsif untuk diinduksi menjadi mikrospora embriogenik?
5. Bagaimana perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. menjadi mikrospora embriogenik?

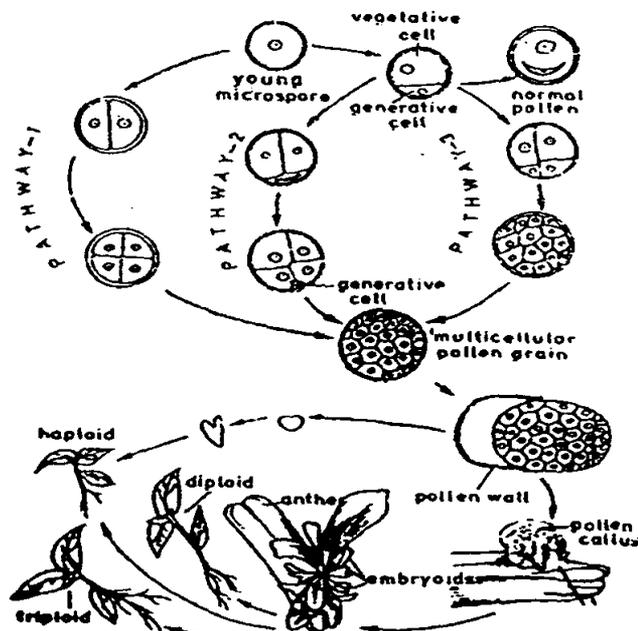
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Embriogenesis Mikrospora (Androgenesis)

Embriogenesis mikrospora adalah pembentukan embrio dari sel mikrospora. Perbedaan embrio mikrospora dengan embriogenesis somatik, adalah mikrospora mempunyai jumlah ploidi setengah dari induknya. Embriogenesis mikrospora disebut juga Androgenesis (Bhojwani & Bhatnagar, 1981; Raghavan, 1997).

Secara normal mikrospora membelah secara asimetri menghasilkan sel vegetatif yang besar dan sel generatif yang kecil. Di bawah kondisi khusus perkembangan gametofitik dapat dialihkan ke arah perkembangan sporofitik untuk mendapatkan suatu tanaman (Ferrie *et al.*, 1996).

Jalur embriogenesis mikrospora dimungkinkan melalui tiga jalur pembelahan, yakni :1) membelah simetris, sel vegetatif dan sel generatif atau keduanya terlibat dalam perkembangan sporofitik, 2) membelah asimetris, sel vegetatif terlibat dalam perkembangan sporofitik, dan 3) membelah asimetris, sel vegetatif dan generatif terlibat dalam perkembangan sporofitik (Gambar 2.1., Bhojwani & Bhatnagar, 1981).



Gambar 2.1. Tiga jalur perkembangan mikrospora selama androgenesis (Bhojwani & Bhatnagar, 1981)

Menurut Raghavan (1997) keterlibatan kedua sel hasil mitosis dalam perkembangan sporofitik memungkinkan terjadinya fusi antar sel generatif dengan satu atau dua sel vegetatif atau terjadi endopoliploidi sel generatif, sehingga didapatkan embrio yang nonhaploid.

Pembentukan embrio mikrospora tidak lepas dari siklus sel. Dediferensiasi sel tanaman dapat dianggap sebagai reinisiasi dari pembelahan sel. Setelah pembelahan mitosis pertama pada mikrospora, sel generatif dengan cepat mengalami replikasi DNA dan tertahan pada fase G2 dari siklus sel, sedangkan sel vegetatif tertahan pada fase G1 dari siklus sel (Zarsky *et al.*, 1992).

Kemampuan mikrospora untuk masuk siklus sel baru selama stres (perlakuan induksi) adalah aspek penting dalam androgenesis. Mikrospora tembakau diisolasi pada fase G1 mengalami replikasi DNA selama induksi dengan starvasi dan perlakuan panas, kemudian terhenti dan tertahan pada fase G2. Hanya setelah dipindah ke medium yang diperkaya dan diinkubasi pada suhu kamar, siklus sel dapat dilanjutkan. Mikrospora yang diisolasi pada fase G2 mengalami mitosis selama stres pada awal perlakuan. Sel generatif langsung masuk siklus sel baru kemudian terhenti dan tertahan pada fase G2, sedangkan sel vegetatif tidak mengalami replikasi DNA. Pada polen biseluler, sel vegetatif mengalami replikasi DNA selama perlakuan stres suhu dan starvasi nitrogen dan karbohidrat tertahan lagi pada fase G2. Sel generatif tidak terpengaruh oleh stres awal perlakuan sehingga tetap tertahan pada fase G2 setelah dipindah ke medium yang diperkaya, atau dengan kata lain sel generatif tidak memberikan kontribusi pada pembentukan embrio pada tembakau (Ferrie *et al.*, 1996).

2.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Androgenesis

2.2.1 Faktor genotip tanaman donor

Hasil penelitian pada beberapa tanaman, faktor genotip tanaman donor sangat berpengaruh terhadap keberhasilan induksi androgenesis. Dari 43 kultivar *Lycopersicon esculentum* dan pada 18 galur *Arabidopsis*, hanya 3 dari masing-masing spesies yang mampu menjadi jaringan haploid. Sembilan dari 159 genotif jagung yang mampu berkembang menjadi embrio atau kalus haploid (Raghavan, 1997).

Perbedaan genotip tanaman donor memberikan respon yang berbeda pula terhadap induksi androgenesis karena ekspresi gen suatu tanaman bersifat spasial dan temporal. Misalnya ekspresi gen pembentukkan amilum pada mikrospora, amilogenesis pada setiap tahap perkembangan mikrospora mempengaruhi mikrospora kompeten diinduksi androgenik atau tidak (Sangwan & Sangwan-Norreel, 1987).

2.2.2 Tahap perkembangan mikrospora

Tahap perkembangan mikrospora yang responsif terhadap induksi embriogenesis belum bisa dipastikan. Berkisar antara tahap uninukleat sampai binukleat awal. *Datura* sangat responsif jika diinduksi pada tahap uninukleat. *Nicotiana* pada tahap binukleat awal, *Triticum* pada tahap uninukleat akhir, *Brassica* pada tahap uninukleat sampai binukleat awal dan *Barley* pada uninukleat awal (Sangwan & Sangwan-Norreel, 1996).

Hal tersebut diatas ada kaitannya dengan siklus sel. *Brassica napus* diinduksi pada fase G1 akan melanjutkan siklusnya ke fase G2 setelah dibebaskan dari stres (Sangwan & Sangwan-Norreel, 1996).

2.2.3 Komposisi medium

Beberapa spesies merespon induksi androgenesis jika dikultur pada medium sederhana yang mengandung makronutrien, mikronutrien, vitamin, myo-inositol dan sukrosa. Sukrosa sangat populer sebagai sumber karbon, namun untuk barley, kentang, dan gandum, sukrosa diganti dengan maltosa. Sukrosa dikonsumsi dengan cepat dibanding maltosa. Hal ini menyebabkan akumulasi sejumlah racun di mikrospora (Raghavan, 1997).

Selain sumber karbon, penggunaan hormon juga penting, Hormon kelompok auksin (IAA, NAA, IBA) dan kinetin (Zeatin, Kinetin, Benzilaminopurin) efektif meningkatkan produksi embrio mikrospora (Raghavan, 1997).

Penggunaan sumber nitrogen yang berbeda juga mempengaruhi keberhasilan induksi androgenesis. Penggunaan Kasein hidrolisat dan asam amino mampu meningkatkan produksi embrio mikrospora (Sangwan & Sangwan-Norreel, 1996).

2.2.4 Stres suhu dan perlakuan starvasi

Stres suhu dingin mempunyai pengaruh (1) menunda mitosis haploid pertama, (2) meningkatkan viabilitas mikrospora embriogenik dan meningkatkan permeabilitas dinding mikrospora, (3) menunda perkembangan mikrospora, (4) menginduksi pembelahan simetri, dan (5) memodifikasi dinding mikrospora dan menyebabkan disorganisasi tapetum (Sangwan-Sangwan-Norreel, 1996).

Stres suhu panas 30-33°C diperlukan untuk induksi androgenesis (Raghavan, 1997). Stres suhu panas ini sangat efektif jika digabungkan dengan penggunaan medium starvasi gula dan nitrogen (Touraev *et al.*, 1997).

2.2.5 Peran dinding antera dan tapetum

Pada saat pra-perlakuan dinding antera dan tapetum *Nicotiana tabacum*, *Petunia hibrida* dan *Datura innoxia* berperan meningkatkan jumlah mikrospora embriogenik dengan cara mengeluarkan suatu zat yang memicu induksi. Disamping itu, inhibitor juga dapat dihasilkan

oleh produk senescen jaringan anther yang dapat menyebabkan polen mengalami degenerasi dan penghambatan pertumbuhan embrio yang terbentuk (Raghavan, 1997).

2.2.6 Kondisi tanaman donor

Pada sebagian besar tanaman yang tumbuh di temperatur rendah akan mempunyai respon androgenesis lebih tinggi. Kondisi pertumbuhan tanaman donor sangat dipengaruhi oleh intensitas cahaya yang diterima, status nutrisi, dan temperatur, yang dalam keadaan optimum akan mempengaruhi frekuensi androgenesis. Temperatur rendah pada perlakuan terhadap tanaman donor akan meningkatkan perkembangan sporofitik yang berhubungan dengan polen dimorfisme (Palmer & Keller, 1997).

Penyemprotan hormon yang memicu *male sterility* ke tanaman donor mempunyai pengaruh terhadap keberhasilan embriogenesis mikrospora, karena memungkinkan pembelokan perkembangan mikrospora normal (Palmer & Keller, 1997).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

TAHUN PERTAMA

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan akhir penelitian ini adalah mendapatkan embrio dari mikrospora anggrek yang mampu berkembang menjadi tanaman galur murni dalam satu generasi, sedangkan, tujuan khusus dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. selama perkembangan bunga berdasarkan ukuran kuncup bunga
2. Mengetahui metode yang tepat untuk mengisolasi mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl.
3. Mengetahui kemampuan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. untuk diinduksi menjadi mikrospora embriogenik
4. Mengetahui stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. yang responsif terhadap induksi embriogenesis dengan stres suhu dan medium starvasi
5. Mengamati perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. menjadi mikrospora embriogenik.

3.2 Manfaat Penelitian

Hasil yang ditargetkan pada penelitian tahun pertama adalah mengetahui kemampuan isolat mikrospora pada stadium yang tepat untuk diinduksi menjadi mikrospora embriogenik dengan stres suhu dan medium starvasi. Langkah awal ini penting untuk dilalui karena keberhasilan induksi embriogenesis mikrospora dipengaruhi oleh stadium perkembangan mikrospora serta stres suhu yang tepat.

Hasil akhir penelitian ini merupakan temuan baru tentang metode pemuliaan tanaman untuk mendapatkan tanaman galur murni dalam satu generasi. Tanaman galur murni merupakan induk silangan yang diharapkan dalam upaya pemuliaan tanaman untuk mendapatkan tanaman hibrida dengan kualitas yang bagus. Dengan didapatkan tanaman anggrek galur murni diharapkan dapat memacu perkembangan peranggrecan Indonesia, sehingga untuk mendapatkan hibrida-hibrida yang berkualitas sudah tidak tergantung oleh bangsa lain karena pada dasarnya Indonesia mempunyai kekayaan anggrek yang melimpah. Temuan ini nanti diharapkan dapat mendukung program pemerintah untuk menutup pintu impor tanaman hias menuju kemandirian produksi bibit pada tahun 2013.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Untuk Analisis sitologi, struktur dan perkembangan dilakukan di Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Biologi UGM. Penelitian dimulai pada bulan Maret sampai November 2008.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Bahan Tanaman

Pada penelitian ini digunakan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl yang diperoleh dari Pusat Anggrek Royal Orchid, Prigen Jawa Timur. Eksplan yang dipakai adalah mikrospora yang akan diisolasi dari antera bunga yang masih dalam keadaan kuncup. Mikrospora yang dipakai dalam penelitian ini adalah mikrospora dari setiap kelompok ukuran kuncup bunga.

4.2.2 Bahan Kimia

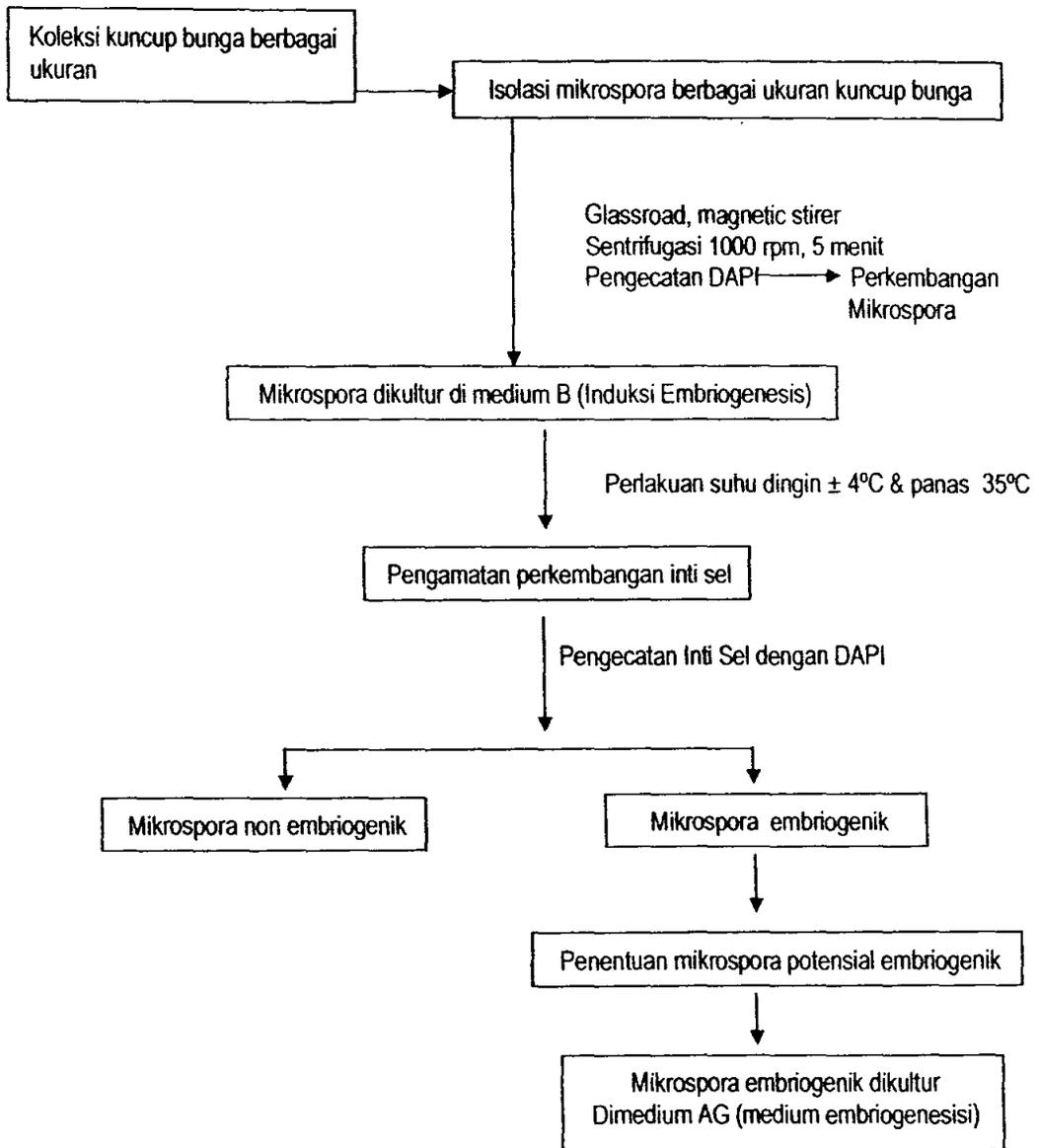
Bahan kimia yang dipakai adalah bahan kimia penyusun media Knudson C (George & Sherrington, 1992, lampiran 1) yang dimodifikasi (Medium AG, Wahyuni & indrianto, 2001), medium B (Kyo & Harada, 1986, lampiran 2), DAPI (4,6-Diamidino phenylindol), dan bahan kimia untuk membuat preparat anatomi.

4.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlemeyer, cawan petri gelas $\Phi = 3\text{cm}$, $\Phi = 5\text{cm}$, $\Phi = 15\text{cm}$, gelas pengaduk, tabung reaksi, pinset, skalpel, lampu bunsen, *scalpel blade*, tabung sentrifugasi, sentrifuge, inkubator, kulkas, timbangan kasar, timbangan analitik, millipore, *shyringe*, penyaring, autoklaf, mikroskop inverted *flourescent*. Lemari penabur *Laminair Air Flow* (LAF) yang dilengkapi dengan HEPA filter mess ukuran $0,2\mu\text{m}$, *sprayer*, pensil, gelas benda dan gelas penutup.

4.4 Bagan alir rencana penelitian tahun pertama

TAHUN PERTAMA : isolasi mikrospora, penentuan stadium mikrospora yang potensi embriogenik dan induksi embriogenesis mikrospora



4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

4.5.1.1 Sterilisasi alat

Alat-alat disterilkan dengan autoklaf 15 menit, tekanan 1,5 atm, temperatur 121°C.

4.5.1.2 Sterilisasi bahan

4.5.1.2.1 Sterilisasi media

Medium AG disterilkan dengan milipore filter steril dan medium B disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit 1,5 atm, 121 °C.

4.5.1.2.2 Sterilisasi eksplan

Eksplan berupa mikrospora dari kuncup bunga anggrek setelah mendapat perlakuan dingin. Bunga disterilisasi dengan Bayclin (*sodium hypochloride* 5,25 %) selama 10 menit, dibersihkan dengan akuades dua kali. Sterilisasi eksplan dilakukan di dalam LAF.

4.5.2 Isolasi Mikrospora

Isolasi mikrospora untuk penelitian ini dilakukan dengan metode *glassroad* dan dengan *magnetic stirer*.

4.5.2.1 Isolasi mikrospora dengan *magnetic stirer*

Isolasi mikrospora dengan *magnetic stirer* dilakukan dalam keadaan aseptis, dengan cara polinaria steril dimasukkan kedalam botol flakon yang berisi medium B (satu polinaria untuk satu ml medium B) dan magnet kemudian ditutup. Botol flakon yang sudah siap distirer dengan menggunakan *magnetic stirer* selama 10 menit. Setelah itu larutan yang berupa medium B dan mikrospora terisolasi diambil, kemudian dimasukkan kedalam tabung sentrifus untuk disentrifugasi selama 5 menit, 5000 rpm. Pelet berwarna kuning adalah mikrospora terisolasi.

4.5.2.2 Isolasi mikrospora dengan metode *glassroad*

Isolasi mikrospora dengan metode *glassroad* juga dilakukan dalam keadaan aseptis, dengan cara polinia steril dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi medium B (satu polinaria untuk satu ml medium B), kemudian polinaria digerus dengan menggunakan gelas pengaduk sampai hancur. Setelah itu larutan diambil dengan pipet, selanjutnya dimasukkan kedalam tabung sentrifus untuk disentrifugasi selama 5 menit, 5000 rpm. Pelet berwarna kuning adalah mikrospora terisolasi.

4.5.2.3 Penentuan Stadium Perkembangan Mikrospora

Setiap kelompok ukuran kuncup bunga dilihat stadium perkembangannya. Perkembangan mikrospora dikorelasikan dengan ukuran kuncup bunga. Penentuan stadium mikrospora berdasarkan letak inti, ukuran inti, dan jumlah inti (Raghavan, 1997) Dalam penelitian ini digunakan pengecatan DAPI untuk mengamati perkembangan inti.

4.5.2.4 Perlakuan dingin

Perlakuan dingin diberikan pada kuncup bunga dalam karangan, dengan cara kuncup bunga dibungkus aluminium foil kemudian karangan bunga diletakkan di tabung yang berisi air, dengan posisi pangkal bunga terendam air, selanjutnya disimpan dalam lemari es yang suhunya $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 7 hari.

4.5.2.5 Perlakuan panas dan medium starvasi

Kuncup bunga setelah mendapat perlakuan dingin disterilkan dengan Bayclin (*sodium hypochloride* 5,25%) selama 10 menit, dibuka, antera diangkat dengan pinset kemudian diletakkan di cawan petri $\phi = 10$ cm. Operkulum dipisahkan dari polinia dengan skapel. Polinia dipindah ke tabung reaksi yang berisi 1ml medium B. Selanjutnya mikrospora digerus dengan gelas pengaduk, filtrat dipindah ke tabung *sentrifuge*, lalu dicuci dengan medium B dua kali, disentrifugasi selama 5 menit, dengan kecepatan 1000 rpm. Medium B dibuang dan filtrat merupakan mikrospora terisolasi dipindah ke cawan petri $\phi = 6$ cm, yang berisi 3ml medium B. Tutup petri disegel dengan parafilm. Mikrospora dalam medium B disimpan dalam inkubator pada suhu 35°C selama 4 hari.

4.5.2.6 Penanaman di medium AG (medium embriogenesis)

Kultur mikrospora di medium B setelah mendapat perlakuan panas diambil dengan pipet dipindah ke tabung *sentrifuge*. Disentrifugasi selama 5 menit, 1000 rpm medium B dibuang. Filtrat ditanam di cawan petri $\phi = 3,5$ cm yang berisi 2 ml medium AG. Cawan petri ditutup, kemudian disegel dengan parafilm. Kultur diletakkan ditempat gelap pada suhu 25°C selama 2 minggu.

4.5.2.7 Analisis sitologis

a. Pengamatan segar

Mikrospora diisolasi dari antera, isolat mikrospora diletakkan di atas gelas benda, ditetesi dengan medium B secukupnya, ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya.

b. Pengecatan DAPI

Pengecatan DAPI dimaksudkan untuk melihat perkembangan inti mikrospora. Mikrospora difiksasi dengan alkohol 70% : Asam Asetat Glasial (1:3,v/v) selama 15 menit. Selanjutnya dicuci dengan alkohol 70% 2x, dituang larutan DAPI 20 µl selama 15 menit, ditetesi dengan gliserin sebanyak dua tetes. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop fluorescen.

4.5.2.8 Penghitungan viabilitas mikrospora

Mikrospora viabel adalah mikrospora yang mampu bertahan hidup. Pada percobaan ini, yang dimaksud dengan mikrospora viabel adalah mikrospora yang masih utuh sitoplasmanya dan belum terplasmolisis.

Penghitungan dilakukan dengan cara mengamati kultur dengan mikroskop inverted. Selanjutnya jumlah mikrospora dihitung, baik mikrospora viabel maupun mikrospora yang plasmolisis sampai mencapai jumlah total 300 mikrospora. Penghitungan dilakukan paling tidak pada lima bidang pandang mikroskop (atas, bawah, kanan, kiri, dan tengah, dengan perbesaran mikroskop 200X).

Prosentase jumlah mikrospora yang viabel diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Mikrospora viabel} / 300 \times 100\%$$

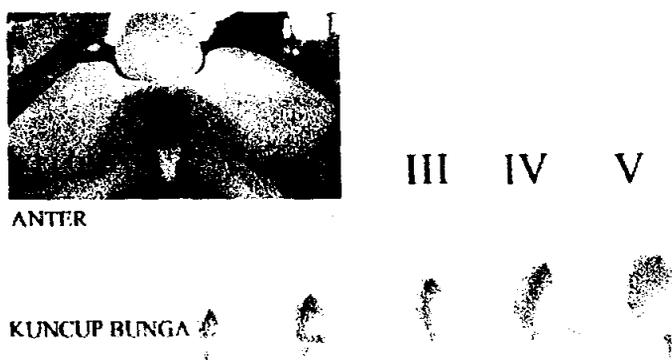
Penghitungan viabilitas mikrospora dilakukan tiga kali ulangan.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Stadium Perkembangan Mikrospora Berdasarkan Ukuran Kuncup Bunga

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan induksi embriogenesis mikrospora adalah stadium perkembangan mikrospora. Tahap tertentu akan memberikan hasil yang optimum dalam induksi embriogenik (Nitsch, 1983; Raghavan, 1997). Pada tanaman anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. penentuan stadium perkembangan mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga belum pernah dilakukan (dilihat dari publikasi yang ada), sehingga dalam penelitian ini dilakukan langkah awal dalam kultur mikrospora yakni mengetahui stadium perkembangan mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga.

Stadium perkembangan mikrospora ditentukan berdasarkan ukuran kuncup bunga. Hal ini dilakukan untuk memudahkan mengambil mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga dengan stadium perkembangan yang optimum untuk induksi embriogenesis mikrospora. Langkah awal dilakukan pengelompokan kuncup bunga berdasarkan ukuran (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. Bunga anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. berbagai ukuran (I. Kuncup bunga ukuran 0,4-0,8 cm, II. Kuncup bunga ukuran 0,9-1,2 cm, III. Kuncup bunga ukuran 1,3-1,6 cm, IV. Kuncup bunga ukuran 1,7-2,0 cm, V. Kuncup bunga ukuran 2 cm-mekar)

Setelah bunga dikelompokkan berdasarkan ukuran, kemudian mikrospora diisolasi dari antera dan diamati morfologinya tanpa pengecatan.

Morfologi mikrospora selama perkembangan bunga di paparkan pada Gambar 5.2. Pada kelompok I mikrospora tidak dapat diisolasi atau hancur saat isolasi sehingga morfologinya tidak dapat diamati. Pada kelompok ini mikrospora diperkirakan masih berada pada stadium sel induk mikrospora (Tabel 1). Dari pengamatan irisan anatomi polinia dapat

,x.kro3iu39y4itoriyuefredilihat bahwa mikrospora tetrad belum terbentuk (Gambar 5.2.A). Pada saat ini dinding mikrospora masih sangat tipis dan belum ada penebalan sekunder. Dinding mikrospora masih berupa dinding kalosik (seperti kalose), sehingga mudah hancur saat digerus (Yeung, 1987).

Pada kelompok II (Gambar 5.2.B), mikrospora relatif mudah diisolasi, walau dinding mikrospora dan sekat antar tetrad tidak begitu jelas terlihat. Pada Tabel 5.1. menunjukkan bahwa mikrospora pada kelompok ini berada pada stadium tetrad (uninukleat awal). Dinding mikrospora sudah mulai terbentuk lebih sempurna, berupa dinding kalose. Dinding kalose menyelubungi masing-masing mikrospora dan menyelubungi mikrospora dalam keadaan tetrad (Arditti, 1992).

Pada kelompok III (Gambar 5.2.C) mikrospora lebih mudah diisolasi. Pada kelompok ini mikrospora berada pada stadium uninukleat (Tabel 5.1). Dinding mikrospora dan sekat antar tetrad sudah terlihat tegas. Menurut Arditti (1992) mikrospora pada fase ini mempunyai dinding lebih kuat. Pada stadium ini mulai disintesis komponen-komponen eksin dan intin (penyusun dinding polen dewasa) sampai terjadi pembelahan mitosis yang menghasilkan sel generatif dan sel vegetatif.

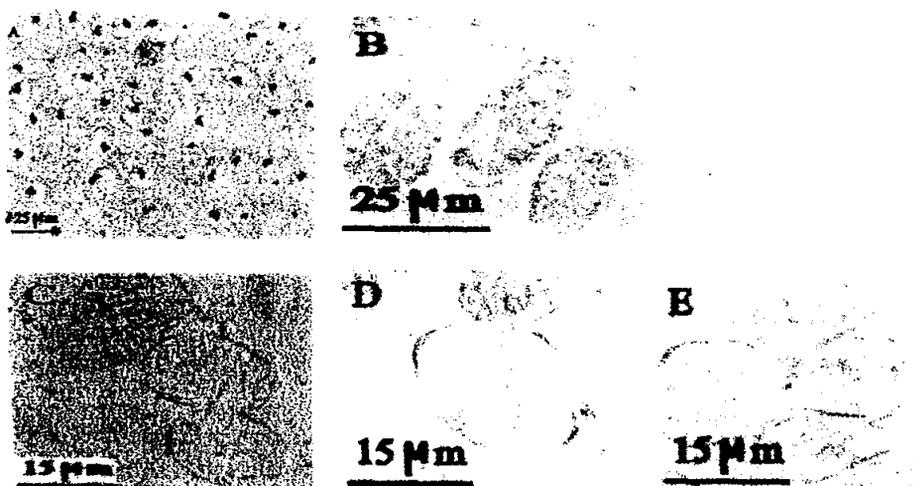
Pada kelompok IV (Gambar 5.2. D) dinding mikrospora dan sekat antar tetrad sangat tegas, meskipun mikrospora berada pada fase biseluler (Tabel 5.1). Pada stadium biseluler dinding kalose sudah tidak kelihatan dan eksin mengakumulasi dinding bagian luar polinium (Arditti, 1992).

Pada kelompok V (Gambar 5.2.E) mikrospora masih dalam keadaan tetrad, tetap bergranula dan volume tampak makin besar. Pada kelompok ini mikrospora sudah sangat dewasa dan siap untuk dikeluarkan (Tabel 5.1, Gambar 5.2.E). Pada kelompok ini mikrospora berada pada fase polen masak. Dinding polen dewasa berlapis, lapisan luar berupa eksin, yang terdiri dari seksin dan neksin, lapisan dalam berupa intin (Arditti, 1992).

Pada Gambar 5.2.B-E terlihat bahwa mikrospora dalam keadaan sebagai mikrospora tetrad sampai polen dewasa. Sitoplasma tidak jernih tapi penuh dengan granula, sehingga inti dan vakuola tidak tampak. Keadaan ini berbeda dengan mikrospora pada tanaman angiospermae lainnya. Pada Lilium, mikrospora setelah stadium tetrad berupa mikrospora tunggal dan sitoplama jernih tanpa granula, vakuola dan inti terlihat jelas dengan mikroskop cahaya biasa (Bhojwani & Bhatnagar, 1984).

Keberadaan mikrospora sebagai mikrospora tetrad sampai dewasa seperti pada mikrospora anggota tribus Epidendroidae lainnya. Hal ini dikarenakan adanya hubungan

sitoplasmik antar tetrad yang besar. Pada tanaman berbunga lainnya hubungan sitoplasmik hanya terjadi antara stadium sel induk mikrospora selama profase meiosis (Arditti, 1992).



Gambar 5.2. Mikrospora segar selama perkembangan bunga, (A. Irisan membujur polinia Kelompok I (0,4-0,8cm), B. Kelompok II (0,9-1,2cm), C. Kelompok III (1,3-1,6cm), D. Kelompok IV (1,7-2,0cm), E. Kelompok V (2,0cm-mekar), 1. Dinding mikrospora, 2. Sitoplasma, 3. Sekat antar tetrad)

Pada *Epidendrum ibaguens*, hubungan sitoplasmik tidak ada tapi masih ada sisa plasmodesmata yang menghubungkan sel induk mikrospora. Tidak jelas apakah plasmodesmata tersebut berfungsi atau tidak, tetapi jelas mengikat mikrospora dalam keadaan tetrad. Selain faktor di atas pembentukan dinding sel yang tidak lengkap selama perkembangan mikrospora juga mengikat mikrospora dalam keadaan tetrad. Dinding mikrospora yang tidak lengkap dan jembatan sitoplasmik mempertahankan mikrospora dalam keadaan tetrad secara struktur dan fisiologi (Brown & Lemmon, 1994).

Selain mikrospora dalam keadaan tetrad, keunikan mikrospora anggrek adalah terdapat granula-granula yang menutupi keseluruhan mikrospora. Tidak begitu jelas apakah granula tersebut adalah kenampakan dari organel-organel sel ataukah hanya artifak sel saja. Hasil penelitian Wahyuni & Indrianto (2004) granula-granula pada mikrospora anggrek *Dendrobium anita* adalah amilum.

Volume mikrospora terlihat meningkat dalam setiap perkembangannya. Peningkatan ini bisa terjadi karena penyimpanan cadangan makanan, peningkatan volume sitoplasma atau kedua-duanya (Pacini, 1996).

Arditti (1992) menyatakan bahwa pada stadium sel induk mikrospora merupakan sel yang mempunyai sitoplasma yang padat, vakuola sangat dominan, retikulum endoplasmik

tanpa ribosom, intensitas ribosom rendah dan butir amilum sudah kelihatan di plastida. Organel-organel tersebut akan menurun saat meiosis dan muncul lagi setelah meiosis dan meningkat lagi saat akan terjadi pembelahan mitosis. Pada awal stadium biseluler, sel vegetatif mengandung inti yang besar, vakuola kecil, mitokondria berlimpah, plastida sangat banyak, retikulum endoplasmik, aparatus golgi, proplastida, dan organel lainnya. Sel generatif mempunyai inti yang relatif kecil tapi sangat padat, vakuola besar, sitoplasma tidak banyak, sedikit mitokondria, diktiosom dan plastida sangat jarang, retikulum endoplasmik dan organel yang mengandung lemak.

Mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. mempunyai bentuk tetrad yang bermacam-macam. Tipe yang dapat diamati adalah tipe tetrahedral, rhomboidal, bentuk T, dan linear. Penentu bentuk polen tetrad adalah bagaimana dinding polen tertumpuk (Yeung, 1987).

Hasil pengamatan mikrospora dengan pengecatan DAPI disajikan dalam Tabel 5.1 dan Gambar 5.3. Pengecatan dengan DAPI menjadi penting untuk mengamati stadium perkembangan mikrospora karena inti tidak teramati tanpa pengecatan.

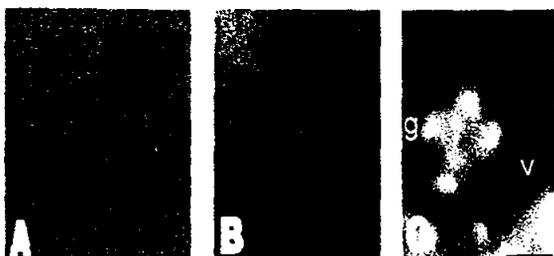
Tabel 5.1. Stadium perkembangan mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga

Kelompok	Ukuran (cm)	Jumlah Mikrospora ^{*)}		
		Uninukleat	Uninukleat akhir	Binukleat
I	0,4-0,8	100±0		
II	0,9-1,2	275±10	24,3±10	
III	1,3-1,6	114±13	171±4	15±12
IV	1,7-2,0		41,67±6	258,3±6
VI	2,0-mekar			100±0

^{*)}dalam 300 mikrospora yang dihitung

Stadium perkembangan mikrospora dapat dibedakan menjadi tahap uninukleat, uninukleat akhir, dan binukleat (Tabel 5.1, Gambar 5.3). Tahap uninukleat dan uninukleat akhir dapat dibedakan dengan pengecatan DAPI berdasarkan perbedaan ukuran inti dan letak inti. Inti uninukleat lebih kecil dibandingkan dengan uninukleat akhir. Hal ini disebabkan oleh pada stadium uninukleat akhir, kromatin pada inti meregang dan menyebar lebih merata (Hamaoka *et al.*, 1991). Inti mikrospora berada ditepi pada stadium uninukleat akhir.

Berdasarkan hasil pengamatan stadium perkembangan mikrospora, untuk kepentingan induksi embriogenesis mikrospora digunakan mikrospora dari kuncup bunga kelompok II, III, dan IV.



Gambar 5.3. Mikrospora angrek *P. amabilis* (L.) Bl dengan pengecatan DAPI (A. Uninukleat, B. Uninukleat akhir, C. Binukleat, g. Inti generatif, v. Inti vegetatif, Bar: 20 μ m)

5.2 Penentuan Metode Isolasi yang Tepat untuk Mikrospora Angrek *P. amabilis* (L.) Bl.

Isolasi mikrospora adalah tahapan penting dalam kultur mikrospora. Embriogenesis mikrospora melalui kultur mikrospora mempunyai banyak kelebihan dibandingkan dengan metode yang lain, walau metode ini relatif lebih sulit dibandingkan dengan metode yang lain.

Dalam penelitian ini dipilih 2 metode isolasi mikrospora yang pertama menggunakan *magnetic stirer* dan yang kedua menggunakan metode *glassroad*.

Masing-masing pelet, baik yang diisolasi dengan *magnetic stirer* ataupun dengan *glassroad* diencerkan dengan medium B (satu polinaria untuk satu ml medium B). Setelah diencerkan, larutan mikrospora diamati dengan mikroskop *inverted* dan dihitung jumlah mikrospora yang terisolasi. Hasil pengamatan disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 5.2. Jumlah mikrospora terisolasi dengan metode *glassroad* dan *magnetic stirer*.

Isolasi No.	Jumlah mikrospora terisolasi (polinaria/ml/bidang pandang*)	
	<i>Magnetic Stirer</i>	Metode <i>Glassroad</i>
1	43	295
2	56	286
3	48	292
Rata-rata	49	291

*penghitungan dilakukan dengan perbesaran mikroskop 200X

Isolasi mikrospora dengan metode *glassroad* menghasilkan mikrospora terisolasi dengan jumlah jauh lebih banyak dibandingkan dengan *magnetic stirrer*. Hasil ini berbeda jika

mmmditerapkan pada gandum (Indrianto *et al.*, 1999) dan cabe besar (Supeno *et al.*, 2004). Hasil yang berbeda terjadi pada anggrek karena morfologi dan organisasi mikrospora anggrek dalam antera berbeda dengan gandum dan lombok. Mikrospora anggrek terkumpul dalam bentuk polinaria yang kompak dan padat sehingga memerlukan kekuatan gerusan untuk melepaskannya menjadi monosel.

Hasil ini mendasari bahwa untuk pelaksanaan induksi embriogenesis mikrospora dengan kultur mikrospora digunakan metode isolasi mikrospora dengan *glassroad*.

5.3 Perkembangan Mikrospora Setelah Perlakuan Dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$)

Perlakuan dingin suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ diberikan pada karangan bunga selama tujuh hari, dengan cara menyimpan kuncup bunga di dalam kulkas. Setelah 7 hari didalam kulkas, mikrospora diisolasi diamati tanpa pengecatan dan diamati dengan pengeccatan DAPI untuk melihat perkembangan inti mikrospora.

Pada pengamatan mikrospora tanpa pengecatan, kenampakkan mikrospora masih sama ketika masih belum diberi perlakuan dingin. Mikrospora bergranula, berupa mikrospora tetrad dan tidak tampak adanya pemisahan. Mikrospora juga masih tampak dalam keadaan segar dan tidak terplasmolisis. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dingin tidak memberikan efek merusak pada mikrospora.

Tabel 5.3. Stadium perkembangan mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga

Kelompok	Ukuran (cm)	Jumlah mikrospora *)		
		Uninukleat	Uninukleat akhir	Binukleat
II	0,9-1,2	268 \pm 5	32 \pm 9	
III	1,3-1,6	94 \pm 2	182 \pm 4	24 \pm 10
IV	1,7-2,0		32 \pm 5	278 \pm 2

*) dalam 300 mikrosporan yang dihitung

Pengamatan perkembangan inti menunjukkan adanya perkembangan inti pada masing-masing kelompok (Tabel 5.3). Perlakuan suhu dingin tidak menghambat pembelahan mitosis haploid pertama. Perlakuan dingin dimaksudkan untuk efektifitas induksi embriogeneiss mikrospora (Ferrie *et al.*, 1996), seperti pada *wheat* dan *barley* (Huang and Sunderland, 1982 dalam Kasha *et al.*, 1996)

Menurut Sangwan-Norreel dalam Ferrie *et al.*, (1996) perlakuan dingin bertujuan untuk menunda mitosis haploid pertama, meningkatkan viabilitas polen embriogenik, meningkatkan dinding polen, menunda perkembangan polen, menunda pembelahan simetri, memodifikasi dinding mikrospora dan menyebabkan disorganisasi tapetum.

5.4 Induksi Embriogenesis Mikrospora Dengan Stres Suhu Panas (35 °C) dan Medium Starvasi

Perlakuan panas diberikan pada mikrospora anggrek pada suhu 35 °C dalam medium starvasi. Yang dimaksud dengan medium starvasi adalah medium B, yaitu medium miskin hara, khususnya miskin unsur nitrogen dan gula (Kyo and Harada, 1986). Perlakuan panas dan medium starvasi dilakukan selama 4 hari dalam ruang gelap. Perlakuan ini dimaksudkan untuk induksi mikrospora embriogenik. Pada perlakuan suhu panas dan medium starvasi dilakukan pengamatan perkembangan inti dengan pengecatan DAPI, pengamatan viabilitas, dan pengamatan mikrospora tanpa pengecatan.

Tabel 5.4. Stadium perkembangan mikrospora setelah mendapatkan stres panas dan medium starvasi

Kelompok	Ukuran (cm)	Jumlah mikrospora ¹⁾		
		Uninukleat	Uninukleat akhir	Binukleat
II	0,9-1,2	186±5	114±9	
III	1,3-1,6	24±2	271±4	5±3
IV	1,7-2,0		12±5	288±2

¹⁾dalam 300 mikrospora yang dihitung

Data perkembangan inti dapat dilihat pada Tabel 5.4, terlihat bahwa perubahan perkembangan inti mikrospora tidak begitu mencolok, hanya pada kelompok II dan III terjadi peningkatan jumlah mikrospora uninukleat akhir, sedangkan pada mikrospora binukleat jumlahnya berkurang dibanding sebelum mendapatkan perlakuan panas. Bertambahnya jumlah mikrospora uninukleat akhir disebabkan mikrospora uninukleat akhir lebih tahan terhadap perlakuan panas dan medium starvasi, sedangkan mikrospora binukleat kurang tahan terhadap perlakuan panas dan medium starvasi. Hal ditunjukkan oleh data pengamatan mikrospora tanpa pengecatan, bahwa mikrospora setelah mengalami perlakuan panas dan medium starvasi banyak yang plasmolisis (Tabel 5.5 dan Gambar 5.4). Secara umum induksi embriogenesis optimum diberikan pada mikrospora uninukleat akhir sampai premitosis haploid

pertama, artinya mikrospora pada tahap tersebut mampu bertahan terhadap induksi embriogenesis berupa stres panas dan medium starvasi (Raghavan, 1997).

Perkembangan inti mikrospora selama perlakuan panas dan starvasi tidak lepas dari perubahan siklus sel. Hal ini dilihat dari perkembangan polen secara *in vitro* atau secara normal dicirikan dengan peristiwa-peristiwa siklus sel yang dikendalikan secara ketat. Mikrospora tembakau diisolasi pada fase G1 mengalami replikasi DNA selama induksi starvasi dan perlakuan panas, kemudian tertahan pada fase G2. Mikrospora yang diisolasi pada fase G2, mitosis akan terjadi selama perlakuan panas dan starvasi kemudian sel generatif tertahan pada fase G2 dan sel vegetatif tidak mengalami sintesis DNA (Zarsky *et al.*, 1992; Ferrie *et al.*, 1996; Raghavan, 1997). Jadi selama perlakuan stres suhu dan medium starvasi, siklus sel agak tertahan.

Pengamatan mikrospora tanpa pengecatan dilakukan dengan mikroskop *inverted*. Pada pengamatan segar dihitung jumlah sel yang diduga embriogenik dan dilakukan pengamatan kenampakan mikrospora yang diduga embriogenik. Mikrospora embriogenik pada *wheat* lebih besar dari mikrospora non embriogenik (Tourraev *et al.*, 1996).



Gambar 5.4. Mikrospora setelah mendapatkan perlakuan panas dan stadium starvasi, (A. mikrospora viabel, B. mikrospora terplasmolisis, 1. dinding mikrospora, 2. sitoplasma, 3, sekat antar tetrad, Bar: 15 μ m)

Dari pengamatan tanpa pengecatan, diperoleh hasil bahwa ada perubahan kenampakan mikrospora setelah 4 hari mendapatkan perlakuan panas dan starvasi.

Perubahan yang terjadi adalah sebagian mikrospora menjadi plasmolisis dan sebagian tidak terplasmolisis. Mikrospora yang tidak plasmolisis menunjukkan perubahan kenampakan dibanding dengan mikrospora sebelum mendapatkan perlakuan panas dan medium starvasi.

Perubahan yang terjadi adalah ukuran relatif lebih besar, sitoplasma tampak lebih jernih, granula menghilang sehingga sitoplasma tampak transparan, walau demikian inti tetap tidak terlihat dan vakuola tidak teridentifikasi. Mikrospora tampak lebih kompak. Beberapa mikrospora tidak menunjukkan struktur tetrad atau sekat-sekat antar mikrospora menghilang. Mikrospora yang demikian diduga bersifat embriogenik (Gambar 5.4).

Sel embriogenik dicirikan oleh vakuola besar, tidak ada butir-butir amilum, berkurangnya jumlah dan ukuran plastida, jumlah mitokondria berkurang, pengelompokan organel-organel mengelilingi inti pada polen, tidak ada lisosom dan sedikit ribosom (Herbele-Bors, 1989 dalam Raghavan, 1997). Perubahan subseluler juga terjadi pada mikrospora embriogenik. Ini meliputi lapisan fibril pada sisi luar sitoplasma, peningkatan sintesis sitoplasmik, peningkatan sintesis sitoplasmik, peningkatan ribosom, dediferensiasi organel, penurunan lipid dan amilum. Inti sel menunjukkan perbedaan. Inti mikrospora embriogenik lebih besar dibanding dengan mikrospora non embriogenik (Zhou, 1980 dan Norreel 1970 dalam Keller *et al.*, 1996).

Mikrospora membesar diduga disebabkan oleh vakuola yang besar. Pada fase ini inti juga membesar karena mikrospora diperkirakan tertahan pada fase G2 setelah mengalami replikasi DNA pada fase S (Zarsky *et al.*, 1992) dan mikrospora berada pada fase uninukleat akhir, yang mana kromatin dalam keadaan meregang dan menyebar (Hamaoka *et al.*, 1991).

Mikrospora menjadi lebih transparan karena granula menghilang. Hilangnya granula kemungkinan karena granula adalah amilum, yang dimanfaatkan sebagai sumber karbon pada saat mikrospora mengalami perlakuan panas dan starvasi. Pada saat perlakuan starvasi mikrospora tidak mendapatkan makanan berupa sumber karbon dari media, sumber karbon di media berupa manitol. Manitol di medium B berperan sebagai osmotikum pada kultur, bukan sebagai sumber karbon (Raghavan, 1997). Sementara itu pada mikrospora embriogenik atau pada saat perlakuan panas dan starvasi mengalami penurunan sintesis lemak dan amilum (Ferrie *et al.*, 1996).

Pada Tabel 5.5 dapat dilihat bahwa kelompok III menghasilkan mikrospora viabel paling besar, sebesar 87%, kelompok II sebesar 52,66% dan kelompok IV sebesar 16,4%. Keadaan data yang demikian dapat dijelaskan oleh banyak literatur bahwa secara umum induksi embriogenik berhasil optimum bila diberikan pada mikrospora uninukleat akhir sampai premitosis akhir. Dari Tabel 5.3 dapat dilihat bahwa kelompok III mikrospora sebagian besar

mmberada pada stadium uninukleat akhir. Induksi embriogenesis mikrospora juga optimum diberikan pada tahap uninukleat akhir pada wheat (Orshinky & Sadavaiah, 1994; Torraev et al., 1996; Indrianto et al., 1999), *Capssicum annum* (Supeno et al., 2004), *Asparagus officinalis* (Zhang et al., 1994), *Brasica campestris* (Hamaoka et al., 1991).

Tabel 5.5. Persentase mikrospora viabel setelah mendapatkan perlakuan panas dan medium starvasi dalam prosentase

Keiompok	Ukuran (cm)	Persentase mikrospora viabei (%)	Warna peilet
II	0,9-1,2	52,65	Kuning keputihan
III	1,3-1,6	87,16	Kuning keputihan
IV	1,7-2,0	16,4	Kuning

Viabilitas mikrospora juga menentukan keberhasilan induksi embriogenesis mikrospora. Viabilitas mikrospora menunjukkan daya tahan hidup mikrospora setelah mendapatkan perlakuan panas dan medium starvasi. Jadi hanya mikrospora yang viabel yang mampu melanjutkan siklus hidupnya.

Ferrie et al., (1996) menunjukkan beberapa data bahwa starvasi sangat esensial untuk induksi embriogenesis. Indrianto et al., (1999) menunjukkan bahwa perlakuan panas 33°C selama 4 hari dalam medium B mampu meningkatkan embriogenesis mikrospora pada wheat. Perlakuan panas 34° C dan medium starvasi mampu menginduksi embriogenesis mikrospora tanaman anggrek *Dendrobium anita* (Wahyuni dan Indrianto, 2001). Perlakuan panas 35°C mampu meningkatkan pembelahan simetri pada kultur mikrospora *Brassica campestris* (Hamaoka et al., 1991) dan pada *Capsicum annum* (Supeno et al., 2004). Kultur mikrospora *Barley* dan *Wheat* pada media tanpa sukrosa tapi manitol (medium B) didapat frekuensi mikrospora viabel yang tinggi (Hoekstra et al., 1992).

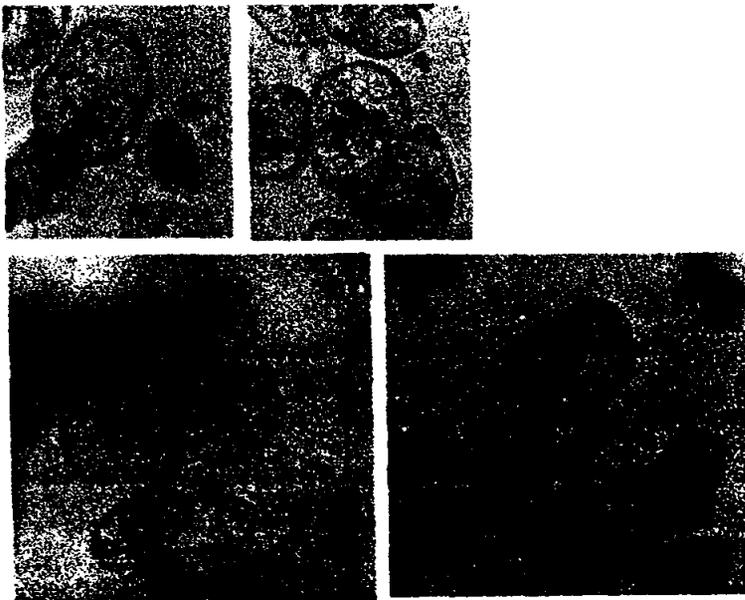
5.5 Pembelahan Simetri dan Perkembangan Kultur pada Medium AG

Setelah mendapatkan perlakuan dingin, panas, dan starvasi, mikrospora dipindah medium yang diperkaya yakni medium AG. Pemandahan ini dimaksudkan untuk memberi kondisi agar mikropora embriogenik berkembang menjadi embrio. Selama di medium AG, perkembangan mikrospora diamati setiap minggu. Pengamatan tanpa pengecatan kultur pada medium AG dilakukan dengan menggunakan mikroskop inverted.

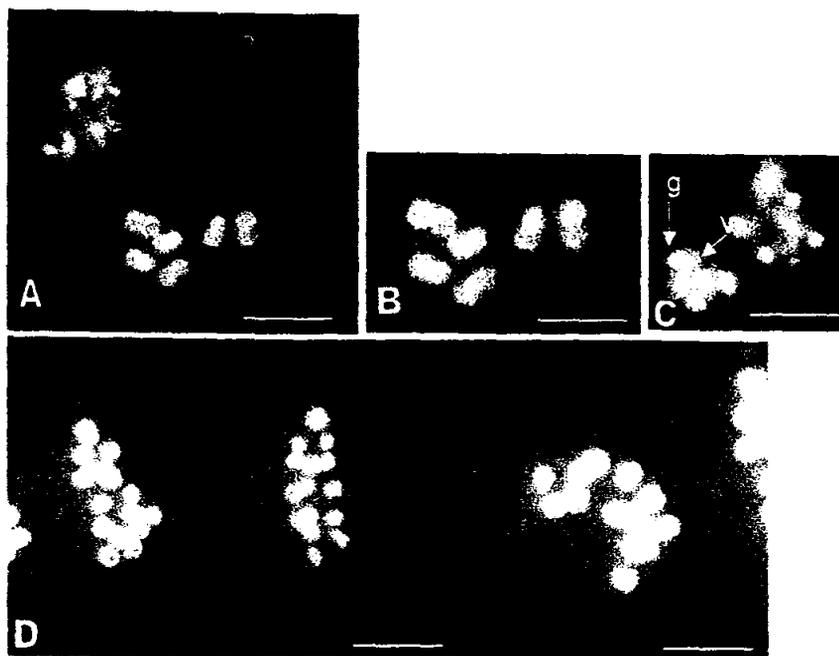
Perkembangan mikrospora di medium yang diperkaya sangat bervariasi. Beberapa mikrospora yang diduga embriogenik bergranula lagi, ukuran mengecil, warna menjadi keruh dan akhirnya mengalami plasmolisis.

Tourraev *et al.*, (1996) menunjukkan hasil penelitian pada *wheat* bahwa beberapa mikrospora tidak mengalami perubahan sitologi maupun morfologi selama perlakuan panas dan starvasi, setelah dipindah ke medium yang diperkaya nutrisi dan sukrosa akan melanjutkan perkembangan secara normal yang diindikasikan dengan akumulasi amilum dan selanjutnya mikrospora tersebut mati setelah 6-8 hari setelah kultur. Akumulasi amilum secara cepat pada mikrospora yang dikultur pada media yang diperkaya akan diikuti kematian, seperti pada tembakau.

Pada minggu kedua, mikrospora yang masih viabel menunjukkan perubahan yang menakutkan. Ukuran bertambah besar, warna masih tampak jernih walau mulai muncul granula-granula yang tersebar tipis dan merata. Beberapa mikrospora yang viabel kehilangan sekat antar tetrad. Mikrospora tampak kompak. Pada kondisi ini inti dan valvula tidak teramati dengan jelas (Gambar 5.5). Setelah pengamatan morfologi menunjukkan adanya perubahan struktur dilakukan pengecatan dengan DAPI untuk mengetahui pembelahan pada inti (Gambar 5.6).



Gambar 5.5. Mikrospora tanpa pengecatan setelah 2 minggu kultur di medium AG, Bar. 15µm



Gambar 7. Mikrospora dengan pengecatan DAPI setelah 2 minggu kultur di medium AG, (A. Mikrospora viabel dan mikrospora terplasmolisi, B. Mikrospora dengan pembelahan simetri, C. Mikrospora dengan pembelahan asimetri, D. Mikrospora multinukleat, v. Inti vegetatif, g. Inti generatif, Bar: 15µm)

Dari Tabel 5.6 dapat dilihat bahwa pembelahan simetri lebih banyak dibandingkan dengan pembelahan asimetri, padahal secara normal polen akan membelah secara asimetri menjadi inti vegetatif dan inti generatif. Penyimpangan pembelahan mikrospora menjadi pembelahan simetri karena adanya perlakuan panas dan medium starvasi. Pada saat diinduksi dengan perlakuan panas dan medium starvasi terjadi penyusunan ulang dari mikrotubul sehingga inti berpindah ke tengah dan menghasilkan pembelahan simetri. Pengaturan mikrotubul dan sitoskeleton kelihatan berperan pada pembelahan simetri dan proses perkembangan embrio selanjutnya (Zaki & Dickinson, 1991; Simmonds *et al.*, 1991; Pauls *et al.*, 2006).

Tabel 5.6. Stadium perkembangan inti mikrospora setelah 2 minggu kultur di medium AG

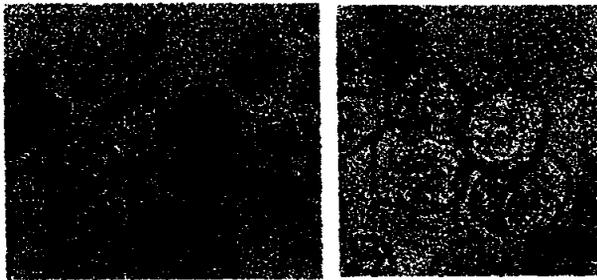
Jumlah mikrospora ¹⁾			
Uninukleat	Binukleat		Multinukleat
	Simetri	Asimetri	
21±2	234±51	15 ±3	33 ±3

¹⁾ dalam 300 mikrospora yang dihitung

Pembelahan simetri adalah peralihan perkembangan mikrospora dari jalur gametofitik ke jalur sporofitik (Raghavan, 1997). Mikrospora yang membelah simetri adalah mikrospora embriogenik (Pauls *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2007).

Studi genotif embriogenik *Brassica campestris* mengindikasikan bahwa pada kultur mikrospora uninukleat akhir adalah mikrospora embriogenik utama, ketika dikultur di medium yang diperkaya membelah simetri menjadi dua sel yang sama besar, berbeda dengan perkembangan normal yakni pembelahan asimetri menjadi inti generatif dan inti vegetatif, yang mana inti vegetatif lebih besar dibandingkan dengan inti generatif (Hamaoka *et al.*, 1991). Pembelahan simetri merupakan tanda keberhasilan induksi embriogenesis mikrospora (Ferrie *et al.*, 1995; Raghavan, 1997).

Inti mikrospora selanjutnya berkembang menjadi struktur multinukleat. Dalam periode ini belum dapat diprediksi apakah struktur multinukleat tersebut akan berkembang menjadi embrio atau kalus. Jika dilihat dari jumlah mikrospora yang membelah secara simetri cukup banyak (Tabel 5.6) maka kemungkinan pertumbuhan dan perkembangan ke arah embrio sangat besar. Berikut adalah gambar mikrospora setelah satu bulan di media AG.



Gambar 5.6. Mikrospora setelah satu bulan di medium AG, A. Mikrospora berkembang normal membentuk buluh kecambah, B. Mikrospora multinukleat, Bar: 15 μ m

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Kuncup bunga anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dengan ukuran 0,4-1,6 cm berada pada stadium uninukleat, ukuran 1,7 cm sampai mekar berada pada stadium binukleat.
2. Metode yang tepat untuk mengisolasi mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. adalah metode *glassroad*
3. Mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dapat diinduksi menjadi mikrospora embriogenik dengan stres suhu dan medium starvasi
4. Stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. yang responsif terhadap induksi embriogenesis dengan stres suhu dan medium starvasi adalah uninukleat akhir
5. Perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. menjadi mikrospora embriogenik ditandai dengan adanya perubahan struktur morfologi mikrospora berupa hilangnya granula-granula pada sitoplasma, ukuran membesar dan adanya pembelahan simetri (tidak terbentuk inti vegetatif dan inti generatif).

6.2 SARAN

Mengingat, bahwa telah diperoleh stadium perkembangan mikrospora yang responsif terhadap induksi embriogenesis, metode isolasi mikrospora yang tepat serta mikrospora yang membelah secara simetri (mikrospora embriogenik), maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui perkembangan dan pertumbuhan mikrospora embriogenik yang didapat agar berkembang menjadi embrio dan mampu berkembang menjadi tanaman utuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Arditti, J., 1992. **Fundamental of Orchid Biology**. John Willey and Son. Inc.. New York.
- Bhojwani, S.S. and Bhatnagar, S.P., 1981. **The Embryology of Angiosperms**. 4th edition. Vikas Publishing House. New Delhi.
- Brown, C and Lemmon, B.E., 1994. **Pollen Mitosis In Slipper Orchid *Cypripedium fasciculatum***. *Plant Reproduction*. Vol. 7. pp. 87-94.
- Dressler, R.L., 1993. **Phylogeny and Classification of Orchid Family**. Dioscorides Press. USA.
- Dunwell, J.M., 1985. **Haploid Cell Cultures**. In: *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. (Dixon R.A. ed). IRI Press. Oxford-Washington DC. pp. 21-37.
- Ferrie, A.M.R. Palmer, C.E., and Keller, W.A., 1996. **Haploid Embriogenesis**. In: *In Vitro Embryogenesis in Plant*. (Trevor A.T. ed.). Kluwer Academic Publisers. Dordrecht/Boston/London. pp. 309-344.
- Ferrie, A.M.R. and Keller, W.A., 1996. **Microspore culture of Haploid Plant Production In: Plant Cell, Tissue and Organ, Fundamental Methods**. (Gambord O.L. and G.C. Philips eds.). Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New Work. pp.155-16.
- George, F.E. and Sherington, P.D., 1992. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Eastern Press. London.
- Gunawan, L.W. 1988. **Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan**. LKJT PAU Bioteknologi IPB, Dirjend Dikti. Depdikbud. Bogor. pp. 185-218
- Grout B.W.W. and Roberts, 1995. **Storage of Free Pollen, Pollen Embryos and The Zygotic Embryos of Seed by Cryopreservation and freeze Drying**. In: *Genetic Preservation Of Plant Cells In-Vitro*. (B. Grout. ed.). Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York. pp. 63-74.
- Hamaoka, Y., Yukio, F., and Sumio, I., 1991. **Effect of Temperature on the Mode of Pollen Development Anther Culture of *Brassica campestris***. *Physiologia Plantaru*. 82. Copenhagen. pp. 67-72.
- Indrianto A., Herbele-Bors, E., Touraev, A., 1999. **Assessment of Various Stresses and Carbohydrates for Their Effect on The Induction of Embryogenesis in Isolated Wheat Microspore**. *Plant Science*: 143. Elsevier. pp. 71-79.
- Indrianto, A., 2000. **Microspore Embryogenesis**. Diktat Kuliah Kultur Jaringan Tumbuhan. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.
- Isnaeni, 1988. **Kultur Anther**, Dalam Indrayanto Gunawan (ed). *Kultur Jaringan: Suatu Petunjuk Praktis Untuk Bidang Farmasi*. Fakultas Farnasi. Universitas airlangga. pp. 143-151

- Kasha, K.J., Yao, Q., Simion, E., Hu, T., and Oro, R., 1996. **Production and Application of Double Haploids in Crops**. IAEA-SM. 340:9. pp. 23-35.
- Keller W.A., Amison P.G., and Gardy B.J., 1987. **Haploids from Gametophytic Cells-Recent Developments and Future Prospects**. *Plant Tissue and Cell Culture*. (Green C.E., Somer P.A. Hackett, W.P. Biesboer D.D. eds). Proc 6th Int. Plant Tissue Culture Congress. Poland. May 11-14. Keller. Canada. pp. 152-157.
- Kyo, M. and Harada, H., 1986. **Control of The Development Pathway of Tobacco Pollen in Vitro**. *Planta*. 168: 427-432.
- Malik, R.M., Wang, F., Dirpaul, m.J. Zhou, N., Polowick, L.P., Ferrie, A.M.R., and Krochko, J.E., 2007. **Transcript Profiling and Identification of Molecular Marker for Early Microspore Embryogenesis in *Brassica napus***. *Plant Physiology*. Vol. 144. pp 134-154
- Nitcsh, S. and Rou, M.A., 1984. **The Embryo**. In: *Embryology of Angiospermae*. (Johri, B.M. ed.). Springer-Verlag. New York. pp. 377– 435.
- Nitsch, C., 1983. **Progress in Anther and Pollen Culture Techniques**. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Science Press. Beijing. pp. 1-25.
- Orshinky, R.B. and Sadavaiah, R.S. 1994. **Effect of Media on Embrioid Induction and Plant Regeneration from Cultured Anther of White Spring Wheats . (*Triticum aestivum* L.)**. *Plant Science*: 102. pp. 99-107
- Ormerod, A. J. and Caligari, P.D.S., 1994. **Anther Microspore of *Lupinus albus* in Luquid Culture Medium**. *Plant Cell Culture and Organ Culture*: 36. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 227 – 236.
- Pacini, E., 1996. **Type and Meaning of Pollen Embryos**. In: *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. (Sivana K.R. and Sawney, K. eds.). Cambridge. University Press. pp. 392-411.
- Pacini, E. and Franchi, G.G., 1988. **Amylogenesis and Amylolysis During Pollen Grain Development**. In: *Sexual Reproduction in Higher Plants*. (Cresti M., Gori P., and Pacini, E. eds.). Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg- New York. pp. 289-308.
- Palmer, C.E. and Keller, W.A., 1997. **Pollen Embryos**. In: *Pollen Biothecnology For Crop Production and Improvement*. (Sowney, V.K. and Shivana, K.R. eds.). Cambridge University Press. USA. pp.396-403.
- Paul, P.K., Chan, J., Woronuk, G., Schulze, D. and Brazolot, J., 2006. **When Microspore Decide To Become Embryos Celluler and Molecular Changes**. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 84. Canada. pp. 668-678.
- Raghavan, V., 1997. **Mollecular Embryology of Flowering Plants**. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 462-522.
- Sangwan, R.S. and Sangwan-Horreel, B.S., 1987. **Ultrastructural Cytology of Plastids in Pollen Grains of Certain Androgenic and Non androgenic Plants**. *Protoplasma*: 138. Springer-Verlag. pp. 11-22.

- Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S., 1996. **Cytological and Biochemical Aspects of In Vitro Androgenesis in Higher Plants**. In: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Vol. 1. Fundamental Aspects and Methods*. (Mohan, S.J., Sopory, S.K., and Veilleux, R.E. eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. pp. 96-109.
- Simmonds, D.H., Gervais, C., and Keller, W.A., 1991. **Embryogenesis from Micropores of Embryogenic and non Embryogenic Lines in *Brassica napus***. In: *Prod. 8th International Rapeseed Congress*. (Mcgregor, D.I., and Saskatoon, E. ed.). Canada. pp.306-311.
- Suryowinoto, M., 1995. **Mengenal Anggrek Indonesia**. Gramedia. Jakarta.
- Supeno, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., and Custers, J.B.M., 2004. **Successful Development of Shed-Microspore Culture Protocol for Double Haploid Production in Indonesian Hot Pepper (*Capsicum annum*, L.)**. *Plant Cell Reports*.
- Touraev A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., and Herbele Bors, E., 1996. **Efficient Microspore Embryogenesis In Wheat (*Triticum aestivum* L.) Induced by Starvation at High Temperature**. Original Paper. *Sex Plant Reproduction*. Springer Verlag. pp. 209-215.
- Touraev, A., Vicente, O., and Herbele-Bors, E., 1997. **Initiation of Microspore Embryogenesis by Stress**. *Trends in Plant Science*. Vol. 2: 8. pp. 298-300.
- Ulrich, A., Furhan W., and Downeyrk, H., 1984. **Biotechnology and Rapessed Breeding: Some Economic Considerations**. *Science Council Canad Report*. Ottawa. p.67.
- Vasil, K.I., 1996. **Haploid Production In Higher Plants, A Dedication**. In: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 1, Fundamental Aspects and Methods*. (Mohan S.J., Sopory, S.K., and Veilleux, R.E. eds.). Kluwer Academic Publishers. London. pp. vi-viii.
- Wahyuni, D.K. dan Indrianto, A., 2001. **Induksi Embriogenesis Mikrospora Anggrek *Dendrobium anita* dengan Stres Suhu dan Medium Starvasi**. Prosiding Seminar Nasional anggrek. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Wahyuni, D.K. dan Indrianto, A., 2004. **Kandungan Amilum Mikrospora *Dendrobium anita* Selama Perkembangan Bunga dan Induksi Androgenesis**. *Sains dan Sibatika*. Vol. 17. Yogyakarta. Pp.613-625.
- Yeung, E.C., 1987. **Development of Pollen and Accessories Structures in Orchids**. In: *Orchid Biology: Reviews and perspectives*. Vol. IV. (Arditti ed.) Cornell University Press. Ithaca. pp. 192-226.
- Zaki, M.A.M. and Dickinson, H.G. 1991. **Microspore-derived Embryos in Brassica: The Significance of Symetry Division in Pollen Mitosis Pertama to Embryogenetic Development**. *Sex Plant Reprod*. Vol. 4:48
- Zarsky, V., Garrido, D., Rihova, L., Tupy, J., Vicente, O., and Herbele-Bors, E., 1992. **Depression of The Cell Cycle by Starvation is Involved in The Induction of Tobacco Pollen Embryogenesis**. *Sexual Plant Reproduction*: 5. pp. 189-194.

Zhang, C.J., Wang, H., Ma, Y. and Kang, Y. 1994. **Regeration of Haploid Plants From Isolat Microspores of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.)**. *Plant Cell Reports*. Vol. 13. Springer-Verlag. pp. 637-640.

LAMPIRAN 1: KOMPOSISI MEDIUM B**Komposisi Medium B**

	Jumlah
KCl	20mM
MgSO ₄	1mM
CaCl ₂	1mM
KH ₂ PO ₄	1mM
Manitol	40M
pH	7,0

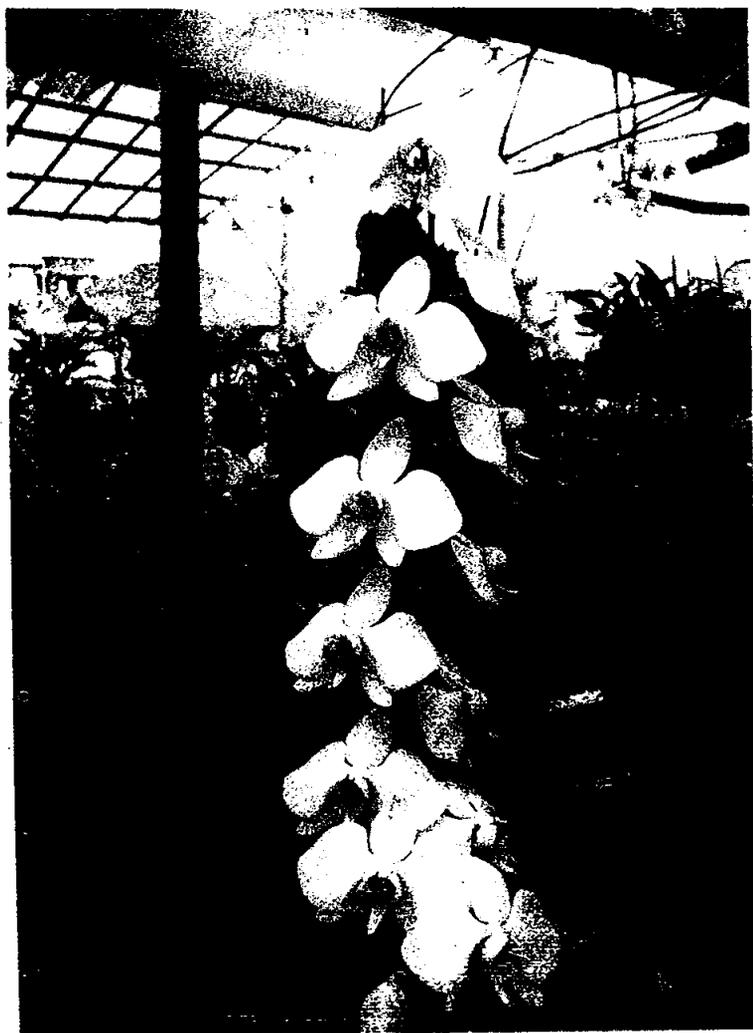
(Kyo & Harada, 1986)

LAMPIRAN 2: KOMPOSISI MEDIUM AG

Komposisi Medium AG (Medium Knudson C yang dimodifikasi)

	Jumlah (mg)
NH_4NO_3	500
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500
Ca NO_3	347,2
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25
Mg SO_4	122,125
$\text{Mg SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.682
NaCl	250
Na_3PO_4	250
Vitamin	MS
Mikronutrien	1/2MS
Glutamin	500
Myo-inositol	500
Maltose	9%
pH	7,0

LAMPIRAN 3: GAMBAR TANAMAN YANG DIPAKAI



Gambar 8.1 : Anggrek *P. amabilis* (L)Bl.

B. DRAFT ARTIKEL ILMIAH

INDUKSI EMBRIOGENESIS MIKROSPORA ANGGREK *Phalaenopsis amabilis*, (L.) Bl.: UPAYA UNTUK MENDAPATKAN TANAMAN GALUR MURNI DALAM SATU GENERASI

Dwi Kusuma Wahuni, Edy Setiti Wida Utami, Hery Pumbasuki, dan Junairiah
Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
Kampus C Universitas Airlangga Jl. Mulyorejo Surabaya

Penelitian Induksi Embriogenesis Mikrospora Anggrek *Phalaenopsis amabilis*, (L.), Bl.: Upaya Untuk Mendapatkan Tanaman Galur Murni dalam Satu Generasi, pada tahun pertama ini bertujuan mengetahui stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. selama perkembangan bunga berdasarkan ukuran kuncup bunga, mengetahui kemampuan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. untuk diinduksi menjadi mikrospora embriogenik, mengetahui stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. yang responsif terhadap induksi embriogenesis dengan stres suhu dan medium starvasi dan mengamati perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. menjadi mikrospora embriogenik. Penentuan stadium perkembangan mikrospora dilakukan dengan pengecatan DAPI. Kuncup bunga dikelompokkan menjadi lima kelompok. Kelompok I berukuran 0,4-0,8 cm, kelompok II berukuran 0,9-1,2 cm, kelompok III berukuran 1,3-1,6 cm, kelompok IV berukuran 1,7-2,0 cm, dan kelompok V berukuran 2 cm-mekar. Mikrospora dari kelima kelompok tersebut diisolasi dengan menggunakan *magnetic stirer* dan *glassroad*. Perlakuan dingin 4°C dilakukan pada kucup bunga selama 7 hari. Perlakuan suhu panas 35°C dan medium starvasi (medium B) diberikan pada mikrospora terisolasi selama 4 hari. Setelah perlakuan suhu panas dan medium B mikrospora dikultur di medium AG. Mikrospora diamati dalam keadaan segar, dihitung jumlah mikrospora yang viabel dan diamati perkembangan inti pada setiap tahap perlakuan induksi. Dari penelitian ini diperoleh hasil kuncup bunga anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dengan ukuran 0,4-1,6 cm berada pada stadium uninukleat, ukuran 1,7 cm sampai mekar berada pada stadium binukleat, mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dapat diinduksi menjadi mikrospora embriogenik dengan stres suhu dan medium starvasi, stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. yang responsif terhadap induksi embriogenesis dengan stres suhu dan medium starvasi adalah uninukleat akhir, perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. menjadi mikrospora embriogenik ditandai dengan adanya perubahan struktur morfologi mikrospora berupa hilangnya granula-granula pada sitoplasma, ukuran membesar dan adanya pembelahan simetri (tidak terbentuk inti vegetatif dan inti generatif).

Kata Kunci: *P. amabilis* (L.) Bl, Orchid, androgenesis, mikrospora

PENDAHULUAN

Anggrek adalah tanaman yang terkenal akan keindahan bunganya, sehingga mempunyai nilai ekonomi dan estetika yang tinggi (Suryowinoto, 1995). Indonesia mempunyai sekitar 5000 jenis anggrek alam dan sekitar 25.000-30.000 jenis yang ada di dunia (Gunadi, 1985). Anggrek alam Indonesia dikenal mempunyai nilai estetika yang

tinggi sehingga menjadi incaran para kolektor dan penggemar anggrek dari seluruh dunia.

Pengelolaan yang benar, dengan memperhatikan aspek ekologi, botani, dan teknologi, kekayaan anggrek Indonesia dapat menjadi aset ekspor yang layak untuk dibanggakan. Penganggrek Indonesia juga akan menjadi pelopor bisnis peranggrekan.

Anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. adalah salah satu jenis yang sangat terkenal akan keindahannya sehingga dinobatkan sebagai **Puspa Pesona Bangsa Indonesia**. *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. berbunga besar, berwarna putih, membulat saat mekar penuh sehingga tampak seperti bulan, mempunyai bibir (labelum) kuning menyala, bunganya tahan lama serta mampu berbunga sepanjang tahun. Keistimewaan tersebut menyebabkan anggrek ini sangat populer dijadikan sebagai induk dalam persilangan. Pelaku hibridisasi anggrek banyak yang menggunakan anggrek ini untuk mendapatkan anggrek hibrida berwarna putih. Warna putih sangat diperlukan untuk memperoleh perpaduan harmonis dengan warna lain dalam satu rangkaian bunga (Suryowinoto, 1995).

Tiga dasawarsa terakhir ini berkembang teknik kultur mikrospora. Berkembangnya teknik ini membawa angin segar pada kemajuan bioteknologi, yang tentunya akan meningkatkan dunia industri dan pertanian yang memanfaatkan kemajuan bioteknologi (Grout & Robert, 1995).

Keberhasilan kultur mikrospora telah banyak dilaporkan keberhasilannya dengan metode yang terus berkembang. Nitsch *et al.* (1972) dalam Raghavan (1997) menyimpulkan bahwa penggunaan hormon untuk induksi mikrospora sudah tidak begitu esensial. Penggunaan hormon yang tidak efektif digantikan dengan perlakuan suhu. Kyo & Harada (1986) membuktikan bahwa penggunaan medium starvasi gula dan nitrogen (medium B) sangat efektif digunakan untuk induksi embriogenesis mikrospora tembakau.

Selanjutnya penggunaan kombinasi perlakuan stres suhu dingin, panas dan medium starvasi telah banyak digunakan. Stres suhu dingin $\pm 4^{\circ}\text{C}$, panas $\pm 33^{\circ}\text{C}$ dan medium starvasi gula dan nitrogen berhasil menginduksi embriogenesis mikrospora *Triticum aestivum* (Indrianto *et al.* 1999). Stres suhu panas 35°C berhasil menginduksi embriogenesis mikrospora *Brassica campestris* (Hamaoka *et al.*, 1991). Keberhasilan penggunaan stres suhu dan medium starvasi untuk induksi embriogenesis mikrospora membuat teknik embriogenesis mikrospora menjadi sangat ekonomis dan lebih murah.

Penelitian ini menekankan pada tujuan untuk mikropropagasi melalui embriogenesis mikrospora untuk pemuliaan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis*

(L.) Bl., sehingga perlu dilakukan penelitian awal tentang mekanisme pembentukan dan perkembangan embrio mikrospora yang akan memberikan informasi dasar yang menunjang penentuan langkah-langkah pemuliaan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. baik secara konvensional maupun teknik molekuler.

Penelitian ini akan menggali potensi plasma nutfah anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. sebagai induk silangan berupa galur murni dari perkembangan sel mikrospora melalui induksi embriogenesis mikrospora secara *in vitro*. Hasil yang didapat dari penelitian ini diharapkan akan membawa perkembangan dunia peranggrekan Indonesia sehingga ekspor anggrek meningkat dan akhirnya meningkatkan pendapatan negara.

Berdasarkan latar belakang di atas, pada penelitian tahap pertama dapat bertujuan 1) mengetahui stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. selama perkembangan bunga, 2) mengetahui kemampuan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. diinduksi untuk menjadi mikrospora embriogenik, 3) mengetahui stadium mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. yang responsif untuk diinduksi menjadi mikrospora embriogenik, 4) mengetahui perkembangan mikrospora menjadi mikrospora embriogenik.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Pada penelitian ini digunakan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl yang diperoleh dari Pusat Anggrek Royal Orchid, Prigen Jawa Timur. Eksplan yang dipakai adalah mikrospora yang akan diisolasi dari antera bunga yang masih dalam keadaan kuncup. Mikrospora yang dipakai dalam penelitian ini adalah mikrospora dari setiap kelompok ukuran kuncup bunga.

Bahan Kimia

Bahan kimia yang dipakai adalah bahan kimia penyusun media Knudson C (George & Sherrington, 1992, lampiran 1) yang dimodifikasi (Medium AG, Wahyuni & Indrianto, 2001), medium B (Kyo & Harada, 1986, lampiran 2), DAPI (4,6-Diamidino phenylindol), dan bahan kimia untuk membuat preparat anatomi.

Isolasi Mikrospora

Isolasi mikrospora untuk penelitian ini dilakukan dengan metode *glassroad*. Isolasi mikrospora dengan metode *glassroad* juga dilakukan dalam keadaan aseptis, dengan cara polinia steril dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi medium B (satu polinaria untuk

satu ml medium B), kemudian polinaria digerus dengan menggunakan gelas pengaduk sampai hancur. Setelah itu larutan diambil dengan pipet, selanjutnya dimasukkan kedalam tabung sentrifus untuk disentrifugasi selama 5 menit, 5000 rpm. Pelet berwarna kuning adalah mikrospora terisolasi.

Penentuan Stadium Perkembangan Mikrospora

Setiap kelompok ukuran kuncup bunga dilihat stadium perkembangan mikrosporangya. Perkembangan mikrospora dikorelasikan dengan ukuran kuncup bunga. Penentuan stadium mikrospora berdasarkan letak inti, ukuran inti, dan jumlah inti (Raghavan, 1997) Dalam penelitian ini digunakan pengecatan DAPI untuk mengamati perkembangan inti.

Perlakuan dingin

Perlakuan dingin diberikan pada kuncup bunga dalam karangan, dengan cara kuncup bunga dibungkus aluminium foil kemudian karangan bunga diletakkan di tabung yang berisi air, dengan posisi pangkal bunga terendam air, selanjutnya disimpan dalam lemari es yang suhunya $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 7 hari.

Perlakuan panas dan medium starvasi

Kuncup bunga setelah mendapat perlakuan dingin disterilkan dengan Bayclin (*sodium hypochloride* 5,25%) selama 10 menit, dibuka, antera diangkat dengan pinset kemudian diletakkan di cawan petri $\phi = 10$ cm. Operkulum dipisahkan dari polinia dengan skapel. Polinia dipindah ke tabung reaksi yang berisi 1ml medium B. Selanjutnya mikrospora digerus dengan gelas pengaduk, filtrat dipindah ke tabung *sentrifuge*, lalu dicuci dengan medium B dua kali, disentrifugasi selama 5 menit, dengan kecepatan 1000 rpm. Medium B dibuang dan filtrat merupakan mikrospora terisolasi dipindah ke cawan petri $\phi = 6$ cm, yang berisi 3ml medium B. Tutup petri disegel dengan parafilm. Mikrospora dalam medium B disimpan dalam inkubator pada suhu 35°C selama 4 hari.

Penanaman di medium AG (medium embriogenesis)

Kultur mikrospora di medium B setelah mendapat perlakuan panas diambil dengan pipet dipindah ke tabung *sentrifuge*. Disentrifugasi selama 5 menit, 1000 rpm medium B dibuang. Filtrat ditanam di cawan petri $\phi = 3,5$ cm yang berisi 2 ml medium AG. Cawan petri ditutup, kemudian disegel dengan parafilm. Kultur diletakkan ditempat gelap pada suhu 25°C selama 2 minggu.

Analisis sitologis

a. Pengamatan segar

Mikrospora diisolasi dari antera. isolat mikrospora diletakkan di atas gelas benda. ditetesi dengan medium B secukupnya, ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya.

b. Pengecatan DAPI

Pengecatan DAPI dimaksudkan untuk melihat perkembangan inti mikrospora. Mikrospora difiksasi dengan alkohol 70% : Asam Asetat Glisial (1:3,v/v) selama 15 menit. Selanjutnya dicuci dengan alkohol 70% 2x, dituang larutan DAPI 20 µl selama 15 menit, ditetesi dengan gliserin sebanyak dua tetes. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop fluorescen.

Penghitungan viabilitas mikrospora

Mikrospora viabel adalah mikrospora yang mampu bertahan hidup. Pada percobaan ini, yang dimaksud dengan mikrospora viabel adalah mikrospora yang masih utuh sitoplasmanya dan belum terplasmolisis.

Penghitungan dilakukan dengan cara mengamati kultur dengan mikroskop inverted. Selanjutnya jumlah mikrospora dihitung, baik mikrospora viabel maupun mikrospora yang plasmolisis sampai mencapai jumlah total 300 mikrospora. Penghitungan dilakukan paling tidak pada lima bidang pandang mikroskop (atas, bawah, kanan, kiri, dan tengah, dengan perbesaran mikroskop 200X).

Prosentase jumlah mikrospora yang viabel diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

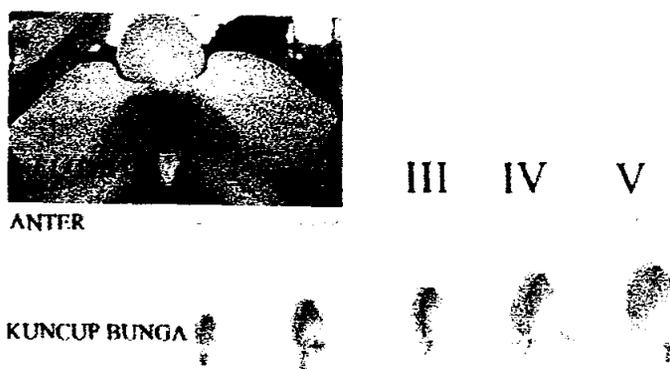
$$\text{Mikrospora viabel} / 300 \times 100\%$$

Penghitungan viabilitas mikrospora dilakukan tiga kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Stadium Perkembangan Mikrospora Berdasarkan Ukuran Kuncup Bunga

Stadium perkembangan mikrospora ditentukan berdasarkan ukuran kuncup bunga. Hal ini dilakukan untuk memudahkan mengambil mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga dengan stadium perkembangan yang optimum untuk induksi embriogenesis mikrospora. Langkah awal dilakukan pengelompokan kuncup bunga berdasarkan ukuran (Gambar 1).



Gambar 1. Bunga anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. berbagai ukuran (I. Kuncup bunga ukuran 0,4-0,8 cm, II. Kuncup bunga ukuran 0,9-1,2 cm, III. Kuncup bunga ukuran 1,3-1,6 cm, IV. Kuncup bunga ukuran 1,7-2,0 cm, V. Kuncup bunga ukuran 2 cm-mekar)

Morfologi mikrospora selama perkembangan bunga di paparkan pada Gambar 2. Pada kelompok I mikrospora tidak dapat diisolasi atau hancur saat isolasi sehingga morfologinya tidak dapat diamati. Pada kelompok ini mikrospora diperkirakan masih berada pada stadium sel induk mikrospora (Tabel 1). Dari pengamatan irisan anatomi polinia dapat, dilihat bahwa mikrospora tetrad belum terbentuk (Gambar 2.A). Pada saat ini dinding mikrospora masih sangat tipis dan belum ada penebalan sekunder. Dinding mikrospora masih berupa dinding kalosik (seperti kalose), sehingga mudah hancur saat digerus (Yeung, 1987).

Pada kelompok II (Gambar 2.B), mikrospora relatif mudah diisolasi, walau dinding mikrospora dan sekat antar tetrad tidak begitu jelas terlihat. Pada Tabel 1. menunjukkan bahwa mikrospora pada kelompok ini berada pada stadium tetrad (uninukleat awal). Dinding mikrospora sudah mulai terbentuk lebih sempurna, berupa dinding kalose. Dinding kalose menyelubungi masing-masing mikrospora dan menyelubungi mikrospora dalam keadaan tetrad (Arditti, 1992).

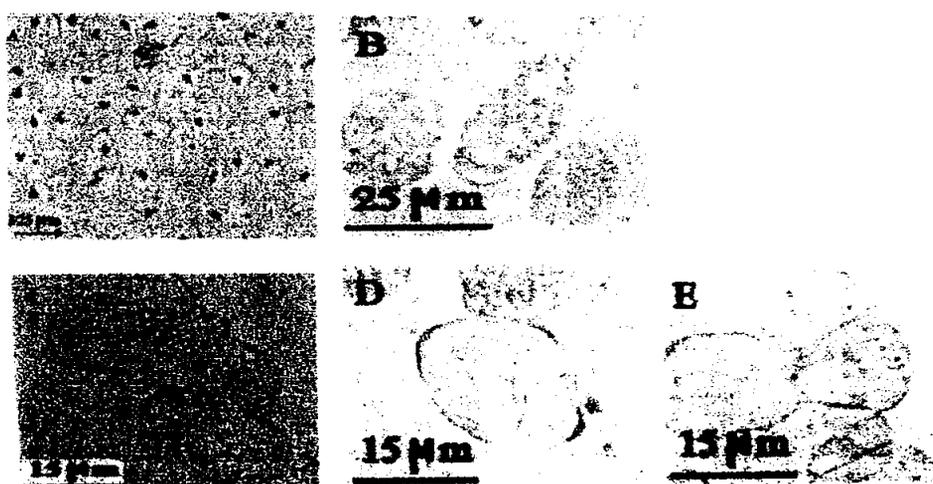
Pada kelompok III (Gambar 2.C) mikrospora lebih mudah diisolasi. Pada kelompok ini mikrospora berada pada stadium uninukleat (Tabel 1). Dinding mikrospora dan sekat antar tetrad sudah terlihat tegas. Menurut Arditti (1992) mikrospora pada fase ini mempunyai dinding lebih kuat. Pada stadium ini mulai disintesis komponen-komponen eksin dan intin (penyusun dinding polen dewasa) sampai terjadi pembelahan mitosis yang menghasilkan sel generatif dan sel vegetatif.

Pada kelompok IV (Gambar 2. D) dinding mikrospora dan sekat antar tetrad sangat tegas, meskipun mikrospora berada pada fase biseluler (Tabel 1). Pada stadium biseluler dinding kalose sudah tidak kelihatan dan eksin mengakumulasi dinding bagian luar polinium (Arditti, 1992).

Pada kelompok V (Gambar 2.E) mikrospora masih dalam keadaan tetrad, tetap bergranula dan volume tampak makin besar. Pada kelompok ini mikrospora sudah sangat dewasa dan siap untuk dikeluarkan (Tabel 1, Gambar 2.E). Pada kelompok ini mikrospora berada pada fase polen masak. Dinding polen dewasa bertapis, lapisan luar berupa eksin, yang terdiri dari seksin dan neksin, lapisan dalam berupa intin (Arditti, 1992).

Pada Gambar 2.B-E terlihat bahwa mikrospora dalam keadaan sebagai mikrospora tetrad sampai polen dewasa. Sitoplasma tidak jernih tapi penuh dengan granula, sehingga inti dan vakuola tidak tampak. Keadaan ini berbeda dengan mikrospora pada tanaman angiospermae lainnya. Pada Lilium, mikrospora setelah stadium tetrad berupa mikrospora tunggal dan sitoplasma jernih tanpa granula, vakuola dan inti terlihat jelas dengan mikroskop cahaya biasa (Bhojwani & Bhatnagar, 1984).

Keberadaan mikrospora sebagai mikrospora tetrad sampai dewasa seperti pada mikrospora anggota tribus Epidendroidae lainnya. Hal ini dikarenakan adanya hubungan sitoplasmik antar tetrad yang besar. Pada tanaman berbunga lainnya hubungan sitoplasmik hanya terjadi antara stadium sel induk mikrospora selama profase meiosis (Arditti, 1992).



Gambar 2. Mikrospora segar selama perkembangan bunga, (A. Irisan membujur polinia Kelompok I (0,4-0,8cm), B. Kelompok II (0,9-1,2cm), C. Kelompok III (1,3-1,6cm), D. Kelompok IV (1,7-2,0cm), E. Kelompok V (2,0cm-mekar), 1. Dinding mikrospora, 2. Sitoplasma, 3. Sekat antar tetrad)

Pada *Epidendrum ibaguens*, hubungan sitoplasmik tidak ada tapi masih ada sisa plasmodesmata yang menghubungkan sel induk mikrospora. Tidak jelas apakah plasmodesmata tersebut berfungsi atau tidak, tetapi jelas mengikat mikrospora dalam keadaan tetrad. Selain faktor di atas pembentukan dinding sel yang tidak lengkap selama

perkembangan mikrospora juga mengikat mikrospora dalam keadaan tetrad. Dinding mikrospora yang tidak lengkap dan jembatan sitoplasmik mempertahankan mikrospora dalam keadaan tetrad secara struktur dan fisiologi (Arditti, 1992).

Selain mikrospora dalam keadaan tetrad, keunikan mikrospora angrek adalah terdapat granula-granula yang menutupi keseluruhan mikrospora. Tidak begitu jelas apakah granula tersebut adalah kenampakan dari organel-organel sel ataukah hanya artifak sel saja. Hasil penelitian Wahyuni dan Indrianto (2004) granula-granula pada mikrospora angrek *Dendrobium anita* adalah amilum.

Mikrospora angrek *P. amabilis* (L.) Bl. mempunyai bentuk tetrad yang bermacam-macam. Tipe yang dapat diamati adalah tipe tetrahedral, rhomboidal, bentuk T, dan linear. Penentu bentuk polen tetrad adalah bagaimana dinding polen tertumpuk (Yeung, 1987).

Hasil pengamatan mikrospora dengan pengecatan DAPI disajikan dalam Tabel 1 dan Gambar 3. Pengecatan dengan DAPI menjadi penting untuk mengamati stadium perkembangan mikrospora karena inti tidak teramati tanpa pengecatan.

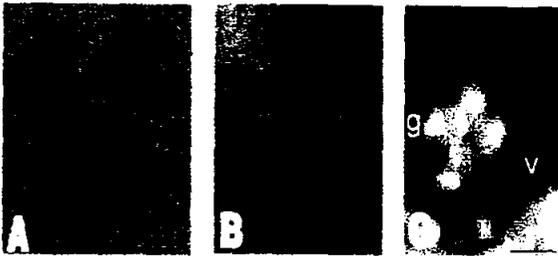
Tabel 1. Stadium perkembangan mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga

Kelompok	Ukuran (cm)	Jumlah Mikrospora ^{*)}		
		Uninukleat	Uninukleat akhir	Binukleat
I	0,4-0,8	100±0		
II	0,9-1,2	275±10	24,3±10	
III	1,3-1,6	114±13	171±4	15±12
IV	1,7-2,0		41,67±6	258,3±6
VI	2,0-mekar			100±0

*)dalam 300 mikrospora yang dihitung

Stadium perkembangan mikrospora dapat dibedakan menjadi tahap uninukleat, uninukleat akhir, dan binukleat (Tabel 1, Gambar 3). Tahap uninukleat dan uninukleat akhir dapat dibedakan dengan pengecatan DAPI berdasarkan perbedaan ukuran inti dan letak inti. Inti uninukleat lebih kecil dibandingkan dengan uninukleat akhir. Hal ini disebabkan oleh pada stadium uninukleat akhir, kromatin pada inti meregang dan menyebar lebih merata (Hamaoka *et al.*, 1991). Inti mikrospora berada ditepi pada stadium uninukleat akhir.

Berdasarkan hasil pengamatan stadium perkembangan mikrospora, untuk kepentingan induksi embriogenesis mikrospora digunakan mikrospora dari kuncup bunga kelompok II, III, dan IV.



Gambar 3. Mikrospora angrek *P. amabilis* (L.) Bl dengan pengecatan DAPI (A. Uninukleat, B. Uninukleat akhir, C. Binukleat, g. Inti generatif, v. Inti vegetatif, Bar: 20 μ m)

Perkembangan Mikrospora Setelah Perlakuan Dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$)

Pada pengamatan mikrospora tanpa pengecatan, kenampakkan mikrospora masih sama ketika masih belum diberi perlakuan dingin. Mikrospora bergranula, berupa mikrospora tetrad dan tidak tampak adanya pemisahan. Mikrospora juga masih tampak dalam keadaan segar dan tidak terplasmolisis. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dingin tidak memberikan efek merusak pada mikrospora.

Tabel 2. Stadium perkembangan mikrospora setelah perlakuan dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$)

Kelompok	Ukuran (cm)	Jumlah mikrospora ^{*)}		
		Uninukleat	Uninukleat akhir	Binukleat
II	0,9-1,2	268 \pm 5	32 \pm 9	
III	1,3-1,6	94 \pm 2	182 \pm 4	24 \pm 10
IV	1,7-2,0		32 \pm 5	278 \pm 2

^{*)} dalam 300 mikrosporan yang dihitung

Pengamatan perkembangan inti menunjukkan adanya perkembangan inti pada masing-masing kelompok (Tabel 2). Perlakuan suhu dingin tidak menghambat pembelahan mitosis haploid pertama. Perlakuan dingin dimaksudkan untuk efektifitas induksi embriogenesis mikrospora (Ferrie *et al.*, 1996), seperti pada *wheat* dan *barley* (Huang and Sunderland, 1982 dalam Kasha *et al.*, 1996)

Menurut Sangwan-Norreel dalam Ferrie *et al.*, (1996) perlakuan dingin bertujuan untuk menunda mitosis haploid pertama, meningkatkan viabilitas polen embriogenik, meningkatkan

dinding polen, menunda perkembangan polen, menunda pembelahan simetri, memodifikasi dinding mikrospora dan menyebabkan disorganisasi tapetum.

Induksi Embriogenesis Mikrospora Dengan Stres Suhu Panas (35 °C) dan Medium Starvasi

Pelakuan panas diberikan pada mikrospora angrek pada suhu 35 °C dalam medium starvasi selama 4 hari dalam ruang gelap. Pelakuan ini dimaksudkan untuk induksi mikrospora embriogenik. Pada perlakuan suhu panas dan medium starvasi dilakukan pengamatan perkembangan inti dengan pengecatan DAPI, pengamatan viabilitas, dan pengamatan mikrospora tanpa pengecatan.

Tabel 3. Stadium perkembangan mikrospora setelah mendapatkan stres panas dan medium starvasi

Kelompok	Ukuran (cm)	Jumlah mikrospora ¹⁾		
		Uninukleat	Uninukleat akhir	Binukleat
II	0,9-1,2	186±5	114±9	
III	1,3-1,6	24±2	271±4	5±3
IV	1,7-2,0		12±5	288±2

¹⁾ dalam 300 mikrospora yang dihitung



Gambar 4. Mikrospora setelah mendapatkan perlakuan panas dan stadium starvasi, A. mikrospora viabel, B. mikrospora terplasmolisis, 1. dinding mikrospora, 2. sitoplasma, 3. sekat antar tetrad, Bar: 15µm

Data perkembangan inti dapat dilihat pada Tabel 3, terlihat bahwa perubahan perkembangan inti mikrospora tidak begitu mencolok, hanya pada kelompok II dan III terjadi peningkatan jumlah mikrospora uninukleat akhir, sedangkan pada mikrospora binukleat jumlahnya berkurang dibanding sebelum mendapatkan perlakuan panas. Bertambahnya jumlah mikrospora uninukleat akhir disebabkan mikrospora uninukleat akhir lebih tahan terhadap perlakuan panas dan medium starvasi, sedangkan mikrospora binukleat kurang tahan terhadap perlakuan panas dan medium starvasi. Hal ditunjukkan oleh data pengamatan mikrospora tanpa pengecatan, bahwa mikrospora setelah mengalami perlakuan panas dan medium starvasi banyak yang plasmolisis (Gambar 4). Secara umum induksi embriogenesis optimum diberikan pada mikrospora uninukleat akhir sampai premitosis haploid pertama, artinya mikrospora pada tahap tersebut mampu bertahan terhadap induksi embriogenesis berupa stres panas dan medium starvasi (Raghavan, 1997).

Pengamatan mikrospora tanpa pengecatan dilakukan dengan mikroskop *inverted*. Pada pengamatan segar dihitung jumlah sel yang diduga embriogenik dan dilakukan pengamatan kenampakkan mikrospora yang diduga embriogenik. Mikrospora embriogenik pada *wheat* lebih besar dari mikrospora non embriogenik (Tourraev *et al.*, 1996).

Dari pengamatan tanpa pengecatan, diperoleh hasil bahwa ada perubahan kenampakkan mikrospora setelah 4 hari mendapatkan perlakuan panas dan starvasi. Perubahan yang terjadi adalah ukuran relatif lebih besar, sitoplasma tampak lebih jernih, granula menghilang sehingga sitoplasma tampak transparan, walau demikian inti tetap tidak terlihat dan vakuola tidak teridentifikasi. Mikrospora tampak lebih kompak. Beberapa mikrospora tidak menunjukkan struktur tetrad atau sekat-sekat antar mikrospora menghilang. Mikrospora yang demikian diduga bersifat embriogenik (Gambar 4).

Mikrospora membesar diduga disebabkan oleh vakuola yang besar. Pada fase ini inti juga membesar karena mikrospora diperkirakan tertahan pada fase G2 setelah mengalami replikasi DNA pada fase S (Zarsky *et al.*, 1992) dan mikrospora berada pada fase uninukleat akhir, yang mana kromatin dalam keadaan meregang dan menyebar (Hamaoka *et al.*, 1991).

Mikrospora menjadi lebih transparan karena granula menghilang. Hilangnya granula kemungkinan karena granula adalah amilum, yang dimanfaatkan sebagai sumber karbon pada saat mikrospora mengalami perlakuan panas dan starvasi. Pada saat perlakuan starvasi mikrospora tidak mendapatkan makanan berupa sumber karbon dari media, sumber karbon di media berupa manitol. Manitol di medium B berperan sebagai osmotikum pada kultur, bukan sebagai sumber karbon (Raghavan, 1997). Sementara itu pada mikrospora embriogenik atau

pada saat perlakuan panas dan starvasi mengalami penurunan sintesis lemak dan amilum (Ferrie *et al.*, 1996).

Tabel 4. Persentase mikrospora viabel setelah mendapatkan perlakuan panas dan medium starvasi dalam prosentase

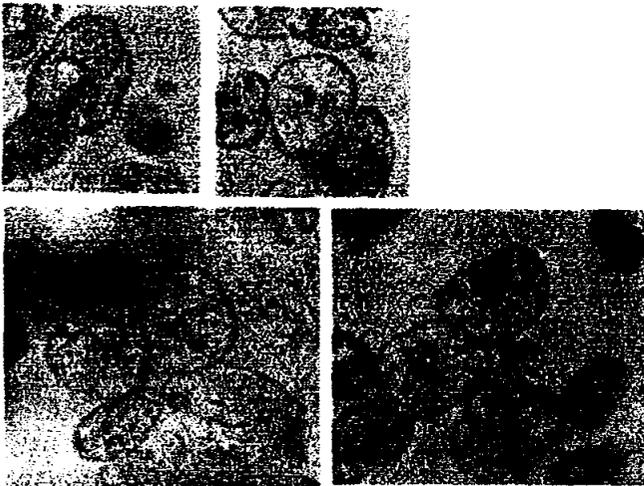
Kelompok	Ukuran (cm)	Persentase mikrospora viabel (%)	Warna pellet
II	0,9-1,2	52,66	Kuning keputihan
III	1,3-1,6	87,16	Kuning keputihan
IV	1,7-2,0	16,4	Kuning

Pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa kelompok III menghasilkan mikrospora viabel paling besar, sebesar 87%, kelompok II sebesar 52,66% dan kelompok IV sebesar 16,4%. Keadaan data yang demikian dapat dijelaskan oleh banyak literatur bahwa secara umum induksi embriogenik berhasil optimum bila diberikan pada mikrospora uninukleat akhir sampai premitosis akhir. Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa kelompok III mikrospora sebagian besar berada pada stadium uninukleat akhir. Induksi embriogenesis mikrospora juga optimum diberikan pada tahap uninukleat akhir pada wheat (Orshinky & Sadavaiah, 1994; Torraev *et al.*, 1996; Indrianto *et al.*, 1999), *Capssicum annum* (Supeno *et al.*, 2004), *Asparagus officinalis* (Zhang *et al.*, 1994), *Brasica campestris* (Hamaoka *et al.*, 1991).

Ferrie *et al.*, (1996) menunjukkan beberapa data bahwa starvasi sangat esensial untuk induksi embriogenesis. Indrianto *et al.*, (1999) menunjukkan bahwa perlakuan panas 33°C selama 4 hari dalam medium B mampu meningkatkan embriogenesis mikrospora pada wheat. Perlakuan panas 34° C dan medium starvasi mampu menginduksi embriogenesis mikrospora tanaman anggrek *Dendrobium anita* (Wahyuni dan Indrianto, 2001). Perlakuan panas 35°C mampu meningkatkan pembelahan simetri pada kultur mikrospora *Brassica campestris* (Hamaoka *et al.*, 1991) dan pada *Capsicum annum* (Supeno *et al.*, 2004). Kultur mikrospora *Barley* dan *Wheat* pada media tanpa sukrosa tapi manitol (medium B) didapat frekuensi mikrospora viabel yang tinggi (Hoekstra *et al.*, 1992).

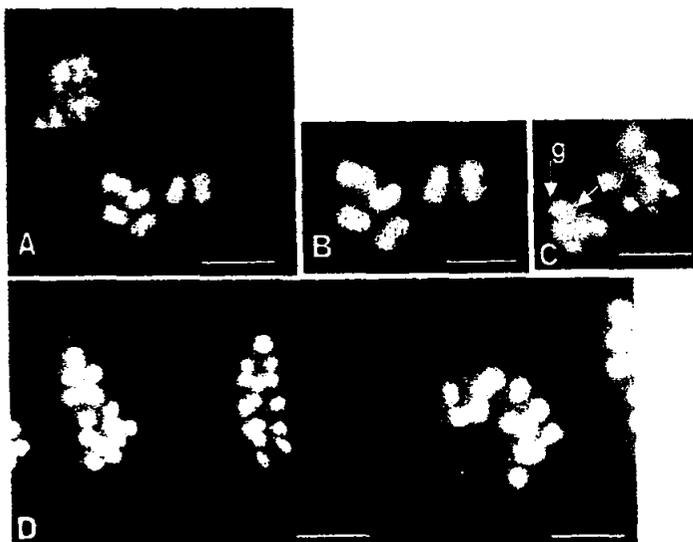
Pembelahan Simetri dan Perkembangan Kultur pada Medium AG

Perkembangan mikrospora di medium yang diperkaya sangat bervariasi. Beberapa mikrospora yang diduga embriogenik bergranula lagi, ukuran mengecil, warna menjadi keruh dan akhirnya mengalami plasmolisis.



Gambar 5. Mikrospora tanpa pengecatan setelah 2 minggu kultur di medium AG, Bar:15 μ m

Pada minggu kedua, mikrospora yang masih viabel menunjukkan perubahan yang menakjubkan. Ukuran bertambah besar, warna masih tampak jernih walau mulai muncul granula-granula yang tersebar tipis dan merata. Beberapa mikrospora yang viabel kehilangan sekat antar tetrad. Mikrospora tampak kompak. Pada kondisi ini inti dan valvula tidak teramati dengan jelas (Gambar 4). Setelah pengamatan morfologi menunjukkan adanya perubahan struktur dilakukan pengecatan dengan DAPI untuk mengetahui pembelahan pada inti (Gambar 6).



Gambar 6. Mikrospora dengan pengecatan DAPI setelah 2 minggu kultur di medium AG, (A. Mikrospora viabel dan mikrospora terplasmolisi, B. Mikrospora dengan pembelahan simetri, C. Mikrospora dengan pembelahan asimetri, D. Mikrospora multinukleat, v. Inti vegetatif, g. Inti generatif), Bar: 15 μ m

Dari Tabel 5 dapat dilihat bahwa pembelahan simetri lebih banyak dibandingkan dengan pembelahan asimetri, padahal secara normal polen akan membelah secara asimetri menjadi inti vegetatif dan inti generatif. Penyimpangan pembelahan mikrospora menjadi pembelahan simetri karena adanya perlakuan panas dan medium starvasi. Pada saat diinduksi dengan perlakuan panas dan medium starvasi terjadi penyusunan ulang dari mikrotubul sehingga inti berpindah ke tengah dan menghasilkan pembelahan simetri. Pengaturan mikrotubul dan sitoskeleton kelihatan berperan pada pembelahan simetri dan proses perkembangan embrio selanjutnya (Zaki & Dickinson, 1991; Simmonds *et al.*, 1991; Pauls *et al.*, 2006).

Tabel 5. Stadium perkembangan inti mikrospora setelah 2 minggu kultur di medium AG

Jumlah mikrospora ^{*)}			
Uninukleat	Binukleat		Multinukleat
	Simetri	Asimetri	
21±2	234±51	15 ±3	33 ±3

^{*)} dalam 300 mikrospora yang dihitung

Pembelahan simetri adalah peralihan perkembangan mikrospora dari jalur gametofitik ke jalur sporofitik (Raghavan, 1997). Mikrospora yang membelah simetri adalah mikrospora embriogenik (Pauls *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2007).

Studi genotif embriogenik *Brassica campestris* mengindikasikan bahwa pada kultur mikrospora uninukleat akhir adalah mikrospora embriogenik utama, ketika dikultur di medium yang diperkaya membelah simetri menjadi dua sel yang sama besar, berbeda dengan perkembangan normal yakni pembelahan asimetri menjadi inti generatif dan inti vegetatif, yang mana inti vegetatif lebih besar dibandingkan dengan inti generatif (Hamaoka *et al.*, 1991). Pembelahan simetri merupakan tanda keberhasilan induksi embriogenesis mikrospora (Ferrie *et al.*, 1995; Raghavan, 1997).

Inti mikrospora selanjutnya berkembang menjadi struktur multinukleat. Dalam periode ini belum dapat diprediksi apakah struktur multinukleat tersebut akan berkembang menjadi embrio atau kalus. Jika dilihat dari jumlah mikrospora yang membelah secara simetri cukup banyak (Tabel 5) maka kemungkinan pertumbuhan dan perkembangan ke arah embrio sangat besar.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut: 1) Kuncup bunga anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dengan ukuran 0,4-1,6 cm berada pada stadium uninukleat, ukuran 1,7 cm sampai mekar berada pada stadium binukleat, 2) Mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. dapat diinduksi menjadi mikrospora embriogenik dengan stres suhu dan medium starvasi, 3) Stadium perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. yang responsif terhadap induksi embriogenesis dengan stres suhu dan medium starvasi adalah uninukleat akhir, 4) perkembangan mikrospora anggrek *P. amabilis* (L.) Bl. menjadi mikrospora embriogenik ditandai dengan adanya perubahan struktur morfologi mikrospora berupa hilangnya granula-granula pada sitoplasma, ukuran membesar dan adanya pembelahan simetri (tidak terbentuk inti vegetatif dan inti generatif).

SARAN

Mengingat, bahwa telah diperoleh stadium perkembangan mikrospora yang responsif terhadap induksi embriogenesis, metode isolasi mikrospora yang tepat serta mikrospora yang membelah secara simetri (mikrospora embriogenik), maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui perkembangan dan pertumbuhan mikrospora embriogenik yang didapat agar berkembang menjadi embrio dan mampu berkembang menjadi tanaman utuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Arditti, J., 1992. **Fundamental of Orchid Biology**. John Willey and Son. Inc.. New York.
- Bhojwani, S.S. and Bhatnagar, S.P., 1981. **The Embryology of Angiosperms**. 4th edition. Vikas Publishing House. New Delhi.
- Ferrie, A.M.R. Palmer, C.E., and Keller, W.A., 1996. **Haploid Embriogenesis**. In: *In Vitro Embryogenesis in Plant*. (Trevor A.T. ed.). Kluwer Academic Publisers. Dordrecht/Boston/London. pp. 309-344.
- Ferrie, A.M.R. and Keller, W.A., 1996. **Microspore culture of Haploid Plant Production** In: *Plant Cell, Tissue and Organ, Fundamental Methods*. (Gambord O.L. and G.C. Philips eds.). Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New Work. pp.155-16.
- George, F.E. and Sherington, P.D., 1992. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Eastern Press. London.
- Gunawan, L.W. 1988. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. LKJT PAU Bioteknologi IPB, Dirjend Dikti. Depdikbud. Bogor. pp. 185-218
- Grout, B.W.W. and Roberts, 1995. **Storage of Free Pollen, Pollen Embryos and The Zygotic Embryors of Seed by Cryopreservation and freeze Drying**. In: *Genetic*

- Preservation Of Plant Cells In Vitro*. (B. Grout. ed.). Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York. pp. 63-74.
- Hamaoka, Y., Yukio, F., and Sumio, I., 1991. **Effect of Temperature on the Mode of Pollen Development Anther Culture of *Brassica campestris***. *Physiologia Plantaru*: 82. Copenhagen. pp. 67-72.
- Indrianto A., Herbele-Bors, E., Touraev, A., 1999. **Assessment of Various Stresses and Carbohydrates for Their Effect on The Induction of Embryogenesis in Isolated Wheat Microspore**. *Plant Science*: 143. Elsevier. pp. 71-79.
- Kasha, K.J., Yao, Q., Simion, E., Hu, T., and Oro, R., 1996. **Production and Application of Double Haploids in Crops**. IAEA-SM. 340:9. pp. 23-35.
- Kyo, M. and Harada, H., 1986. **Control of The Development Pathway of Tobacco Pollen in Vitro**. *Planta*. 168: 427-432.
- Malik, R.M., Wang, F., Dirpaul, m.J. Zhou, N., Polowick, L.P., Ferrie, A.M.R., and Krochko, J.E., 2007. **Transcript Profiling and Identification of Molecular Marker for Early Microspore Embryogenesis in *Brassica napus***. *Plant Physiology*. Vol. 144. pp 134-154
- Nitcsh, S. and Rou, M.A., 1984. **The Embryo**. In: *Embryology of Angiospermae*. (Johri, B.M. ed.). Springer-Verlag. New York. pp. 377– 435.
- Nitsch, C., 1983. **Progress in Anther and Pollen Culture Techniques**. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Science Press. Beijing. pp. 1-25.
- Orshinky, R.B. and Sadavaiah, R.S. 1994. **Effect of Media on Embrioid Induction and Plant Regeneration from Cultured Anther of White Spring Wheats . (*Triticum aestivum* L.)**. *Plant Science*: 102. pp. 99-107
- Pacini, E., 1996. **Type and Meaning of Pollen Embryos**. In: *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. (Sivana K.R. and Sawney, K. eds.). Cambridge. University Press. pp. 392-411.
- Pacini, E. and Franchi, G.G., 1988. **Amylogenesis and Amylolysis During Pollen Grain Development**. In: *Sexual Reproduction in Higher Plants*. (Cresti M., Gori P., and Pacini, E. eds.). Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg- New York. pp. 289-308.
- Paul, P.K., Chan, J., Woronuk, G., Schulze, D. and Brazolot, J., 2006. **When Microspore Decide To Become Embryos Celluler and Molecular Changes**. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 84. Canada. pp. 668-678.
- Raghavan, V., 1997. **Mollecular Embryology of Flowering Plants**. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 462-522.
- Sangwan, R.S. and Sangwan-Horreel, B.S., 1987. **Ultrastructural Cytology of Plastids in Pollen Grains of Certain Androgenic and Non androgenic Plants**. *Protoplasma*: 138. Springer-Verlag. pp. 11-22.
- Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S., 1996. **Cytological and Biochemical Aspects of In Vitro Androgenesis in Higher Plants**. In: *In Vitro Haploid Production in Higher*

- Plants. Vol. 1. Fundamental Aspects and Methods.* (Mohan, S.J., Sopory, S.K., and Veilleux, R.E. eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. pp. 96-109.
- Simmonds, D.H., Gervais, C., and Keller, W.A., 1991. **Embryogenesis from Micropores of Embryogenic and non Embryogenic Lines in *Brassica napus*.** In: *Prod. 8th International Rapeseed Congress.* (Mcgregor, D.I., and Saskatoon, E. ed.). Canada. pp.306-311.
- Suryowinoto, M., 1995. **Mengenal Anggrek Indonesia.** Gramedia. Jakarta.
- Supeno, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., and Custers, J.B.M., 2004. **Successful Development of Shed-Microspore Culture Protocol for Double Haploid Production in Indonesian Hot Pepper (*Capsicum annum*, L.).** *Plant Cell Reports.*
- Touraev A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., and Herbele Bors, E., 1996. **Efficient Microspore Embryogenesis In Wheat (*Triticum aestivum* L.) Induced by Starvation at High Temperature.** Original Paper. *Sex Plant Reproduction.* Springer Verlag. pp. 209-215.
- Touraev, A., Vicente, O., and Herbele-Bors, E., 1997. **Initiation of Microspore Embryogenesis by Stress.** *Trends in Plant Science.* Vol. 2: 8. pp. 298-300.
- Wahyuni, D.K. dan Indrianto, A., 2001. **Induksi Embriogenesis Mikrospora Anggrek *Dendrobium anita* dengan Stres Suhu dan Medium Starvasi.** Prosiding Seminar Nasional anggrek. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Wahyuni, D.K. dan Indrianto, A., 2004. **Kandungan Amilum Mikrospora *Dendrobium anita* Selama Perkembangan Bunga dan Induksi Androgenesis.** *Sains dan Sibernatika.* Vol. 17. Yogyakarta. Pp.613-625.
- Yeung, E.C., 1987. **Development of Pollen and Accessories Structures in Orchids.** In: *Orchid Biology: Reviews and perspectives.* Vol. IV. (Arditti ed.) Cornell University Press. Ithaca. pp. 192-226.
- Zaki, M.A.M. and Dickinson, H.G. 1991. **Microspore-derived Embryos in Brassica: The Significance of Symetry Division in Pollen Mitosis Pertama to Embryogenetic Development.** *Sex Plant Reprod.* Vol. 4:48
- Zarsky, V., Garrido, D., Rihova, L., Tupy, J., Vicente, O., and Herbele-Bors, E., 1992. **Depression of The Cell Cycle by Starvation is Involved in The Induction of Tobacco Pollen Embryogenesis.** *Sexual Plant Reproduction:* 5. pp. 189-194.
- Zhang, C.J., Wang, H., Ma, Y. and Kang, Y. 1994. **Regeration of Haploid Plants From Isolat Microspores of *Asparagus (Asparagus officinalis* L.).** *Plant Cell Reports.* Vol. 13. Springer-Verlag. pp. 637-640.

C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

C.1. Tujuan Khusus Penelitian Tahun Kedua

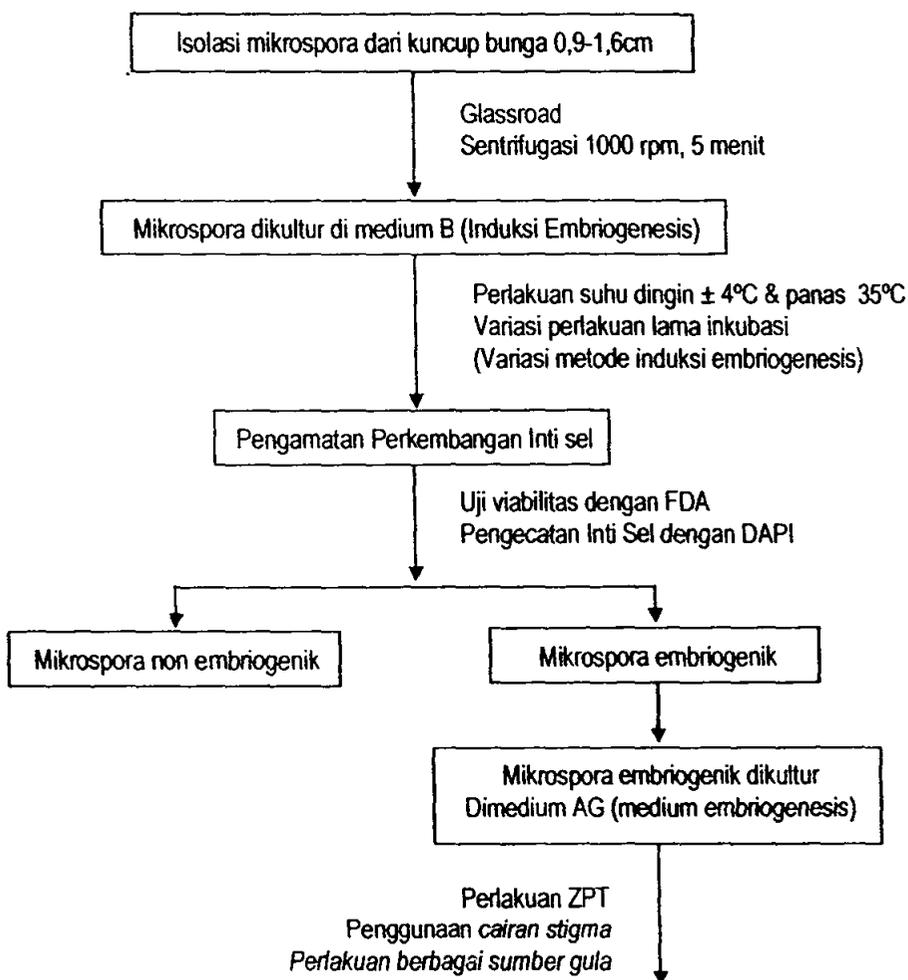
Tujuan akhir penelitian tahun kedua adalah mengoptimalkan metode induksi embriogenesis mikrospora dengan cara merekayasa medium dasar yang dipakai.

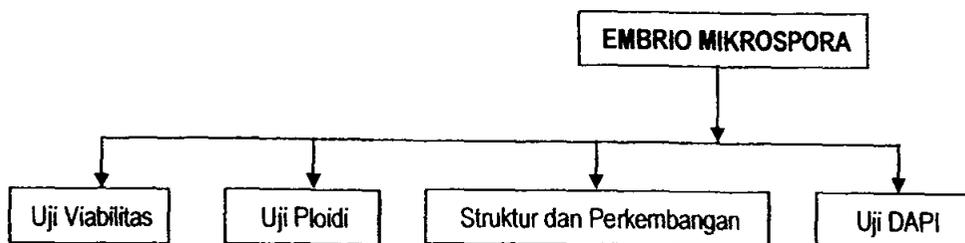
Tujuan khusus penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh berbagai sumber gula terhadap perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi.
2. Mengetahui pengaruh kombinasi hormon auksin dan sitokinin terhadap pertumbuhan dan perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi.
3. Mengetahui pengaruh cairan stigma terhadap pertumbuhan dan perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi.

C.2. Metode Penelitian

TAHUN KEDUA : Optimalisasi metode induksi dan embriogenesis mikrospora





C.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Departemen Biologi Fakultas SAINTEK Universitas Airlangga. Untuk Analisis sitologi, struktur dan perkembangan dilakukan di Laboratorium Mikroteknik Departemen Biologi Fakultas SAINTEK Universitas Airlangga.

C.2.2 Bahan Penelitian

1. Bahan Tanaman

Pada penelitian ini digunakan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl yang diperoleh dari Pusat Anggrek Royal Orchid, Prigen Jawa Timur. Eksplan yang dipakai adalah mikrospora yang akan diisolasi dari antera bunga yang masih dalam keadaan kuncup. Mikrospora yang dipakai dalam penelitian ini adalah mikrospora dari setiap ukuran kuncup bunga.

2. Bahan Kimia

Bahan kimia yang dipakai adalah bahan kimia penyusun media Knudson C (George & Sherinthong, 1992) yang dimodifikasi (Medium AG, Wahyuni & indrianto, 2001), medium B (Kyo & Harada, 1986), DAPI (4,6-Diamidino-phenylindol), dan bahan kimia untuk membuat preparat anatomi.

C.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlemeyer, cawan petri gelas $\Phi = 3\text{cm}$, $\Phi = 5\text{cm}$, $\Phi = 15\text{cm}$, gelas pengaduk, tabung reaksi, pinset, skalpel, lampu bunsen, scalpel blade, tabung sentrifugasi, sentrifuge, inkubator, kulkas, timbangan kasar, timbangan analitik, milipore, syring, penyaring, autoklaf, mikroskop inverted fluorescent. Lemari penabur Laminair Air Flow (LAF) yang dilengkapi dengan HEPA filter mess ukuran $0,2\mu\text{m}$, sprayer, pensil, gelas benda dan gelas penutup.

C.2.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Sterilisasi alat

Alat-alat disterilkan dengan autoklaf 15 menit, tekanan 1,5 atm, temperatur 121 °C.

2. Sterilisasi bahan

a. Sterilisasi media

Medium AG disterilkan dengan milipore filter steril dan medium B disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit 1,5 atm, 121°C.

b. Sterilisasi eksplan

Eksplan adalah mikrospora dari kuncup bunga anggrek ukuran 0,9-1,6cm setelah mendapat perlakuan dingin. Bunga disterilisasi dengan Bayclin (*sodium hypochloride* 5,25 %) selama 10 menit, dibersihkan dengan akuades dua kali. Sterilisasi eksplan dilakukan di dalam LAF.

C.2.5 Cara kerja tahap penelitian kedua

1. Isolasi Mikrospora

Isolasi mikrospora dilakukan dengan cara membuka kuncup bunga. Setelah kuncup bunga terbuka antera diambil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium B, selanjutnya digerus dengan gelas pengaduk, hingga mikrospora keluar. Suspensi mikrospora diambil dan ditampung dalam tabung sentrifus untuk disentrifugasi. Pelet adalah mikrospora.

2. Perlakuan dingin

Perlakuan dingin diberikan pada kuncup bunga dalam karangan, dengan cara kuncup bunga dibungkus aluminium foil kemudian karangan bunga diletakkan di tabung yang berisi air, dengan posisi pangkal bunga terendam air, selanjutnya disimpan dalam lemari es yang suhunya $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 7 hari.

4. Perlakuan panas dan medium starvasi

Kuncup bunga setelah mendapat perlakuan dingin disterilkan dengan Bayclin (*sodium hipochloride* 5,25%) selama 10 menit, dibuka, antera diangkat dengan pinset kemudian diletakkan di cawan petri $\phi = 10$ cm. Operkulum dipisahkan dari polinia dengan skapel. Polinia dipindah ke tabung reaksi yang berisi 1ml medium B. Selanjutnya mikrospora digerus dengan gelas pengaduk, filtrat dipindah ke tabung *sentrifuge*, lalu dicuci dengan medium B dua kali, disentrifugasi selama 5 menit, dengan kecepatan 1000 rpm. Medium B dibuang dan filtrat merupakan mikrospora terisolasi dipindah ke cawan

nnmmmmnnmpetri $\phi = 6\text{cm}$, yang berisi 3ml medium B. Tutup petri disegel dengan parafilm. Mikrospora dalam medium B disimpan dalam inkubator pada suhu 35°C selama 4 hari dan 6 hari.

5. Penanaman di medium AG (medium embriogenesis)

Kultur mikrospora di medium B setelah mendapat perlakuan panas diambil dengan pipet dipindah ke tabung *sentrifuge*. Disentrifugasi selama 5 menit, 1000 rpm medium B dibuang. Filtrat ditanam di cawan petri $\phi = 3,5\text{ cm}$ yang berisi 2ml medium AG. Cawan petri ditutup, kemudian disegel dengan parafilm Kultur diletakkan ditempat gelap pada suhu 25°C selama 2 minggu. Pada tahap ini digunakan berbagai sumber karbon, kombinasi hormon auksin dan sitokinin dan cairan stigma untuk mengoptimisasi pertumbuhan dan perkembangan mikrospora menjadi embrio.

6. Analisis sitologis

a. Pengamatan segar

Mikrospora diisolasi dari antera, isolat mikrospora diletakkan di atas gelas benda, ditetesi dengan medium B secukupnya, ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya.

b. Pengecatan DAPI

Pengecatan DAPI dimaksudkan untuk melihat perkembangan inti mikrospora. Mikrospora difiksasi dengan alkohol 70% : Asam Asetat Glasial (1:3,v/v) selama 15 menit. Selanjutnya dicuci dengan alkohol 70% 2x, dituang larutan DAPI 20 μl selama 15 menit, ditetesi dengan gliserin sebanyak dua tetes. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop fluorescen.

7. Penghitungan viabilitas mikrospora

Mikrospora viabel adalah mikrospora yang mampu bertahan hidup. Pada percobaan ini, yang dimaksud dengan mikrospora viabel adalah mikrospora yang masih utuh sitoplasmanya dan belum terplasmolisis.

Penghitungan dilakukan dengan cara mengamati kultur dengan mikroskop inverted. Selanjutnya jumlah mikrospora dihitung, baik mikrospora viabel maupun mikrospora yang plasmolisis sampai mencapai jumlah total 300 mikrospora. Penghitungan dilakukan paling tidak pada lima bidang pandang mikroskop (atas, bawah, kanan, kiri, dan tengah, dengan perbesaran mikroskop 200X).

Prosentase jumlah mikrospora yang viabel diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Mikrospora viabel}/300 \times 100\%$$