

**LAPORAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI
TAHUN 2010**



**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.
Dr. 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: 340/H3.13/PPd/2010 Tanggal : 3 Mei 2010

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN 2010**


HALAMAN PENGESAHAN

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

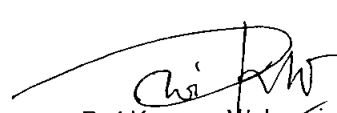
2. Ketua peneliti :
 a. Nama Lengkap : Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si., M.Si.
 b. Jenis Kelamin : Perempuan (P)
 c. NIP : 132318834
 d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
 e. Jabatan Struktural : -
 f. Bidang Keahlian : Kultur Jaringan Tumbuhan
 g. Fakultas/Departemen : Saintek/Biologi
 h. Perguruan Tinggi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

Surabaya, Oktober 2010

Mengetahui
 Dekan Fakultas Saintek UNAIR

 Prof. Win Darmanto, Drs., M.Si., Ph.D.
 NIP. 196111061987031003

Ketua Peneliti


 Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si. M.Si.
 NIP. 197701152006042002

Mengetahui
 Kepala Lembaga Penelitian

 Agus Purwanto, Apt., M.Si.
 NIP. 195908051987011001

A. LAPORAN HASIL PENELITIAN

RINGKASAN

Penelitian Induksi Embriogenesis Mikrospora Anggrek *Phalaenopsis amabilis*, (L.), Bl.: Upaya Untuk Mendapatkan Tanaman Galur Murni dalam Satu Generasi, pada tahun kedua ini bertujuan mengetahui pengaruh lama waktu, berbagai sumber gula, kombinasi hormon auksin dan sitokinin dan cairan stigma terhadap pertumbuhan dan perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi. Kuncup bunga ukuran 0,9-1,3 cm diberi perlakuan suhu dingin 4°C selama 7 hari. Kuncup bunga disterilkan dengan Bayclin 100% selama 10 menit, kemudian dicuci dengan aquades steril 2 kali. Mikrospora diisolasi dengan metode *glassroad*. Perlakuan suhu panas 35°C dan medium starvasi (medium B) diberikan pada mikrospora terisolasi. Setelah perlakuan suhu panas dan medium B mikrospora dikultur di medium New Phalaenopsis (NP) dengan perlakuan lama waktu inkubasi stres suhu dan medium starvasi, sumber gula, kombinasi hormon auksin, dan cairan stigma. Mikrospora diamati dalam keadaan segar, dihitung jumlah mikrospora yang viabel dan diamati perkembangan inti pada setiap tahap minggu. Dari penelitian ini diperoleh hasil kuncup lama waktu inkubasi terbaik adalah 6 hari stres suhu dan medium starvasi. Tidak ada perbedaan penggunaan sumber gula (sukrosa, glukosa dan maltosa) terhadap viabilitas mikrospora embriogenik, tetapi berpengaruh terhadap perkecambahan mikrospora. Perlakuan hormon 2,4D 2ppm mampu menginduksi mikrospora multinukleat tertinggi. Perlakuan hormon NAA 2ppm mampu menginduksi mikrospora binukleat simetri tertinggi. Perlakuan cairan stigma tidak meningkatkan jumlah mikrospora binukleat simetri dibanding kontrol

Kata Kunci: *P. amabilis* (L.) Bl, Orchid, androgenesis, mikrospora, sukrosa, maltosa, auksin, cairan stigma

SUMMARY

The research of Induction of Microspore Embryogenesis of *Phalaenopsis amabilis*, (L.), Bl. Orchid: Effort to Get Pure Line Plant in One Generation., in the second year is aimed to know the effect of incubation time, sugar resources, auxin and stigma mucilage toward growth and development of embryogenic microspore which has been induced by temperature stress and sugar starvation. Flower bud is given cold temperature treatment at 4°C, 7 dais, and then flower bud is sterilized by Bayclin 10 minute, and then is washed twice by sterile distilled water. Microspore is isolated by *glassroad* methode. Heat temperature treatment (35°C) and starvation medium (medium B) is given to microspore. After the heat temperature and starvation medium (medium B) microspore is cultured in New Phalaenopsis (NP) medium, with treatment of incubation time, sugar resources, auxin and stigma mucilage. Microspore is observed with and without DAPI staining every week The result of this research are incubation time of heat temperature stress and medium starvation is 6 dais, there is not effect of sugar resources toward embryogenic microspore viability, but there is effect of sugar resources toward microspore germination, treatment of 2,4D 2ppm can induce highest multinucleat microspore, treatment of NAA 4ppm can induce highest symmetrical binuleat microspore and the stigma mucilage can not increase the value of symmetrical binuleat microspore, compare with control.

Kata Kunci: *P. amabilis* (L.) Bl, orchid, androgenesis, microspore, sukrose, maltose, auxsin, stigma mucilage

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. Dekan 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. 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. Akhirmya, semoga karya penelitian ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Oktober 2010

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	2
LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN.....	3
PRAKATA.....	4
DAFTAR ISI.....	5
BAB I PENDAHULUAN.....	6
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	6
1.2 Rumusan Masalah.....	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1 Embriogenesis Mikrospora (Androgenesis).....	12
2.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Androgenesis.....	11
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	15
3.1 Tujuan Penelitian.....	15
3.2 Manfaat Penelitian.....	15
BAB IV METODE PENELITIAN.....	16
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
4.2 Bahan Penelitian.....	16
4.4 Bagan alir rencana penelitian tahun kedua.....	17
4.5 Prosedur Penelitian.....	18
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
5.1 Pengaruh lama waktu inkubasi stres suhu dan medium starvasi terhadap perkembangan mikrospora.....	21
5.2 Pengaruh sumber karbon terhadap perkembangan mikrospora.....	25
5.3 Pengaruh hormon auksin terhadap perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi.....	26
5.4 Pengaruh cairan stigma terhadap perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi.....	28
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	32
LAMPIRAN.....	36
NASKAH PUBLIKASI.....	38

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 memperbanyak 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 mumi

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) kearah 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).

Haplodi 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.

Pada penelitian tahun pertama telah diperoleh hasil 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).

Hasil yang diperoleh pada tahun pertama tersebut merupakan langkah awal dalam proses induksi embriogenesis mikrospora yang selanjutnya akan menjadi dasar pada penelitian kedua. Pada penelitian tahun kedua ini berfokus pada optimalisasi metode untuk meningkatkan populasi mikrospora embriogenik yang sudah diperoleh pada tahun pertama dengan berbagai perlakuan yang lazim dilakukan dalam kultur mikrospora.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, pada penelitian tahun pertama ini diambil permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh lama waktu inkubasi stres suhu dan medium starvasi terhadap perkembangan mikrospora embriogenik yang sdh diperoleh?
2. Apakah ada pengaruh berbagai sumber gula terhadap perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi?
3. Apakah ada pengaruh kombinasi hormon auksin terhadap perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi?
4. Apakah ada pengaruh cairan stigma terhadap perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi?

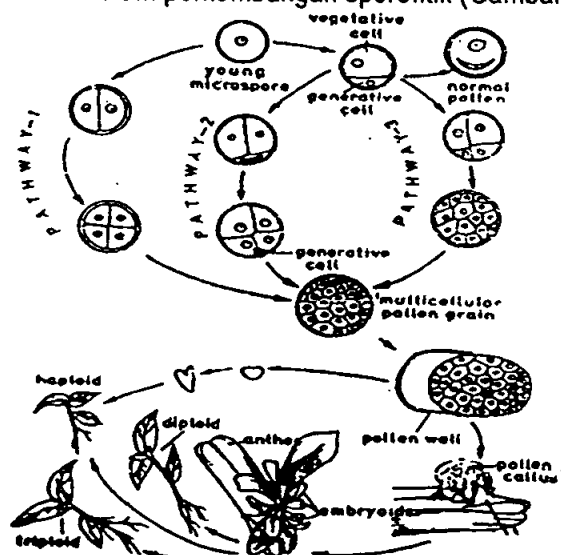
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

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 genotip jagung yang mampu berkembang menjadi embrio atau kalus haploid (Raghavan, 1997).

Perbedaan genotif 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 hybrida* 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 antera 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 nutrien, 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 KEDUA

3.1 Tujuan Penelitian

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

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

3.2 Manfaat Penelitian

Hasil yang ditargetkan pada penelitian tahun kedua adalah mengoptimalkan media untuk meningkatkan populasi mikrospora embriogenik yang didapat pada tahun pertama, agar mampu berkembang menjadi embrio.

Hasil akhir penelitian ini merupakan temuan baru tentang metode pemuliaan tanaman untuk mendapatkan tanaman galur mumi dalam satu generasi. Tanaman galur mumi merupakan induk silangan yang diharapkan dalam upaya pemuliaan tanaman untuk mendapatkan tanaman hibrida dengan kualitas yang bagus. Dengan didapatkan tanaman anggrek galur mumi 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 Institute of Tropical Diseases Universitas Airlangga. Penelitian dimulai pada bulan April sampai Oktober 2010.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Bahan Tanaman

Pada penelitian ini digunakan tanaman angrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl yang diperoleh dari Pusat Angrek 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 kuncup bunga yang berukuran 0,9-1,3 cm.

4.2.2 Bahan Kimia

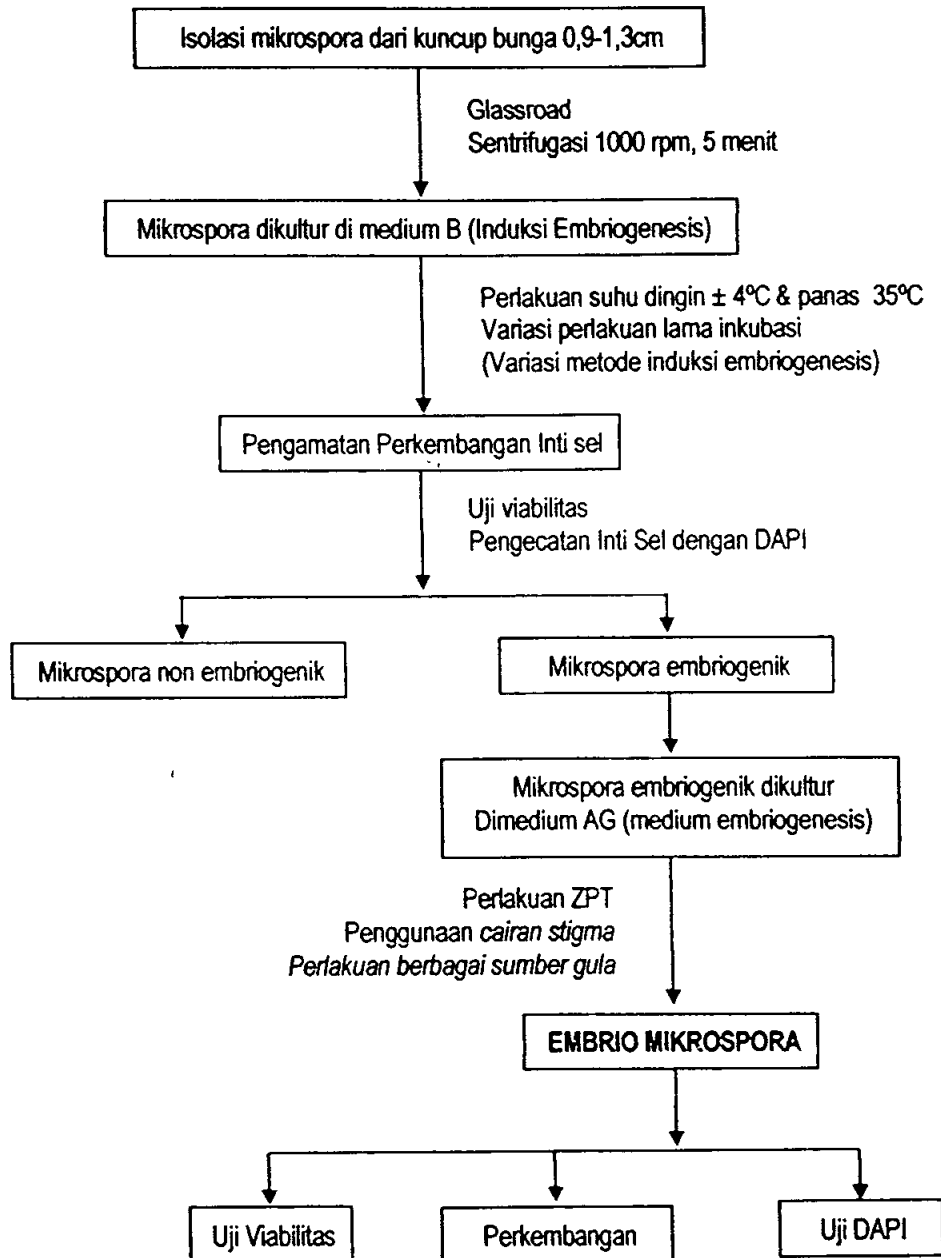
Bahan kimia yang dipakai adalah bahan kimia penyusun media NP (Ichihashi, 2002, lampiran 1) dan medium B (Kyo & Harada, 1986, lampiran 2), DAPI (4,6-Diamidino phenylindol), dan bahan kimia untuk membuat preparat anatomi.

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 kedua

TAHUN KEDUA : Optimalisasi metode induksi dan embriogenesis mikrospora



Gambar 4.1. Bagan alir rencana penelitian tahun kedua

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 NP 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 angrek 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 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.

4.5.3 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.

4.5.4 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 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 sesuai.

4.5.5 Penanaman di medium NP (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 New Phalaenopsis (NP).

Untuk optimalisasi metode untuk mendapatkan mikrospora embriogenik digunakan perlakuan sumber karbon, zat pengatur tumbuh dan cairan stigma. Sumber karbon yang digunakan adalah sukrosa, glukosa, dan maltosa 9%.

Perlakuan yang digunakan adalah penggunaan zat pengatur tumbuh Naphthalene Acetic Acid (NAA) dan 2,4-dichlorophenoxy-Acetic Acid (2,4-D) dengan konsentrasi masing-masing 0; 2; 4 ppm. Selain zat pengatur tumbuh digunakan juga cairan stigma, dengan perlakuan perbandingan medium NP dan Cairan Stigma (CS) yaitu: 2:0 ; 1,5:0,5 ; 1:1 (NP:CS).

Masing-masing cawan kultur berisi 2 ml suspensi mikrospora dengan media sesuai perlakuan, kemudian cawan petri ditutup dan disegel dengan parafilm. Kultur diletakkan ditempat gelap pada suhu 25°C selama 2 minggu.

4.5.6 Analisis sitologis

a. Pengamatan segar

Mikrospora diisolasi dari anthera, isolat mikrospora diletakkan di atas gelas benda, ditetesi dengan medium B secukupnya, ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya. Pengamatan perkembangan kultur dalam keadaan segar dilakukan juga selama masa kultur dengan menggunakan mikroskop inverted.

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

ul selama 15 menit, ditetesi dengan gliserin sebanyak dua tetes. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop fluorescen.

4.5.7 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:

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

Penghitungan viabilitas mikrospora dilakukan tiga kali ulangan.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pengaruh lama waktu inkubasi stres suhu panas dan medium starvasi terhadap perkembangan mikrospora

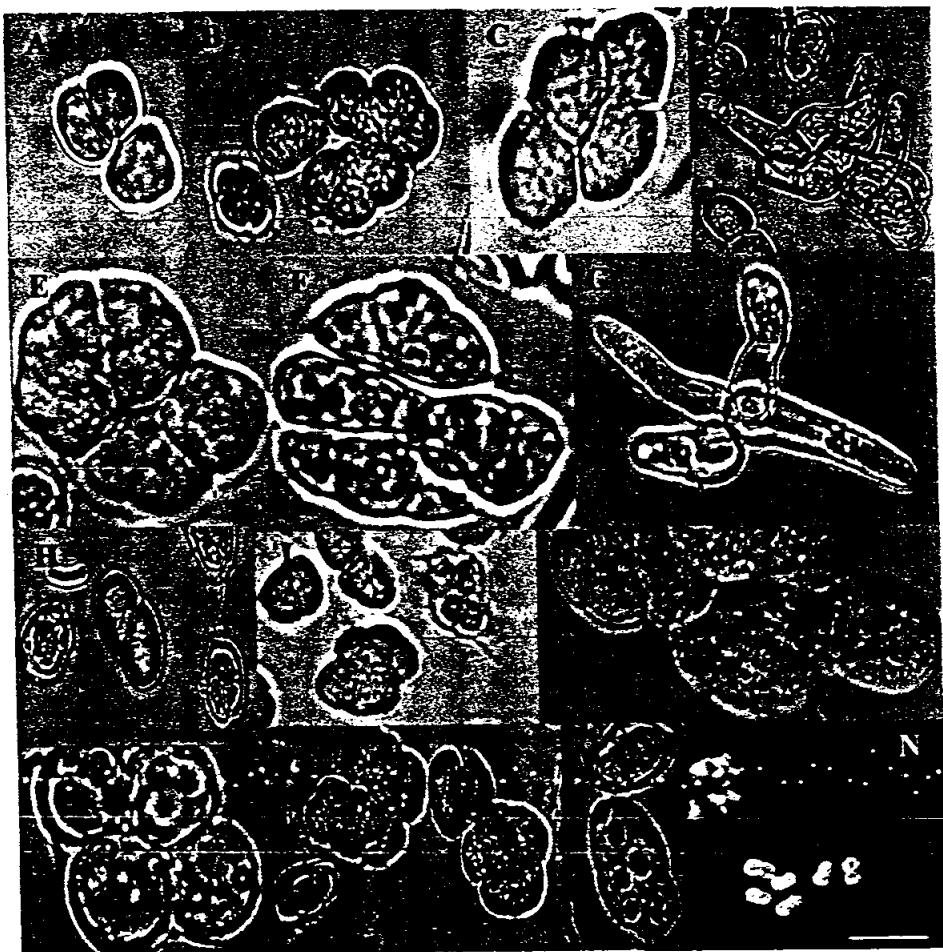
Perlakuan panas diberikan pada mikrospora angrek pada suhu 35 °C dalam medium starvasi. Yang dimaksud dengan medium starvasi adalah medium B, yaitu medium miskin hara, khususnya miskin unsur nitrogen dan gula (Kyo and Harada, 1986). Perlakuan panas dan medium starvasi dilakukan di ruang gelap. Perlakuan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

Tabel 5.1. Hasil Struktur dan perkembangan mikrospora angrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Dengan perlakuan stres suhu panas dan medium starvasi

No	Perlakuan	Parameter yang diamati				Keterangan
		Inti (stadium)	Granul	Sekat antar tetrad	Dinding Sel	
1	P0H0	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	-
2	P0H2	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar
3	P0H4	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar dan ada pertumbuhan tabung polen
4	P0H6	Ada (binukleat simetri)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar dan ada pertumbuhan tabung polen
5	P1H0	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	-
6	P1H2	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar
7	P1H4	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar

8	P1H6	Ada (binukleat simetri)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar
---	------	-------------------------------	-----	-----	-----	------------------------

Ket : P0H0 = Kontrol hari kenol P0H2 = Kontrol hari kedua
 P0H4 = Kontrol hari keempat P0H6 = Kontrol hari keenam
 P1H0 = Perlakuan hari kenol P1H2 = Perlakuan hari kedua
 P1H4 = Perlakuan hari keempat P1H6 = Perlakuan hari keenam



Gambar 5.1 Struktur dan perkembangan mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. (A) Mikrospora kontrol hari ke 0; (B) Mikrospora kontrol hari ke 2; (C) Mikrospora kontrol hari ke 4; (D) Mikrospora kontrol hari ke 4 (pertumbuhan tabung polen/berkecambah); (E) Mikrospora kontrol hari ke 6 (ukuran sel membesar); (F) Mikrospora kontrol hari ke 6 (binukleat simetri); (G) Mikrospora kontrol hari ke 6 (pertumbuhan tabung polen/berkecambah); (H) Mikrospora perlakuan hari ke 0; (I) Mikrospora perlakuan hari ke 2; (J) Mikrospora perlakuan hari ke 4; (K)

Mikrospora perlakuan hari ke 6 (mulai berkecambah); (L) Mikrospora perlakuan hari ke 6 (ukuran sel membesar); (M) Mikrospora perlakuan hari ke 6 (binukleat simetri); N. Mikrospora membelah simetri dengan pengecatan DAPI.

Dari Tabel 5.1 dapat diketahui, bahwa pada P0H0, P0H2, P1H0, P1H2, dan P1H4 terdapat inti mikrospora yang belum mengalami pembelahan (uninukleat), granula, sekat antar tetrad dan dinding sel, tetapi pada P0H2, P1H2 dan P1H4 ukuran mikrospora mulai membesar (Gambar 5.1. A, B, H, I dan J), sedangkan pada P0H4 selain inti masih uninukleat, bergranula, bersekat, berdinding sel dan ukuran selnya membesar juga dijumpai adanya pertumbuhan tabung polen (Gambar 5.1. C dan D). Pada P0H6 dan P1H6 dijumpai adanya granula, sekat antar tetrad, dinding sel dan ukuran sel yang membesar, juga inti yang sudah membelah menghasilkan dua inti (binukleat simetri), tetapi pada P0H6 dijumpai adanya pertumbuhan tabung polen, sedangkan pada P1H6 dijumpai mikrospora dalam tahap akan berkecambah (Gambar 5.1. E, F, G, K, L dan M).

Berdasarkan Tabel 5.1 dan Gambar 5.1 menunjukkan bahwa ada perubahan struktur dan perkembangan mikrospora dengan perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi.

Lama waktu inkubasi kultur mikrospora pada perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi yang memberikan hasil perkembangan mikrospora binukleat simetri adalah 6 hari.

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).

5.1.2 Persentase mikrospora yang viabel

Perbandingan persentase mikrospora yang viabel antara kelompok kontrol dan perlakuan ditunjukkan pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rerata persentase mikrospora viabel kelompok kontrol dan perlakuan.

No	Perlakuan	Persentase viabilitas mikrospora (%)
1	P0H0	46,98 ± 0,65
2	P0H2	42,26 ± 0,80
3	P0H4	39,51 ± 1,45
4	P0H6	38,69 ± 0,78
5	P1H0	45,06 ± 0,65
6	P1H2	44,93 ± 0,84
7	P1H4	39,98 ± 0,35
8	P1H6	38,98 ± 2,33

Tabel 5.3. Hasil Uji Kruskal Wallis persentase mikrospora yang viabel

	Viabel
Chi-Square	1.001
Df	1
Asymp. Sig.	.317

Dari hasil Uji Kruskal Wallis (Tabel 5.3) didapat $p > 0,05$ (0,317) maka H_0 diterima. Hal ini berarti tidak ada pengaruh perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi terhadap persentase mikrospora yang viabel, sehingga tidak perlu dilakukan uji lanjutan. Walaupun tidak ada pengaruh perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi terhadap persentase mikrospora yang viabel, P0H0 menunjukkan persentase mikrospora viabel paling tinggi (46,98%) (Tabel 5.2).

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 kenampakkan mikrospora yang diduga embriogenik. Mikrospora embriogenik pada *wheat* lebih besar dari mikrospora non embriogenik (Tourraev *et al.*, 1996).

5.2 Pengaruh Sumber Karbon terhadap perkembangan Mikrospora

Sumber karbon merupakan faktor penting dalam menentukan keberhalisan suatu kultur, terutama kultur mikrospora. Untuk perlakuan sumber karbon digunakan sukrosa, glukosa dan maltosa, dengan konsentrasi masing-masing 9%. Hasil pengamatan yang diperoleh dipaparkan dalam Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Persentase mikrospora viabel pada medium *New Phalaenopsis* dengan penambahan sumber karbon sukrosa dan maltosa minggu ke-2.

Lama inkubasi (hari ke-)	Persentase viabilitas mikrospora (%)			Persentase perkecambahan Mikrospora (%)		
	Sukrosa	Glukosa	Maltosa	Sukrosa	Glukosa	Maltosa
0	74,67 ± 0,04	73,77 ± 0,04	75,67 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0	0
2	71,30 ± 0,07	72,17 ± 0,05	70,67 ± 0,02	3,54 ± 0,07	0	0
4	68,33 ± 0,07	70,13 ± 0,03	70,33 ± 0,03	36,13 ± 0,07	0	0
6	66,58 ± 0,05	70,62 ± 0,06	69,67 ± 0,02	48,1 ± 0,05	0	0

Dari Tabel 5.4 dapat dilihat bahwa pengaruh sumber karbon terhadap viabilitas mikrospora tidak ada beda nyata antar ketiga perlakuan sumber karbon, namun terhadap persentase perkecambahan mikrospora, hanya perlakuan sukrosa yang menunjukkan perkembangan mikrospora ke arah gametofitik. Pada perlakuan sukrosa mikrospora berkecambah seperti perkembangan mikrospora secara normal, yaitu membentuk buluh kecambah (Gambar 5.2).



Gambar 5.2 Mikrospora dengan perlakuan berbagai sumber karbon. A. Sukrosa; B. Glukosa; C. Maltosa

Dari Gambar 5.2 dapat dilihat morfologi mikrospora setelah 2 minggu kultur menunjukkan perbedaan. Perlakuan glukosa dan maltosa tidak menunjukkan perkembangan ke arah gametofitik (tidak terbentuk buluh kecambah) tetapi secara morfologi tetap menunjukkan kenampakan struktur yang berbeda yaitu mikrospora dengan perlakuan glukosa terlihat ada perkembangan sel dari masing-masing tetrad, sementara untuk perlakuan maltosa tidak demikian, bahkan mikrospora tetrad tampak kompak dan menyatu antar tetradnya. Berdasarkan penelusuran perkembangan mikrospora struktur morfologi dengan perlakuan glukosa akan melanjutkan perkembangan membentuk buluh kecambah. Jadi untuk selanjutnya sumber karbon yang akan digunakan dalam penelitian selanjutnya adalah maltosa.

5.3. Pengaruh hormon auksin terhadap perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi

Zat pengatur tumbuh merupakan faktor yang berpengaruh dalam keberhasilan embriogenesis mikrospora. Dalam penelitian ini digunakan zat pengatur tumbuh auksin 2,4-D dan NAA. Hasil perkembangan mikrospora dengan perlakuan 2,4-D dipaparkan pada Tabel 5.5 dan perlakuan NAA dipaparkan dalam tabel 5.6.

Keberhasilan optimalisasi jumlah mikrospora embriogenik dilihat dari jumlah mikrospora binukleat simetri dan jumlah mikrospora multinukleat. Dari dua parameter tersebut terlihat bahwa perlakuan 2,4-D 2 ppm terlihat menunjukkan perkembangan mikrospora multinukleat tertinggi (Tabel 5.5 dan Gambar 5.4D) dan perlakuan NAA 4ppm menunjukkan perkembangan mikrospora binukleat simetri tertinggi (Tabel 5.6 dan Gambar 5.4 A,B).

Tabel 5.5 Perkembangan kultur mikrospora dengan perlakuan 2,4-D minggu ke-2

Perlakuan 2,4-D	Jumlah mikrospora ^{*)}			
	Uninukleat	Binukleat		Multinukleat
		Simetri	Asimetri	
0ppm	51±2	179±5	75 ±3	3 ±3
2ppm	73±3	129±2	85 ±5	23 ±2
4ppm	69±2	169±4	65 ±4	7 ±1

^{*)} dalam 300 mikrospora yang dihitung

Tabel 5.6 Perkembangan kultur mikrospora dengan perlakuan NAA minggu ke-2

Perlakuan NAA	Jumlah mikrospora ^{*)}			
	Uninukleat	Binukleat		Multinukleat
		Simetri	Asimetri	
0ppm	51±2	179±5	75 ±3	3 ±3
2ppm	58±1	182±3	55 ±2	5 ±2
4ppm	56±4	188±3	55 ±5	4 ±4

^{*)} dalam 300 mikrospora yang dihitung

Dari Tabel 5.5 dan 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).

Sampai saat ini perkembangan kultur mikrospora dengan berbagai perlakuan zat pengatur tumbuh masih teramati sampai pada perkembangan mikrospora multinukleat atau multiseluler. Untuk mendapatkan tanaman galur murni perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk memantau perkembangan dari mikrospora multinukleat tersebut.

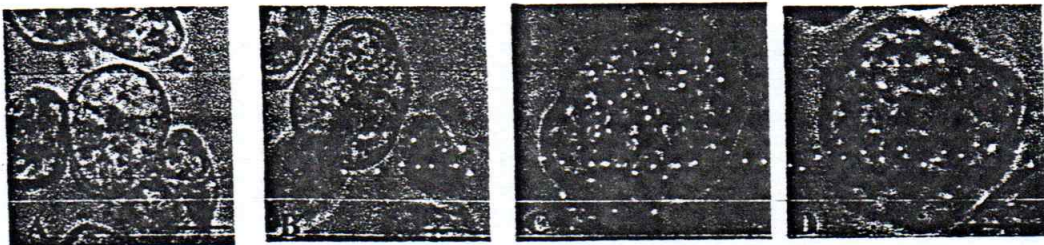
5.4 Pengaruh cairan stigma terhadap perkembangan mikrospora embriogenik hasil induksi dengan stres suhu dan medium starvasi.

Perlakuan cairan stigma juga dilakukan untuk mengoptimalkan jumlah mikrospora embriogenik. Cairan stigma diperoleh dengan cara mengkultur gymnostemium dan ovarium dalam medium NP selama satu minggu. Setelah satu dari lubang stigma keluar lendir yang kaya akan nutrisi dan hormon yang berperan dalam meningkatkan keberhasilan induksi embriogenesis mikrospora. Hasil pengamatan perkembangan mikrospora dapat dilihat di Tabel 5.7). Seperti yang sudah dilakukan pada tembakau (Touraev, 1996) dan gandum (Indrianto, 2004), namun dalam penelitian ini perlakuan cairan stigma tidak meningkatkan jumlah mikrospora binukleat simetri maupun mikrospora multinukleat.

Tabel 5.7 Perkembangan kultur mikrospora dengan perlakuan cairan stigma minggu ke-2

Perlakuan NP:CS (ml)	Jumlah mikrospora ⁾			
	Uninukleat	Binukleat		Multinukleat
		Simetri	Asimetri	
2:0	51±2	179±5	75 ±3	3 ±3
1,5:0,5	81±4	114±2	105 ±4	0
1:1	102±3	175±1	23±3	0

⁾ dalam 300 mikrospora yang dihitung



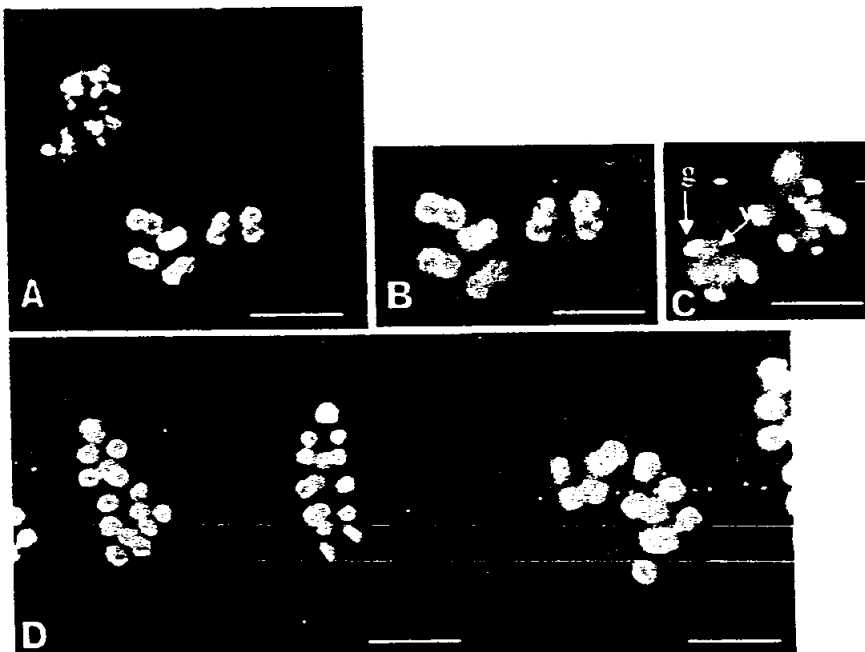
Gambar 5.3 Perkembangan mikrospora pada minggu ke-2. A. Mikrospora Embriogenik Uniseluler; B-D. Mikrospora Multinukleat atau Multiseluler. Bar:

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 nutrien 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 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 valuola tidak teramati dengan jelas (Gambar 5.3). Setelah pengamatan morfologi menunjukkan adanya perubahan struktur dilakukan pengecatan dengan DAPI untuk mengetahui pembelahan pada inti (Gambar 5.4).



Gambar 5.4 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

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 yang terus berkembang. 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

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Lama inkubasi stres suhu panas dan medium starvasi yang menginduksi mikrospora embriogenik adalah 6 hari
2. Sumber karbon yang efektif untuk menginduksi embriogenesis mikrospora angrek *P. amabilis* (L.) Bl. adalah maltosa 9%
3. Perlakuan hormon 2,4D 2ppm mampu menginduksi mikrospora multinukleat tertinggi
4. Perlakuan hormon NAA 2ppm mampu menginduksi mikrospora binukleat simetri tertinggi
5. Perlakuan cairan stigma tidak meningkatkan jumlah mikrospora binukleat simetri dibanding kontrol

6.2 Saran

Mengingat, bahwa telah diperoleh jumlah mikrospora embriogenik (binukleat simetri dalam jumlah tinggi dan mikrospora multinukleat/multiseluler (proembrio), maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui perkembangan dan pertumbuhan mikrospora embriogenik dan embrio yang sudah diperoleh agar 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 Embryogenesis**. In: *In Vitro Embryogenesis in Plant*. (Trevor A.T. ed.). Kluwer Academic Publishers. 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 York. 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 Plantarum*. 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 Farmasi. 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., Arnison 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). Prc 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*. (Johni, 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 Cellular and Molecular Changes**. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 84. Canada. pp. 668-678.
- Raghavan, V., 1997. **Molecular Embryology of Flowering Plants**. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 462-522.
- Sangwan, R.S. and Sangwan-Horreeel, 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-Norreeel, 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., Vincente, 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 3: GAMBAR TANAMAN YANG DIPAKAI



Gambar 7.1 : Anggrek *P. amabilis* (L)Bl.

NASKAH PUBLIKASI

STRUKTUR DAN PERKEMBANGAN KULTUR MIKROSPORA ANGGREK BULAN *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. DENGAN PERLAKUAN STRES SUHU DAN MEDIUM STARVASI

Dwi Kusuma Wahyuni, Dinik Styaningtyas, Junairiah Thin Soedarti,
Edy Setiti Wida Utami, Hery Purnobasuki
Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga
kusumaanwar@yahoo.com

ABSTRACT

This research was aimed to know the effect of combination stress temperature and starvation medium treatment to the structure and development of microspore, percentage of viable microspore and to get the best incubation time resulting symmetrical binucleate microspore of Moon Orchid (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.) This research was an experimental laboratories research and using a Completely Randomized Design. The treatment were P1 = starvation medium at 35°C and P0 = *New Phalaenopsis* (NP) medium at room temperature (as a control). Microspore explant were isolated from flower bud with 0.8-1.6 cm length which have got cold treatment (4°C) for 7 days. The microspore were cultured on starvation medium and incubated at 35°C for 6 days, and then the microspore were transferred to *New Phalaenopsis* (NP) medium and incubated at room temperature. As a control, microspore were cultured on *New Phalaenopsis* (NP) medium and incubated at room temperature. Percentage of viable microspore were analyzed with Kruskal-Wallis test ($\alpha=5\%$). The results showed that the highest percentage of viable microspore were 46.98%. There was no effect of combination stress temperature and starvation medium treatment to the percentage of microspore viable but there was a different structure and development besides treatment and control group. Microspore became bigger and was found symmetrical binucleate microspore by stress temperature and starvation medium on sixth incubation.

Key word: *microspore, moon orchid, heat shock, starvation medium.*

PENGANTAR

Phalaenopsis amabilis (L.) Bl. seringkali dipilih sebagai induk betina dalam persilangan karena memiliki ukuran bunga yang besar, berdaging tebal serta dapat menurunkan warna putih dengan banyak kuntum dengan tangkai bunga yang panjang dan kuat (Copra *et al.*, 1996). Perkembangbiakan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. dapat dilakukan secara generatif dengan memperbanyak tanaman melalui biji.

Perkembangbiakan secara generatif sangat menguntungkan dalam hal bisnis karena dalam satu buah anggrek dapat dihasilkan sekitar 2-3 juta biji, tetapi karena tidak ada galur muminya mengakibatkan biji yang dihasilkan mempunyai variasi genetik sehingga sulit memprediksi hasil keturunannya (Wahyuni *et al.*, 2007).

Dalam rangka peningkatan kualitas anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. sebagai induk silangan dapat dilakukan dengan kultur mikrospora (Herdiyanti, 2005). Mikrospora adalah serbuk sari yang masih muda dengan struktur satu inti (Bhojwani & Bhatnagar, 1999). Pada perkembangan normal, mikrospora ber-kembang menjadi polen dengan menghasilkan 2 inti sperma. Pada keadaan tertentu hal ini dapat dibelokkan ke arah perkembangan sporofitik untuk menghasilkan embrio atau planlet yang bersifat haploid. Peristiwa ini disebut embriogenesis mikrospora atau disebut juga dengan androgenesis (Hause *et al.*, 1993).

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.

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.

Pada penelitian sebelumnya Wahyuni dan Indrianto (2001), berhasil menginduksi embriogenesis mikrospora *Dendrobium anita* pada stadium uninukleat akhir (pada ukuran kuncup bunga 1,8-2,2 cm) dengan kombinasi stres suhu pada 33°C dan medium starvasi

gula dan nitrogen. Pada penelitian ini, perlakuan suhu yang diberikan pada mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl adalah 35°C.

Sampai saat ini, data penelitian induksi embriogenesis anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl masih sangat kurang. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh perlakuan stres suhu dan medium starvasi terhadap struktur dan perkembangan mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

Pengamatan struktur dan perkembangan mikrospora dapat dilihat dari struktur mikrospora (adanya granula, sekat antar tetrad dan dinding sel), perkembangan inti mikrospora (uninukleat, binukleat dan multinukleat) dan persentase mikrospora yang viabel selama perlakuan stres suhu dan medium starvasi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Penelitian

Bahan eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl yang diperoleh dari *D&D Nursery* di daerah Batu Malang. Mikrospora diisolasi dari kuncup anggrek pada stadium uninukleat akhir (0,8-1,6cm) (Wahyuni *et al.*, 2008). Bahan kimia yang digunakan meliputi bahan kimia penyusun medium starvasi (B) (Kyo & Harada, 1986), medium *New Phalaenopsis* (NP) (Ichihashi, *et al.*, 2001).

Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Perlakuan meliputi P1 = Medium starvasi (B) pada stres suhu 35°C (perlakuan) dan P0 = Medium *New Phalaenopsis* (NP) pada suhu ruang (sebagai kontrol).

Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*independent variable*): kombinasi perlakuan suhu dan medium.
2. Variabel terikat (*dependent variable*): persentase mikrospora yang viabel, struktur mikrospora (adanya granula, sekat antar tetrad dan dinding sel) dan perkembangan inti mikrospora.
3. Variabel kendali: pH medium (pH medium B 7, pH medium NP 5,6), temperatur, dan pencahayaan.

Cara Kerja

Perlakuan suhu rendah/cold shock

Perlakuan suhu rendah diberikan pada kuncup bunga selama 7 hari. Perlakuan suhu rendah dilakukan dengan cara menyimpan kuncup bunga di dalam refrigerator dengan suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Isolasi dan penanaman mikrospora pada medium B

Isolasi dan penanaman mikrospora dilakukan di dalam Laminair Air Flow Cabinet (L AFC). Kuncup bunga setelah mendapat perlakuan suhu rendah, disterilkan dengan clorox absolut selama 10 menit, selanjutnya dibilas dengan akuades steril 3 kali. Kuncup bunga dibuka, anter diangkat dengan pinset kemudian diletakkan di cawan petri diameter 15 cm. Operkulum (tudung penutup polinia) dipisahkan dari polinia dengan skalpel. Polinia dipindah ke tabung reaksi yang berisi 1 ml medium B. Selanjutnya mikrospora digerus dengan gelas pengaduk, filtrat diendapkan 1 jam. Medium B dibuang dan filtrat merupakan mikrospora terisolasi, selanjutnya filtrat dipindah ke cawan petri *disposable* diameter 3 cm yang berisi 3 ml medium B. Sebagai kontrol mikrospora ditanam pada medium NP pada petri yang sama dan diinkubasi pada suhu ruang.

Perlakuan stres suhu dan medium starvasi

Mikrospora yang telah ditanam pada medium B diinkubasi pada suhu 35°C selama 6 hari.

Penanaman pada medium *New Phalaenopsis* (NP)

Mikrospora ditanam pada medium NP setelah mendapat perlakuan kombinasi stres suhu dan medium B selama 6 hari. Penanaman dilakukan di dalam L AFC.

Penghitungan persentase mikrospora yang viabel

Penghitungan dilakukan dengan cara mengamati kultur mikrospora dengan mikroskop inverted. Sebelum mendapat persentase mikrospora yang viabel, perlu diketahui jumlah mikrospora yang viabel dan mikrospora yang plasmolisis. Mikrospora viabel disini adalah mikrospora yang tidak terplasmolisis (sitoplasma utuh dan berbatasan langsung dengan dinding sel), sedangkan mikrospora yang mengalami plasmolisis terlihat dengan adanya pengerutan protoplasma (pada tumbuhan menjauhi dinding sel). Penghitungan dilakukan pada lima bidang pandang mikroskop (atas, bawah, kanan, kiri dan tengah).

Dalam Widiastuti dan Palupi (2008), persentase mikrospora yang viabel diperoleh dengan rumus sebagai berikut :

Persentase mikrospora yang viabel

$$= \frac{T}{T + M} \times 100\%$$

T = Mikrospora yang viabel

M = Mikrospora plasmolisis

Analisis Data

Data gambar yang menunjukkan struktur mikrospora (adanya granul, sekat antar tetrad, dinding sel) dan perkembangan inti mikrospora selama perlakuan stres suhu dan medium starvasi dianalisis secara deskriptif. Data persentase mikrospora yang viabel dianalisis dengan Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$), bila ada beda dilanjutkan dengan Uji Mann Whitney ($\alpha=5\%$).

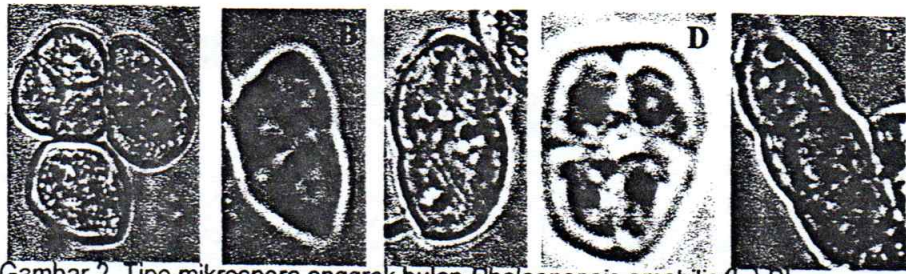
HASIL

Struktur dan perkembangan mikrospora

Pengaruh perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi terhadap kultur mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl, diamati pada struktur mikrospora, yaitu adanya granula, sekat antar tetrad, dinding sel dan perkembangan inti mikrospora (Tabel 1 dan Gambar 3). Mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl berupa polen tetrad, yaitu empat mikrospora berkelompok menjadi satu. Mikrospora tetrad mempunyai bentuk yang bermacam-macam, pada penelitian ini tipe yang teramati adalah tipe tetrahedral, *decussate*, rhomboidal, *square* dan linier (Gambar 2).



Gambar 1. Mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.
1, Dinding sel; 2, Inti sel; 3, Granul; 4, Sekat antar tetrad.

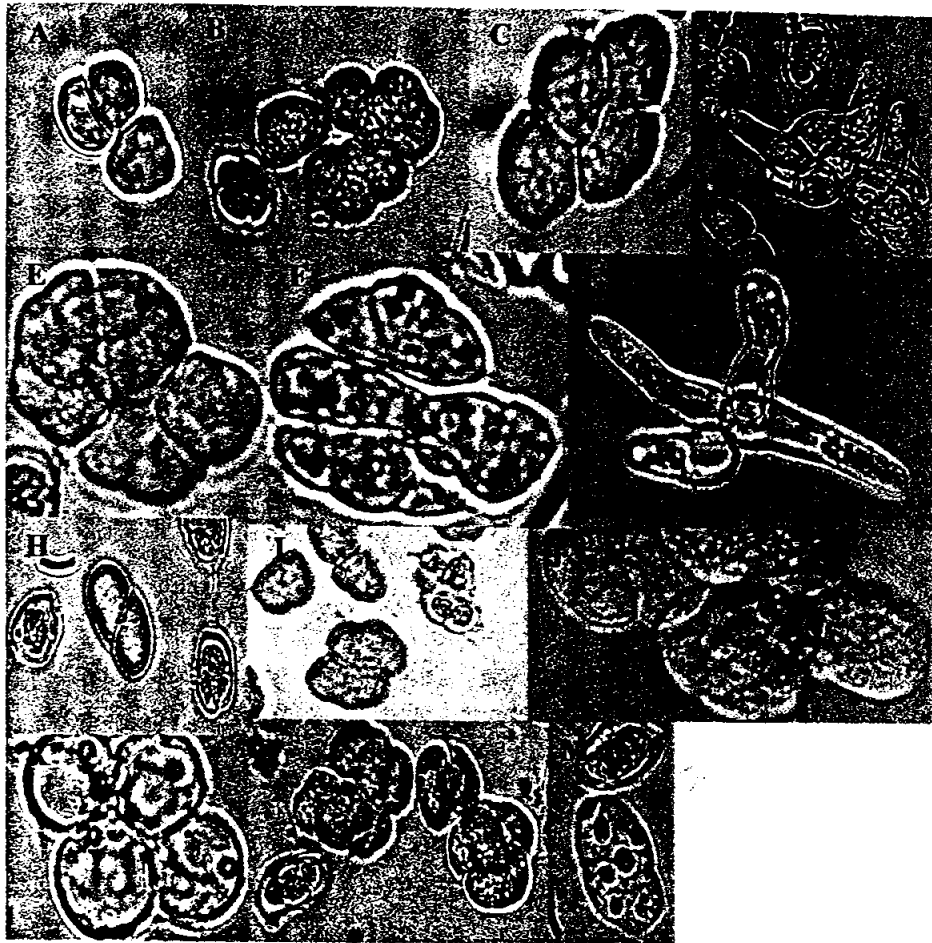


Gambar 2. Tipe mikrospora angrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl
(A) Tetrahedral (tanda panah), (B) *Decussate*, (C) *Rhomboidal*, (D) *Square*, (E) *Linier*.

Tabel 1. Hasil pengamatan struktur dan perkembangan mikrospora angrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

No	Perlakuan	Parameter yang diamati				Keterangan
		Inti (stadium)	Granul	Sekat antar tetrad	Dinding Sel	
1	P0H0	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	-
2	P0H2	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar
3	P0H4	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar dan ada pertumbuhan tabung polen
4	P0H6	Ada (binukleat simetri)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar dan ada pertumbuhan tabung polen
5	P1H0	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	-
6	P1H2	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar
7	P1H4	Ada (uninukleat)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar
8	P1H6	Ada (binukleat simetri)	Ada	Ada	Ada	Ukuran sel membesar

Ket : P0H0 = Kontrol hari kenol P0H2 = Kontrol hari kedua
 P0H4 = Kontrol hari keempat P0H6 = Kontrol hari keenam
 P1H0 = Perlakuan hari kenol P1H2 = Perlakuan hari kedua
 P1H4 = Perlakuan hari keempat P1H6 = Perlakuan hari keenam



Gambar 3. Struktur dan perkembangan mikrospora anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. (A) Mikrospora kontrol hari ke 0; (B) Mikrospora kontrol hari ke 2; (C) Mikrospora kontrol hari ke 4; (D) Mikrospora kontrol hari ke 4 (pertumbuhan tabung polen/berkecambah); (E) Mikrospora kontrol hari ke 6 (ukuran sel membesar); (F) Mikrospora kontrol hari ke 6 (binukleat simetri); (G) Mikrospora kontrol hari ke 6 (pertumbuhan tabung polen/berkecambah); (H) Mikrospora perlakuan hari ke 0; (I) Mikrospora perlakuan hari ke 2; (J) Mikrospora perlakuan hari ke 4; (K) Mikrospora perlakuan hari ke 6 (mulai berkecambah); (L) Mikrospora perlakuan hari ke 6 (ukuran sel membesar); (M) Mikrospora perlakuan hari ke 6 (binukleat simetri).

Dari Tabel 1 dapat diketahui, bahwa pada P0H0, P0H2, P1H0, P1H2, dan P1H4 terdapat inti mikrospora yang belum mengalami pembelahan (uninukleat), granula, sekat antar tetrad dan dinding sel, tetapi pada P0H2, P1H2 dan P1H4 ukuran mikrospora mulai membesar (Gambar 3. A, B, H, I dan J), sedangkan pada P0H4 selain inti masih

uninukleat, bergranula, bersekat, berdinding sel dan ukuran selnya membesar juga dijumpai adanya pertumbuhan tabung polen (Gambar 3. C dan D). Pada P0H6 dan P1H6 dijumpai adanya granula, sekat antar tetrad, dinding sel dan ukuran sel yang membesar, juga inti yang sudah membelah menghasilkan dua inti (binukleat simetri), tetapi pada P0H6 dijumpai adanya pertumbuhan tabung polen, sedangkan pada P1H6 dijumpai mikrospora dalam tahap akan berkecambah (Gambar 3. E,F, G, K, L dan M).

Berdasarkan Tabel 1 dan Gambar 3 menunjukkan bahwa ada perubahan struktur dan perkembangan mikrospora dengan perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi.

Lama waktu inkubasi kultur mikrospora pada perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi yang memberikan hasil perkembangan mikrospora binukleat simetri adalah 6 hari.

Persentase mikrospora yang viabel

Perbandingan persentase mikrospora yang viabel antara kelompok kontrol dan perlakuan ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Rerata persentase mikrospora viabel kelompok kontrol dan perlakuan.

No	Perlakuan	Persentase viabilitas mikrospora (%)
1	P0H0	46,98 ± 0,65
2	P0H2	42,26 ± 0,80
3	P0H4	39,51 ± 1,45
4	P0H6	38,69 ± 0,78
5	P1H0	45,06 ± 0,65
6	P1H2	44,93 ± 0,84
7	P1H4	39,98 ± 0,35
8	P1H6	38,98 ± 2,33

Tabel 3. Hasil Uji Kruskal Wallis persentase mikrospora yang viabel

	Viabel
--	--------

Perbandingan persentase mikrospora yang viabel antara kelompok kontrol dan perlakuan ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Rerata persentase mikrospora viabel kelompok kontrol dan perlakuan.

No	Perlakuan	Persentase viabilitas mikrospora (%)
1	P0H0	46,98 ± 0,65
2	P0H2	42,26 ± 0,80
3	P0H4	39,51 ± 1,45
4	P0H6	38,69 ± 0,78
5	P1H0	45,06 ± 0,65
6	P1H2	44,93 ± 0,84
7	P1H4	39,98 ± 0,35
8	P1H6	38,98 ± 2,33

Tabel 3. Hasil Uji Kruskal Wallis persentase mikrospora yang viabel

	Viabel
Chi-Square	1.001
Df	1
Asymp. Sig.	.317

Dari hasil uji Kruskal Wallis (Tabel 3) didapat $p > 0,05$ (0,317) maka H_0 diterima. Hal ini berarti tidak ada pengaruh perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi terhadap persentase mikrospora yang viabel, sehingga tidak perlu dilakukan uji lanjutan. Walaupun tidak ada pengaruh perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi terhadap persentase mikrospora yang viabel, P0H0 menunjukkan persentase mikrospora viabel paling tinggi (46,98%) (Tabel 2).

PEMBAHASAN

Struktur dan perkembangan mikrospora

Penelitian ini menunjukkan hasil bahwa dengan perlakuan stres suhu dan medium starvasi, berpengaruh terhadap struktur dan perkembangan mikrospora (Tabel 1 dan Gambar 3). Struktur mikrospora yang teramati yaitu berupa polen tetrad dengan granula, sekat antar tetrad, dinding sel dan inti sel. Mikrospora angrek bulan *Phalaenopsis amabilis* berupa polen tetrad, yaitu empat mikrospora berkelompok menjadi satu. Dalam Yeung (1987), polen tetrad tersebut disebabkan pada saat pemisahan dinding sel induk mikrospora, tidak semua plasmodesmata terpotong, sehingga menyebabkan hubungan sitoplasmik yang mengikat mikrospora dalam keadaan tetrad sampai polen dewasa.

Mikrospora tetrad mempunyai bentuk yang bermacam-macam, pada penelitian ini tipe yang teramati adalah tipe tetrahedral, decussata, square, rhomboidal, dan linier. Sekat antar tetrad dan inti pada sebagian mikrospora tidak tampak jelas dikarenakan tertutup granula. Dalam Ferrie *et al.*, (1995), granula dalam mikrospora dapat berupa mitokondria, plastida, golgi, ribosom, butir-butir amilum atau partikel polisakarida. Pada mikrospora *Dendrobium anita* adalah amilum (Wahyuni *et al.*, 2004)

Pada kultur mikrospora perlu dilakukan praperlakuan untuk menghasilkan dediferensiasi, yaitu memungkinkan agar sel-sel mikrospora mempunyai sifat meristematis kembali (Soeryowinoto, 1990). Praperlakuan suhu rendah diperlukan untuk meningkatkan embriogenesis. Pada berbagai kasus, durasi waktu dan temperatur optimal yang diperlukan berbeda-beda bergantung pada spesies tanaman (Ferrie *et al.*, 1995).

Perubahan mikrospora setelah mendapat praperlakuan suhu rendah tidak berbeda dengan ketika belum mendapat perlakuan suhu rendah. Mikrospora masih berupa mikrospora tetrad. Dinding sel dan granula masih bisa diamati dengan jelas. Pada

beberapa mikrospora, sekat antar tetrad dan inti tidak bisa diamati secara jelas karena tertutup granula dalam mikrospora.

Menurut Sangwan-Norrel *dalam* Ferrie *et al.*, (1995), perlakuan suhu rendah mempunyai pengaruh menunda mitosis haploid pertama, meningkatkan viabilitas mikrospora embriogenik dan meningkatkan permeabilitas dinding mikrospora, menunda perkembangan mikrospora, menginduksi pembelahan simetri dan memodifikasi dinding mikrospora dan menyebabkan kekacauan (disorganisasi) pada tapetum.

Perlakuan stres suhu diberikan pada mikrospora angrek pada suhu 35 °C dalam medium starvasi. Stres suhu tinggi meningkatkan produksi protein yang terlibat dalam proses induksi androgenesis (Cordewener *et al.*, 1996 *dalam* Hu and Kasha, 1999). Perubahan yang terjadi selama perlakuan stres suhu dan medium starvasi yaitu mikrospora membengkak dan sitoplasma mengalami reorganisasi struktural (Indrianto *et al.*, 2001). Ukuran mikrospora yang telah mengalami stres lebih besar daripada mikrospora segar. Untuk mencegah pecahnya dinding mikrospora, vakuola mengalami fragmentasi sehingga terbentuk vakuola yang kecil-kecil ini menyebabkan aliran sirkulasi, sehingga memungkinkan inti tetap ditengah (Windari, 2001).

Persentase mikrospora yang viabel

Mikrospora yang viabel selama perlakuan stres suhu dan medium starvasi berkaitan dengan perubahan proses metabolisme dalam sel. Aktivitas enzim yang berkaitan dengan metabolisme gula, respirasi, reduksi nitrat, asimilasi dan sintesis protein pada mikrospora yang dikultur dalam media starvasi (tanpa sumber gula dan nitrogen), akan turun (Yu, 1999). Penurunan aktivitas enzimatis ini dapat melindungi mikrospora dari stres sehingga tetap bertahan hidup, yaitu dengan cara mematikan pertumbuhan untuk penghematan energi. Pada saat yang sama, terjadi peningkatan aktivitas enzim yang terlibat dalam katabolisme asam lemak, asam amino dan protein (Ariyani, 2002). Manitol dalam media starvasi (media B) tidak berfungsi sebagai sumber gula, melainkan untuk menjaga keseimbangan tekanan osmotik antara sel mikrospora dengan lingkungannya (medium). Manitol merupakan *polyol* (polyhidroksi alkohol) yang ekuivalen terhadap glukosa, heksosa, fruktosa dan galaktosa (Wignarajah, 1995 *dalam* Ariyani, 2002).

Persentase mikrospora viabel selama perlakuan stres suhu dan medium starvasi berbeda-beda. Persentase mikrospora viabel tertinggi diperoleh pada P0H2 (46,98%) yaitu

pada hari ke-0 kontrol. Rendahnya angka persentase tersebut lebih disebabkan prosedur isolasi pada saat penggerusan yang terlalu keras, sehingga menyebabkan banyak mikrospora terplas-molisis sehingga mempengaruhi persentase mikrospora yang viabel. Pada hari kedua persentase mikrospora yang viabel menurun sampai dengan hari keenam. Hal tersebut dikarenakan mikrospora mengalami stres (starvasi gula dan nitrogen) yang menyebabkan defisiensi gula dan nitrogen, sehingga organela-organela sel banyak yang mengalami lisis akibat kandungan karbohidrat dan protein dipecah untuk memenuhi kebutuhan karbohidrat dan protein (Windari, 2001).

Pada kelompok kontrol, mikrospora mengalami perkembangan dengan adanya pertumbuhan tabung polen (berkecambah) pada hari keempat. Serbuk sari dikategorikan telah berkecambah apabila tabung polen yang terbentuk telah mencapai paling sedikit sama dengan panjang diameter polen (Widiastuti dan Palupi, 2008)

Pada kelompok perlakuan, sampai dengan hari keenam tidak dijumpai adanya mikrospora yang membentuk tabung polen.

Hoekstra dan Bruinsma (1975), menyatakan bahwa suhu 25-32°C merupakan temperatur optimum untuk perkecambahan polen. Dalam Darjanto dan Satifah (1982), suhu optimum yang diperlukan untuk pertumbuhan tabung serbuk sari (*pollen tube*) berkisar pada 25°C, sehingga mikrospora yang membentuk tabung polen lebih cepat pada kelompok kontrol daripada kelompok perlakuan.

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa (1) ada perubahan struktur dan perkembangan mikrospora angrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl selama perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi yaitu ukuran mikrospora yang membesar dan adanya pembelahan inti menjadi binukleat simetri; (2) tidak ada pengaruh perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi terhadap persentase mikrospora yang viabel; (3) lama waktu inkubasi kultur mikrospora pada perlakuan kombinasi stres suhu dan medium starvasi yang memberikan hasil perkembangan mikrospora binukleat simetri adalah 6 hari.

Untuk penelitian selanjutnya direkomendasikan untuk menggunakan stres suhu 35 °C dengan masa inkubasi selama 6 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyani, W. N. 2002. Induksi Embriogenesis Mikrospora Tembakau (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana SR1* dengan Kombinasi Praperlakuan Stres Panas dan Pelaparan Secara In vitro. *Skripsi*. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.
- Darjanto dan Satifah, S. 1990. *Pengetahuan Dasar Biologi Bunga dan Teknik Penyerbukan Silang Buatan*. Gramedia. Jakarta.
- Darmono, W. D. 2003. *Menghasilkan Anggrek Silangan*. Penebar Swadaya. Depok
- Ferrie, A. M. R., C. E. Palmer dan W. A. Keller, 1995. Haploid Embryogenesis. (Trevor A. T. ed), *In Vitro Embryogenesis In Plants*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht /Boston/London.
- Hause, B., G. Hause, P. Pechan, A. A. M. Van Lammeren. 1993. Cytoskeletal Change and Induction of Embryogenesis in Microspore and Pollen Culture of *Brassica napus* L., *Cell Biol Internat* 17 (2): 32-46
- Herdianti, R. D. 2005. Studi Teknik Kultur Anther dan Pollen Pada Tanaman Anggrek *Phalaenopsis* sp dan *Dendrobium* sp. *Skripsi*. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Hoekstra, F. A dan Bruinsma, J. 1975. Viability of Compositae Pollen : Germination in vitro and influences of Climatic Conditions during Dehiscence. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 76: 36-43
- Hu, T dan Ken J. Kasha. 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome* 42: 432-441.
- Indrianto, A., I. Barinova, A. Touraev, E. Heberle-Bors. 2001. Tracking individual wheat microspore in vitro : identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212 : 163-174.
- Jahne, A., dan Lorz., H. 1995. Cereal microspore culture. *Plant Science*. 109: 1-12.
- Moraes de P. A, Maria H. B-Z, Sidia. M. C-J, Eliane. K-S. 2004. Effect of temperature shock on Soybean Microspore Embryogenesis. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47 : 537-544.
- Santoso, U dan Nursandi, F. 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Suaib, W. M, Mirzawan, P.D.N., dan Ari I. 2007. Proporsi Mikrospora univulvata pada empat ikon tebu (*Saccharum* spp.) *Berkala Penelitian Hayati*. 12 (145-152).

- Suryo, H. 1995. *Sitogenetika*. UGM Press. Yogyakarta.
- Suryowinoto, M. 1990. *Pemuliaan Tanaman Secara In vitro*. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.
- Touraev, A dan E. Heberle-Bors. 1999. *Microspore Embryogenesis and In Vitro Pollen Maturation in Tobacco*. Vienna Biocentre, Institute of Microbiology and Genetics, Vienna University, Vienna, Austria.
- Wahyuni, K. D. dan Indrianto, A. 2001. Induksi Embriogenesis Mikrospora Angrek *Dendrobium anita* dengan Stres Suhu dan Medium Starvasi. *Skripsi*. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.
- Wahyuni, K. D. dan Junairiah, Edy S. W. U, H. Hery P. 2008. Induksi Embriogenesis Mikrospora Ang-grek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) BI Upaya Untuk Mendapatkan Galur Murni Dalam Satu Generasi. *Laporan Tahun Pertama Penelitian Hibah Bersaing*. FMIPA. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Widiastuti. A dan Palupi. R. E. 2008. Viabilitas Serbuk sari dan Pengaruhnya terhadap Keberhasilan Pembentukan Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *BIODIVERSITAS* 9 : 35-38.
- Windari, U. 2001. Induksi Embriogenik Mikrospora Padi (*Oriza sativa* L. "Rojolele") dengan Medium Starvasi pada Suhu 33°C. *Skripsi*. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada.
- Yeung, E. C., 1987. *Development of Pollen and Accessories Structures in Orchids*. In *Orchid Byologi: Reviews and perspective*. Vol. IV. (Arditti ed) Cornell University Press. Ithaca. Pp. 192-226.
- Yu, S-M. 1999. Update on Signal Transduction Cellular and Genetic Responses of Plants to Sugar Starvation. *Plant Physiology* 121 : 687-693.

20th**Abstract Submission**

Date: 30 Jun 2010

Thank you for your submission. Your Abstract tentative ID is 0213

Please use your email account and given password for login to view your submitted Abstract:

Login ID: kusumaanwar@yahoo.com**Password:** jq2qvprYou can update the Abstract at this link -

Mrs Dwi Kusuma Wahyuni
kusumaanwar@yahoo.comKejawen Putih Tambak BMA-41
Surabaya
East Java, 60115, ID**Abstract Submission**

Topic: 6. Cultivation and appreciation of orchids (amateur or commercial perspectives)

Presentation Preference: Oral

Title: MICROSPORE EMBRYOGENESIS INDUCTION OF PHALAENOPSIS AMABILIS, (L.), BL. ORCHID BY TEMPERATURE STRESS AND STARVATION MEDIUM**Presenting Author: DWI KUSUMA WAHYUNI****Author(s): DWI KUSUMA WAHYUNI, ARI INDRIANTO, EDY SETITI WIDA UTAMI, HERY PURNOBASUKI, AND JUNAIRIAH****Institution: Biology Department, Faculty Of Sciences And Technology, Airlangga University. C Campus Airlangga University, Mulyorejo Street Surabaya, Kusumaanwar @yahoo.com , Surabaya, ID**

MICROSPORE EMBRYOGENESIS INDUCTION OF *Phalaenopsis amabilis*, (L.), BL. ORCHID BY TEMPERATURE STRESS AND STARVATION MEDIUM Dwi Kusuma Wahyuni, Ari Indrianto, Edy Setiti Wida Utami, Hery Purnobasuki, and Junairiah Biology Department, Faculty of Sciences and Technology, Airlangga University. C Campus Airlangga University, Mulyorejo Street Surabaya, kusumaanwar @yahoo.com

ABSTRACT The aims of this research were to know effect of temperature stress and starvation medium for microspore embryogenesis induction of *P. amabilis*, (L.), Bl. orchid and to know microspore development during embryogenesis induction by temperature stress and starvation medium. For those purposes, microspore were grown in starvation medium (B medium) and incubation of microspore culture in 35°C, 4 days, darkness. Furthermore microspore was grown in AG medium, 25°C, darkness. Microspore development was observed every week. Microspore viability and microspore morphology with/without DAPI data were taken every week. The data were analyzed descriptively. The result of this research showed that microspore of *P. amabilis* (L.) Bl. orchid could be induction to microspore embryogenic by temperature stress and medium starvation. Microspore development became to embryogenic microspore were marked by the change of the microspore morphology structure: microspore volume was larger than before induction and the nucleus division of microspore was symmetric. **Keyword:** microspore embryogenesis, androgenesis, orchid, temperature stress, starvation medium

 Please print a copy for your reference. Thank you.