



LAPORAN PENELITIAN  
PROYEK DUE-LIKE BATCH III



**EMBRIOGENESIS SOMATIK**  
**ANGGREK BULAN *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL.**

Oleh:

Dra. Edy Setiti Wida Utami, MS  
Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, MS

010207141

PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
DESEMBER, 2006

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN PROYEK DUE-Like BATCH III**

- A. Judul : Embriogenesis Somatik Angrek Bulan  
*Phalaenopsis amabilis* (L) Bl
- B. Ketua Peneliti
- a. Nama : Dra. Edy Setiti Wida Utami, MS
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. Pangkat/Golongan/ Jabatan : Pembina Tingkat I/IV b/ Lektor Kepala
  - d. Bidang Keahlian : Kultur Jaringan Tumbuhan
  - e. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi
  - f. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- C. Tim Peneliti
- a. Nama : Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, MS
  - b. Bidang Keahlian : Kultur Jaringan Tumbuhan
  - c. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi
  - d. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- D. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :
- Jangka Waktu : 6 bulan
  - Biaya yang diajukan : Rp. 30.000.000,-(Tiga Puluh Juta Rupiah)
  - Biaya yang disetujui : Rp. 30.000.000,-(Tiga Puluh Juta Rupiah)

Mengetahui

Dekan MIPA Universitas Airlangga



Drs. Tjef Burhan, MS

NIP. 1318012709

Ketua peneliti

Dra. Edy Setiti Wida Utami, MS

NIP. 131406062

Menyetujui

Direktur Eksekutif LPHU Due-Like  
Universitas Airlangga

Tjitjik/Sye Tjahjandari, Ph.D

NIP. 131801627

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun laporan penelitian yang berjudul: Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L) Bl.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada program DUE-Like Batch III yang telah berkenan memberikan dana untuk membiayai penelitian ini, selain itu juga kepada berbagai pihak yang telah membantu penyelesaian penelitian ini.

Penulis berharap penelitian dapat berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan, terutama di bidang Biologi. Disamping itu penulis juga berharap kritik dan saran untuk perbaikan tulisan ini.



Surabaya, Desember 2006

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar .....	i
Daftar Isi .....	ii
Daftar Gambar .....	iv
Daftar Tabel .....	v
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
A. Latar Belakang Permasalahan .....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	3
D. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
A. Tinjauan umum tanaman anggrek bulan <i>P amabilis</i> (L) .....	5
1. Klasifikasi .....	6
2. Ekotipe .....	6
B. Embriogenesis somatik .....	6
C. Faktor-faktor yang mempengaruhi embriogenesis somatik .....	8
D. Protein pengontrol perkembangan embrio .....	10
E. Aplikasi embrio somatik .....	13
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>14</b>
A. Tempat dan waktu penelitian .....	14
B. Bahan penelitian .....	14
1. Bahan tanaman .....	14
2. Bahan kimia .....	14
C. Alat penelitian .....	14
D. Tahapan penelitian .....	14
1. Penelitian tahap I .....	14
a. Penyerbukan .....	14



b. Induksi kalus .....	15
(1). Induksi kalus dari segmen internodus ibu tangkai bunga .....	16
(2). Induksi kalus dari eksplan embrio zigotik .....	16
2. Penelitian tahap II .....	16
a. Ekstraksi protein .....	16
b. Penentuan BM Protein .....	17
c. Profil protein .....	17
3. Penelitian Tahap III .....	17
a. Perkembangan embrio somatik .....	17
b. Analisis data .....	18
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	19
BAB V . KESIMPULAN DAN SARAN .....	26
A. Kesimpulan .....	26
B. Saran .....	26
DAFTAR PUSTAKA .....	27

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Habitus <i>Phalaenopsis amabilis</i>	5
Gambar 2. Skema berbagai gen yang terlibat selama embriogenesis somatik pada tumbuhan tingkat tinggi (Archana, 2002)	12
Gambar 3. Cara penyerbukan (polinasi) pada tanaman anggrek.	15
Gambar 4. Segmen internodus ibu tangkai bunga	20
Gambar 5. Perkembangan embrio somatik <i>P amabilis</i> (L) B1	22
Gambar 6. Struktur embrio somatik <i>P amabilis</i> (L) B1	23
Gambar 7. Profil protein eksplan <i>P amabilis</i> (L) B1	24





## BAB I PENDAHULUAN



### A. Latar Belakang Permasalahan

Tanaman anggrek secara alami tumbuh menempel di pohon-pohon di dalam hutan hujan tropis sebagai tanaman *epifit*, ada yang *terestrik* tumbuh di tanah, ada yang di bebatuan (*litofit*), ada yang tumbuh di sampah (*saprofit*) (Arditi, 1992; Sweet, 1980; Banks, 1999). Sebagai salah satu Negara tropis, Indonesia adalah Negara yang kaya anggrek alam yaitu memiliki sekitar 5000 jenis anggrek alam atau sekitar 16% dari jenis anggrek alam di seluruh dunia (Banks, 1999). Salah satu diantara anggrek alam yang sangat berpotensi adalah *Phalaenopsis amabilis* (L) Bl. *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 bulan ini untuk mendapatkan anggrek hibrida berwarna putih yang banyak diperlukan untuk memperoleh perpaduan harmonis dengan warna bunga lain dalam suatu rangkaian bunga. Di Indonesia terdapat 6 ekotipe *Phalaenopsis amabilis* (L) Bl yang *endemic* di P. Jawa, Sumatra, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, dan Papua (Sweet, 1980; Cullen, 1992), namun anggrek-anggrek alam itu kini menjadi semakin sulit dijumpai di habitat aslinya, hal ini disebabkan adanya eksploitasi secara besar-besaran di hutan menyebabkan destruksi pada habitatnya dan populasi *Phalaenopsis amabilis* (L) Bl menjadi sangat sedikit, bahkan terancam punah. Dari daftar tumbuhan langka, *Phalaenopsis amabilis* (L) Bl tercatat menempati urutan ke 160 dari 240 tumbuhan langka di Indonesia (Johanis *et al*, 2001). Untuk mengatasi hal tersebut diperlukan usaha konservasi yang harus ditopang dengan kemampuan penyediaan bibit dan membudidayakan tanaman anggrek baik secara *in situ* maupun *ex situ*, sekaligus pemuliaan tanaman dengan mempertahankan sifat aslinya (Iswanto, 2001).

Pengembangan anggrek *Phalaenopsis* dapat dilakukan secara generatif dengan memperbanyak tanaman yang berasal dari biji. Meskipun anggrek menghasilkan biji dalam jumlah banyak (2-3 juta biji/buah), namun karena biji anggrek tidak mempunyai endosperm

fungsional, maka hanya 0,2-0,3% biji yang mampu berkecambah di alam, selain itu *seedling* yang dihasilkan dari perkecambahan biji mempunyai variasi genetik yang luas (Chopra *et al*, 1996) sehingga penyediaan bibit menjadi terbatas dan bervariasi. Perbanyakkan anggrek secara vegetatif dapat dilakukan melalui 3 cara yaitu dengan pemotongan batang (stek), pemotongan tunas (*keiki*) dan dengan pemisahan rumpun (Setiawati, 1991), namun perbanyakkan secara vegetatif tersebut dirasa berlangsung lama, menghabiskan banyak waktu dan sulit memperoleh tanaman yang cukup (Chopra *et al*, 1996).

Katuuk (1989) menyatakan bahwa kemampuan tumbuhan untuk menghasilkan embrio tidak hanya terbatas dari perkembangan zigot, tetapi dapat melalui teknik *in vitro*. Secara *in vitro* dimungkinkan terjadinya embrio somatik yang mempunyai struktur sama dengan embrio zigotik yang berasal dari biji, yaitu mempunyai primordia tunas dan primordia akar, dan bila diregenerasikan langsung dapat membentuk planlet (Bajaj, 1995a; Denchev & Attanasov, 1995; Arnold *et al*, 1995). Dunstan *et al*, (1995) menyatakan bahwa pembentukan embrio somatik melalui embriogenesis somatik merupakan pilihan perbanyakkan vegetatif secara *in vitro* yang tepat, efisien, dan lebih praktis, karena embrio somatik bersifat bipolar yaitu mempunyai primordia akar dan primordia tunas yang tumbuh secara bersamaan, ukuran planlet lebih seragam, dan sangat potensial untuk diproduksi dalam skala industri. Aplikasi embrio somatik disamping untuk mikropropagasi dan untuk pelestarian plasma nutfah, juga dapat digunakan untuk mendukung program pemuliaan tanaman. Melalui DNA rekombinan, penggunaan struktur embrio somatik lebih disukai karena tanaman dapat berasal dari 1 sel, sehingga akan memberikan hasil yang tinggi dengan mengurangi terjadinya *chimera* (Bajaj, 1995a & Ellis, 1995). Untuk penyimpanan benih dalam jangka panjang maupun jangka pendek, embrio somatik dianggap sebagai bahan yang ideal untuk disimpan mengingat strukturnya yang bipolar, sehingga selalu siap diregenerasi langsung membentuk benih somatik (Mc Kersie *et al*, 1995; Bajaj, 1995a; Bajaj, 1995b). Embrio somatik juga merupakan materi yang ideal untuk mempelajari pengaturan perkembangan embrio (Bajaj, 1995a). Dewasa ini embrio somatik mendapatkan perhatian yang besar di bidang bioteknologi tanaman, yaitu untuk regenerasi tanaman transgenik dan produksi biji sintetik atau *artificial seed* (Attre & Fowke, 1993; Mc Kersie *et al*, 1995; Bajaj, 1995a; Gray *et al*, 1995; Denchev & Attanasov, 1995; Mamiya & Sakamoto, 2001; Nieves *et al*, 2001; Brischia *et al*, 2002; Sicurani *et al*, 2001).



Untuk tujuan mikropropagasi melalui embriogenesis somatik sekaligus untuk pemuliaan tanaman anggrek perlu dilakukan penelitian awal tentang mekanisme pembentukan dan perkembangan embrio somatik yang akan memberikan informasi dasar penting di dalam menunjang penentuan langkah-langkah lebih lanjut di dalam usaha konservasi.

Diharapkan embrio somatik yang dihasilkan dari penelitian ini mampu berkecambah menjadi planlet sehingga dapat digunakan sebagai sumber bibit yang akan membantu dalam usaha konservasi *Phalaenopsis amabilis* (L) Bl khususnya dan *Phalaenopsis* pada umumnya.

Embriogenesis somatik telah dilaporkan pada beberapa species tanaman, namun penelitian mengenai embriogenesis somatik anggrek alam *Phalaenopsis amabilis* (L) Bl belum pernah dilaporkan.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan hal-hal yang telah diuraikan tersebut dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut.

- 1). Eksplan apakah yang terbaik sebagai bahan untuk induksi kalus *P amabilis* (L) Bl?
- 2). Zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi berapa yang sesuai untuk induksi kalus embriogenik *P amabilis* (L) Bl?
- 3). Bagaimana struktur dan pola perkembangan embrio somatik *P amabilis* (L) Bl?
- 4). Bagaimana profil protein pada fase awal perkembangan eksplan *P amabilis* (L) Bl?

## **C. Tujuan Penelitian**

- 1). Memperoleh bagian tanaman (*eksplan*) terbaik sebagai bahan untuk induksi kalus *P amabilis* (L) Bl
- 2). Mengetahui konsentrasi zat pengatur tumbuh yang sesuai untuk induksi kalus embriogenik *P amabilis* (L) Bl
- 3). Mengetahui struktur dan pola perkembangan embrio somatik *P amabilis* (L) Bl
- 4). Mengetahui profil protein pada fase awal perkembangan eksplan *P amabilis* (L) Bl

#### **D. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat :

- 1) Memberikan alternatif perbanyakan vegetatif *in vitro* melalui tahapan-tahapan perkembangan embrio somatik, sehingga dapat mendukung usaha konservasi sumber daya alam terutama anggrek alam *Phalaenopsis amabilis* (L) BL
- 2) Menambah informasi molekuler dan diketahui mekanisme pembentukan serta perkembangan embrio somatik anggrek alam *Phalaenopsis amabilis* (L) BL sebagai dasar bioteknologi anggrek
- 3) Menunjang payung penelitian di Bagian Kultur Jaringan Tumbuhan, Laboratorium Biologi Reproduksi yang berorientasi pada mikropropagasi tanaman di Jurusan Biologi FMIPA Unair



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tinjauan Umum Tanaman Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L) Bl

*Phalaenopsis amabilis* merupakan anggrek epifit yang berdasarkan bentuk dan pertumbuhannya termasuk dalam anggrek monopodial (Suryowinoto, 1982; Morel, 1974). Anggrek bulan mempunyai ciri-ciri morfologi sebagai berikut : batang sangat pendek; daun berbentuk jorong, tersusun rapat, berdaging, panjang 20-30 cm, lebar 7-12 cm; bunga tersusun dalam rangkaian berbentuk tandan, seringkali bercabang yang keluar dari pangkal batangnya, panjangnya dapat mencapai 1 m, jumlah bunga dalam tiap tandan bisa sampai 25 kuntum, setiap bunga bergaris tengah 6-12 cm; daun kelopak berbentuk bundar melebar, pangkalnya kecil dan ujungnya tumpul, warna daun kelopak dan daun mahkota putih; labelum bertaju 3, taju tengahnya berbentuk segitiga, ujungnya bersulur 2, berwarna kuning pucat sampai tua dengan garis-garis kemerahan di sebelah dalam; buah lentera berbentuk jorong, panjang sekitar 10 cm, gynostemium putih dengan polinium berwarna kuning (Anonimus,1976; Suryowinoto, 1982).



Gambar 1. Habitus *Phalaenopsis amabilis*

### A.1. *Klasifikasi*

Klasifikasi anggrek bulan menurut Jones *et al.*, 1986 dan Dressler, 1993 adalah sebagai berikut.

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Monocotyledoneae
Subclassis	: Lillidae
Ordo	: Orchidales
Subordo	: Orchidineae
Familia	: Orchidaceae
Subfamilia	: Epidendroideae
Tribus	: Vandaeae
Subtribus	: Aeredinae
Genus	: <i>Phalaenopsis</i>
Species	: <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl.

### A.2. *Ekotipe*

Tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* memiliki habitat alami berupa tempat-tempat teduh dan lembab di hutan-hutan. Umumnya tumbuh pada ketinggian 50-600 m dpl. Bunga tahan mekar sampai 1 bulan. Berdasarkan lokasi terdapatnya, anggrek species ini mempunyai beberapa ekotipe diantaranya ekotipe Jawa, Kalimantan, Maluku, Sulawesi (Anonimus, 1976).

*Phalaenopsis amabilis* mempunyai keistimewaan yaitu habitus kuat, mudah dirawat, dan memiliki bunga yang indah serta awet, oleh karena itu bunga tanaman anggrek bulan sering digunakan oleh pengembang anggrek untuk menghasilkan anggrek hibrida yang bermutu (Anonimus, 1976).

## B. *Embriogenesis somatik*

Embriogenesis meliputi perubahan bentuk pada fase-fase tertentu, dan perubahan progresif dari keadaan tidak terdiferensiasi menjadi terdiferensiasi. Embriogenesis somatik

adalah proses diferensiasi sel somatik menjadi embrio somatik. Keberhasilan sel soma membentuk embrio somatik tergantung pada kemampuan sel tersebut berdediferensiasi dan rediferensiasi kembali menjadi sel embriogenik. Selanjutnya sel embriogenik mengalami pembelahan menjadi 2 sel, 4 sel, 8 sel dan seterusnya dan selanjutnya berkembang melalui tahapan-tahapan tertentu menjadi embrio matang/fungsional. Menurut Arnold *et al.*, (2002) perkembangan embrio tumbuhan melalui pola perkembangan tertentu, misalnya pada Angiospermae (*Arabidopsis*) setelah zigot membelah menjadi 2 sel, 4 sel, 8 sel dan seterusnya. Selanjutnya berkembang melalui tahap bentuk globular, triangular, hati, torpedo dan kotiledon.

Secara morfologis embrio somatik hampir sama dengan embrio zigotik yaitu bipolar dan mempunyai organ embrionik radikula, hipokotil dan kotiledon, walaupun berkembang melalui prosedur yang berbeda (Bajaj, 1995a; Arnold *et al.*, 2002). Pada tumbuhan yang tidak mempunyai embrio zigotik maka embrio somatik dapat berfungsi sebagai embrio zigotik dalam hal menghasilkan tumbuhan baru (Raghavan, 1976). Embrio somatik dari kultur sel, jaringan, dan organ dapat terjadi secara langsung dan tidak langsung. Embrio somatik yang terbentuk secara langsung meliputi pembentukan embrio aseksual dari sel tunggal atau kelompok sel yang menyusun jaringan eksplan tanpa melalui fase kalus. Arnold *et al.*, (2002) dan Raghavan, (1997) menyatakan bahwa embriogenesis somatik tidak langsung, melalui tahap-tahap yaitu : (1) induksi kalus embriogenik melalui pengkulturan eksplan dalam media yang ditambah zat pengatur tumbuh, terutama auksin tetapi sering juga sitokinin; (2) proliferasi kalus embriogenik dalam medium padat atau cair yang ditambah zat pengatur tumbuh seperti pada tahap induksi; (3) prematurasi embrio somatik dalam medium dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh (auksin) dikurangi atau tanpa auksin yang akan menstimuli pembentukan embrio somatik; (4) maturasi embrio somatik melalui pengkulturan dalam medium dengan pengurangan potensial osmotik. Induksi kalus embriogenik yang merupakan tahap awal embriogenesis somatik ternyata setiap spesies membutuhkan media, macam eksplan dan jenis serta konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda seperti yang tercantum pada Tabel 1 sebagai berikut.



**Tabel 1.** Macam eksplan, media, dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang digunakan untuk induksi kalus embriogenik pada berbagai tanaman

Peneliti, tahun	Tanaman	Sumber eksplan	Media & ZPT untuk induksi kalus embriogenik
Tokuhara & Mii., 2001	<b>Hibrid</b> <i>Phalaenopsis</i> (Baby Hat x Ann Jessica) (PM 292)	Tunas ujung malai bunga	New Dogashima (ND) + 0,5 mg/L NAA + 1 mg/L BA
Tokuhara & Mii., 2003	<b>Hibrid</b> <i>Phalaenopsis</i> Snow Parade (SP 1776); Ph. Wedding Promenade (WP 1572)	Tunas ujung malai bunga	ND + 0,5 mg/L NAA + 1 mg/L BA
Ishii <i>et al.</i> , 1998	<b>Hibrid</b> <i>Phalaenopsis</i> Richard Shaffer "Santa Cruz"	Segmen <i>Protocorm-like body</i> (PLB)	Vacin & Went (VW) + 200 ml/L air kelapa
Shinoyama <i>et al.</i> , 2004	<i>Chrysanthemum</i>	Segmen daun	Murashige & Skoog (MS) + 2 mg/L 2,4D + 1 mg/L kinetin
Vargas <i>et al.</i> , 2005	<i>Solanum tuberosum</i>	Internodus	MS + 0,5 mg/L 2,4D
Sripaoraya <i>et al.</i> , 2003	<i>Ananas comosus</i>	Segmen daun	MS + 3 mg/L 4-amino-3,5,6-trichloropicoline acid ( <i>picloram</i> )
Igasaki <i>et al.</i> , 2003	<i>Cryptomeria japonica</i>	Segmen embrio zigotik	LEMM+ 32 $\mu$ M <i>phytosulfokine</i> (PSK)
Chithra <i>et al.</i> , 2005	<i>Rotula aquatica</i>	Internodus, segmen daun	MS + 2,69 $\mu$ M NAA + 4,44 $\mu$ M BA

### C. Faktor- faktor yang mempengaruhi embriogenesis somatik

Sel-sel soma tumbuhan mengandung semua informasi genetik yang diperlukan untuk menghasilkan tumbuhan lengkap dan fungsional (Arnold *et al.*, 2002). Untuk inisiasi kalus embriogenik dibutuhkan program ekspresi gen embriogenik. Arus ekspresi gen tersebut dikendalikan oleh auksin. Selain auksin, stress juga berperan dalam mengaktifasi pemrograman kembali ekspresi gen tersebut (Lo *et al.*, 1989 dalam Arnold *et al.*, 2002).

Dudits *et al.*, (1995, dalam Arnold *et al.*, 2002) juga menjelaskan bahwa faktor eksternal berupa pemberian zat pengatur tumbuh secara eksogen seperti auksin berperan penting dalam reaktivasi siklus sel dan inisiasi pembentukan embrio somatik. Auksin mampu mengaktivasi sinyal transduksi sehingga sel dapat mengadakan pemrograman kembali ekspresi gen dan menginduksi pembelahan sel yang menyebabkan pertumbuhan kalus embriogenik tidak terkontrol atau terbentuknya polarisasi ke embriogenesis. Dua mekanisme penting yang muncul untuk formasi sel embriogenik *in vitro* adalah pembelahan sel asimetris dan kontrol elongasi sel. Pembelahan sel asimetris dikendalikan oleh zat pengatur tumbuh, dimana polaritas sel berubah oleh adanya gangguan gradien pH (De Jong *et al.*, 1993; Emons, 1994; Smith & Krikorium, 1990 dalam Arnold *et al.*, 2002).

Menurut Raghavan (1997) auksin merupakan faktor penting untuk induksi regulasi dan perkembangan embriogenesis. Penambahan auksin eksogen akan menginduksi sintesis protein embrionik yang merupakan awal embriogenesis somatik dan proliferasi sel embriogenik. Vasseur, (1993) dan Chen & Luthe, (1987) dalam Raghavan, 1997 menyatakan bahwa protein embrionik (E1 dan E2) dengan BM 40-44 kDa telah digunakan sebagai protein penanda awal terjadinya embriogenesis yang dipicu oleh auksin. Protein spesifik ini banyak dijumpai pada kalus embriogenik dari pada non embriogenik. Sintesis protein ini pertama kali terjadi kurang dari 2 hari setelah eksplan dikultur dan selama 5 hari periode induksi, sel telah mendapatkan kompetensi embrioniknya namun auksin juga merupakan penghambat untuk sintesis protein berikutnya yang dibutuhkan untuk perkembangan embrio selanjutnya. Jika zat tersebut ditambahkan setelah perkembangan awal maka perkembangan embrio akan terhenti dan jika auksin ditambahkan setelah tahap jantung akan mengubah bentuk embrio. Pada kedua kasus tersebut, sel-sel akan mulai berproliferasi dengan cara yang tidak terorganisir.

Menurut Arnold *et al.*, (2002) salah satu sel-sel embriogenik yang telah terbentuk berproliferasi membentuk *proembryonic masses* (PEMs). Auksin adalah wajib untuk induksi proliferasi PEMs, tetapi merupakan inhibitor untuk perkembangan PEMs ke tahap embrio somatik berikutnya. Selain auksin, induksi proliferasi PEMs juga dipengaruhi oleh derajat keasaman (pH). Derajat keasaman rendah sangat penting untuk pemeliharaan kultur fase proliferasi (De Vries *et al.*, 1988 dan Nomura & Komamine, 1995 serta Filonova *et al.*, 2000 dalam Arnold *et al.*, 2002). Ketika tahap preglobular PEMs pada kultur *Daucus carota*

di subkultur ke dalam media bebas hormon pada pH 5,8 embrioid berkembang menjadi bentuk globular, hati, torpedo dan tahap embrio kotiledon (Smith & Krikorian, 1990 dalam Arnold *et al.*, 2002).

Selama perkembangan embriogenik terjadi sintesis *deoxyribonucleic acid* (DNA), *ribonucleic acid* (RNA) dan protein. Peningkatan sintesis RNA dan protein terjadi 2 - 4 jam setelah sel ditransfer ke medium tanpa auksin. Puncak sintesis RNA dari sel embriogenik pada saat 96 jam bersamaan dengan pembentukan embrio somatik pertama (Fujimura *et al.*, 1980 dan Sengupta & Raghavan, 1980 dalam Raghavan, 1997).

Menurut Canhoto *et al.*, (1996) pada umumnya embrio somatik yang telah mencapai stadium globuler kemudian dilakukan subkultur pada medium baru tanpa auksin eksogen atau konsentrasi auksin diturunkan untuk menghantarkan embrio somatik globuler menuju stadium embrio somatik berikutnya. Hal ini merupakan *trigger* untuk ekspresi gen yang menentukan diferensiasi dan perkembangan embrio somatik selanjutnya.

Menurut Komura dan Komamine (1995) polaritas auksin endogen dalam kelompok sel embriogenik esensial pada embriogenesis somatik. Apabila auksin ditambahkan dalam medium dapat meniadakan polaritas auksin endogen, karena gradien auksin endogen terganggu dengan adanya difusi auksin eksogen ke dalam sel-sel embrio somatik sehingga menghambat perkembangan embrio somatik.

#### **D. Protein pengontrol perkembangan embrio**

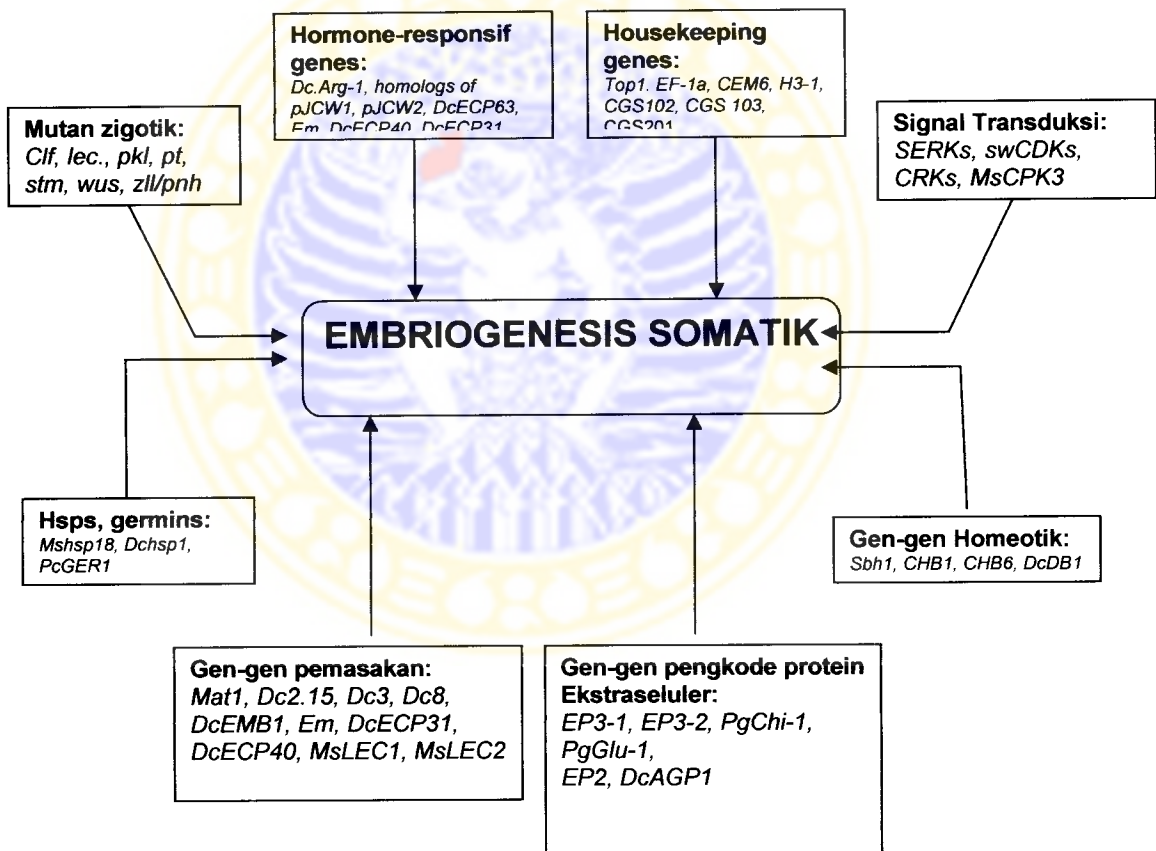
Setiap tahap dan stadium perkembangan tumbuhan dikontrol dan dikendalikan secara genetik (Lyndon, 1990; Fosket, 1994). Selama terjadinya perkembangan, gen-gen terekspresi pada tempat dan waktu tertentu, sehingga tumbuhan dapat melangsungkan siklus hidupnya. Bentuk ekspresi gen adalah protein (baik protein fungsional maupun struktural), yang dibentuk melalui proses transkripsi dan translasi (Fosket, 1994). Protein hasil ekspresi gen tersebut menentukan karakter tumbuhan pada tahap perkembangannya.

Beberapa gen dan protein yang bertanggung jawab pada tahap tertentu dari perkembangan tumbuhan telah berhasil diidentifikasi. Gen SAUR ( Small Auxin-Up RNA) yang mengkode protein 9 - 10 kDa bertanggung jawab pada pembelahan dan pemanjangan sel pada organ yang sedang tumbuh (Gee *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1994; McClure & Guilfoyle, 1991 dalam Li *et al.*, 1994 ). Gen SAUR tersebut berperan sebagai

pembentukan hipokotil atau akar dan diekspresikan pada embrio tahap globular dan torpedo;

3. *gen-gen spesifik embrio somatik*, 2 gen yaitu CHB2 dan CEM6 yang diekspresikan spesifik hanya pada embrio globular-torpedo. Fungsi gen-gen tersebut masih dalam penelitian. Hibridisasi *in situ* nampak bahwa transkrip CEM6 terletak pada bagian sel perifer pada embrio bentuk globular hingga torpedo.

Stephen (1998) melaporkan bahwa embrio tumbuhan secara morfologis sederhana, tetapi secara molekuler sangat kompleks. Jurgens (1991) dalam Stephen (1998) mengestimasi diperlukan sekitar 400 gen untuk embriogenesis yang normal. Archana (2002) melaporkan bahwa berbagai gen yang terlibat selama embriogenesis somatik telah teridentifikasi seperti yang ditampilkan pada Gambar 2 berikut.



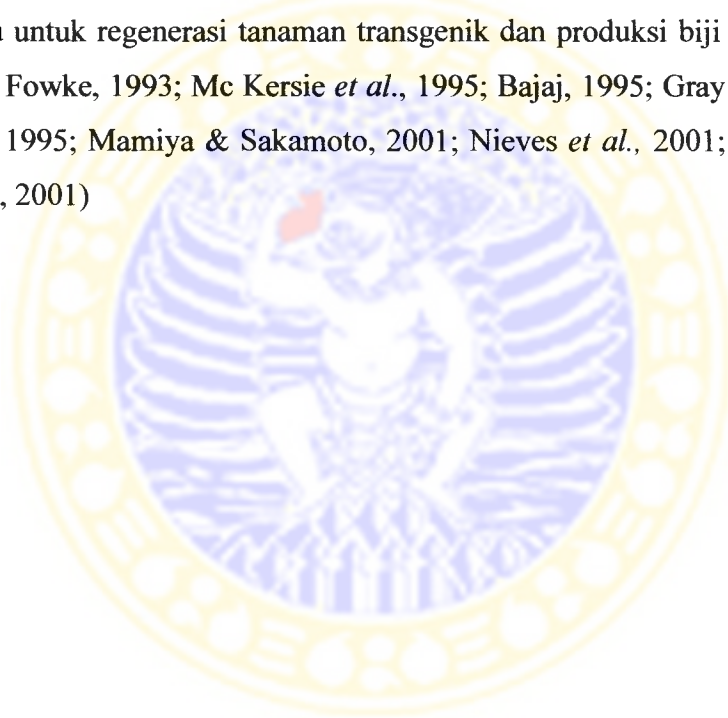
Gambar 2. Skema berbagai gen yang terlibat selama embriogenesis somatik pada tumbuhan tingkat tinggi (Archana, 2002)





### E. Aplikasi embrio somatik

Aplikasi embrio somatik disamping untuk mikropropagasi juga untuk mendukung program pemuliaan tanaman. Penggunaan embrio somatik untuk penelitian DNA rekombinan lebih disukai karena tanaman dapat berasal dari 1 sel sehingga akan memberikan hasil yang tinggi dengan mengurangi terjadinya *chimera* (Bajaj, 1995a; Ellis, 1995). Untuk penyimpanan benih dalam jangka panjang maupun jangka pendek, dan untuk pelestarian plasma nutfah, embrio somatik dianggap sebagai bahan yang ideal untuk disimpan mengingat strukturnya yang bipolar, sehingga selalu siap diregenerasi langsung membentuk benih somatik (Mc Kersie *et al.*, 1995; Bajaj, 1995a; 1995b). Embrio somatik juga merupakan materi yang ideal untuk mempelajari pengaturan perkembangan embrio (Bajaj, 1995a). Saat ini embrio somatik mendapatkan perhatian yang besar di bidang bioteknologi tanaman yaitu untuk regenerasi tanaman transgenik dan produksi biji sintetik atau *artificial seed* (Attre & Fowke, 1993; Mc Kersie *et al.*, 1995; Bajaj, 1995; Gray *et al.*, 1995; Denchev & Attanasov, 1995; Mamiya & Sakamoto, 2001; Nieves *et al.*, 2001; Brischia *et al.*, 2002; Sicurani *et al.*, 2001)





## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Reproduksi, Bagian Kultur Jaringan Tumbuhan, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Airlangga. Untuk analisis protein dilakukan di Laboratorium Biokimia, Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada.

#### **B. 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 segmen internodus ibu tangkai bunga dan embrio zigotik usia 2 bulan, 3 bulan, dan 4 bulan setelah penyerbukan.

##### **2. Bahan Kimia**

Bahan kimia penyusun media New Dogashima (ND), zat pengatur tumbuh  $\alpha$ -*naphthalenacetic acid* (NAA), 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethyl-allylamino) purine (2iP), alkohol, bahan kimia untuk analisis protein.

#### **C. Alat Penelitian**

*Laminar Air Flow*, *autoclave*, pinset, skalpel, alat-alat gelas, *shaker*, mikroskop stereo yang dilengkapi dengan kamera, obyek mikrometer, okuler mikrometer, *mortar*, *pestle*, *freeze dryer*, *sentrifuge*, *eppendorf*.

#### **D. Tahapan Penelitian**

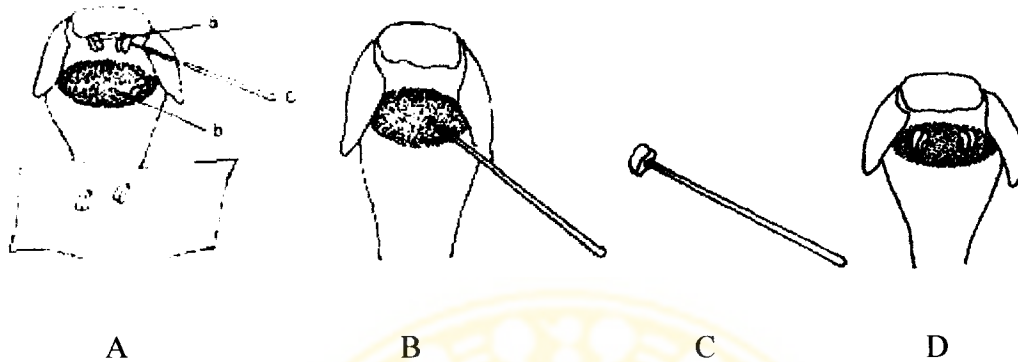
##### **1. Penelitian tahap I meliputi :**

###### **a. Penyerbukan**

Penyerbukan dilakukan dengan cara sebagai berikut.

- (1). Kertas diletakkan di bawah bunga. Dengan memakai tusuk gigi polinia diambil dan ditaruh di atas kertas (Gambar 3A).

- (2). Ujung tusuk gigi dibasahi dengan cairan lengket yang ada dalam stigma dengan cara memasukkan ujung tusuk gigi ke dalam stigma (Gambar 4B).
- (3). Polinia diambil memakai tusuk gigi yang sudah kena lendir (Gambar 4C).
- (4). Polinia diletakkan di bagian kanan kiri lubang stigma (Gambar 4D).



Gambar 3. Cara penyerbukan (polinasi) pada tanaman anggrek.  
Keterangan: a: polinia; b: stigma; c: tusuk gigi

**b. Induksi kalus**

Untuk induksi kalus digunakan 2 macam eksplan yaitu segmen internodus ibu tangkai bunga dan embrio zigotik umur 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan setelah penyerbukan. Optimasi zat pengatur tumbuh untuk induksi kalus dipakai kombinasi perlakuan dari 2 ZPT yaitu I= 6-(y,y-dimethyl-allyamino) purine (2iP); N= *α-naphthalenacetic acid* (NAA)

Tabel 2. Sumber eksplan dan kombinasi ZPT yang digunakan untuk induksi kalus *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (mg/L)	Sumber eksplan			Segmen internodus
	Umur embrio (bulan)			
	2	3	4	
I0 N0				
I2N1				
I3N1				
I4N1				
I5N1				

Keterangan: I= 6-(y,y-dimethyl-allyamino) purine (2iP); N= *α-naphthalenacetic acid* (NAA)

### ***b.1. Induksi kalus dari eksplan segmen internodus ibu tangkai bunga***

Ibu tangkai bunga dipotong-potong 3 cm dan direndam dalam larutan detergent (sunlight) untuk menghilangkan debu selama 5 menit selanjutnya dibilas dengan aquades steril 3 kali. Ibu tangkai bunga dimasukkan dalam *laminar air flow*, internodus ibu tangkai bunga dipotong-potong dengan panjang 1 cm, direndam dalam larutan chlorox 20 % selama 5 menit, selanjutnya potongan eksplan dicuci 3 kali dengan akuades steril. Eksplan ditanam pada media padat ND ditambah 10 gr /L sukrose, dan kombinasi ZPT seperti yang tertera pada tabel 2. Setiap botol kultur diisi 4 eksplan. Kultur dipelihara dalam ruang inkubasi dengan suhu  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$  di bawah lampu neon dengan intensitas cahaya 3100 lux. Pengamatan terhadap inisiasi kalus dilakukan secara visual terhadap eksplan setelah dikultur selama 2 minggu. Kultur dipindah ke medium yang sama dengan interval satu bulan sekali selama dua bulan.

### ***b.2. Induksi kalus dari eksplan embrio zigotik***

Buah anggrek umur 2 bulan, 3 bulan, 4 bulan setelah penyerbukan dipetik dan dicuci memakai akuades steril, kemudian dicelupkan ke dalam alkohol 70%. Buah anggrek dimasukkan dalam *laminar air flow*, dicelupkan dalam alkohol 70% dan dilewatkan di atas api Bunsen. Ujung dan pangkal buah dipotong dengan skalpel, buah dibelah memanjang mengikuti bagian perlekatan. Biji diambil menggunakan pinset steril lalu ditanam pada media padat ND ditambah 10 gr/L sukrose dan kombinasi ZPT seperti yang tertera pada Tabel 2. Kultur dipelihara dalam ruang inkubasi dengan suhu  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$  dengan intensitas cahaya 3100 lux. Pengamatan terhadap inisiasi kalus dilakukan secara visual terhadap eksplan setelah dikultur selama 2 minggu. Kultur dipindah ke medium yang sama dengan interval satu bulan sekali selama dua bulan.

## **2. Penelitian tahap II meliputi:**

### **a. Ekstraksi protein**

Ekstraksi protein dilakukan dengan cara sebagai berikut : menimbang 1 gr eksplan digerus dengan menggunakan *mortar* dan *pestle* sampai halus, hasilnya dimasukkan ke dalam *eppendorf* dan diberi larutan buffer ekstraksi , campuran disentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan diambil dan disimpan dalam almari pendingin pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **b. Penentuan BM protein (SDS-PAGE)**

Penentuan berat molekul (BM) protein dilakukan dengan elektroforesis *sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan cara sebagai berikut: diambil 35 µg sample protein dicampur dengan 2 µl sample buffer. Untuk marker, diambil 10 µl marker protein (*Wide Range*) dicampur dengan 2 µl sample buffer. Semua larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Elektroforesis pada 100 volt selama 1,5 jam. Pita protein dengan BM lebih besar akan terbentuk lebih dekat dengan tempat awal pemisahan. Pewarnaan (staining) pita protein dilakukan dengan cara merendam gel hasil elektroforesis (setelah dilepas dari rangkaian plat) dalam larutan *Coomasie brilliant blue* semalam. Selanjutnya dilakukan *destaining* untuk menghilangkan kelebihan warna dengan cara merendam gel dalam larutan *destaining* hingga gel nampak transparan dengan pita protein terpisah jelas satu sama lainnya. Gel kemudian dimasukkan dalam asam asetat glasial dan dikeringkan. Pita-pita protein yang terbentuk dalam gel selanjutnya ditentukan BM nya.

### **c. Profil protein**

Untuk mendeteksi protein yang terekspresi selama fase awal perkembangan eksplan *P amabilis* dilakukan dengan cara membandingkan profil protein pada eksplan yang dikultur dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2iP 2 mg/L dan NAA 1 mg/L dengan yang dikultur tanpa penambahan 2iP dan NAA. Penentuan profil protein dilakukan dengan metode *sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) menurut Chrambach & Rodbard (1985) dan Hu (1996). Analisis protein dilakukan pada kultur berumur 2, 3, 4, 5 hari setelah eksplan ditanam dalam media (Vasseur, 1993 dan Chen & Luthe, 1987 dalam Raghavan, 1997).

## **3. Penelitian tahap III meliputi :**

### **a. Perkembangan embrio somatik atau PLBs (protocorm like bodies)**

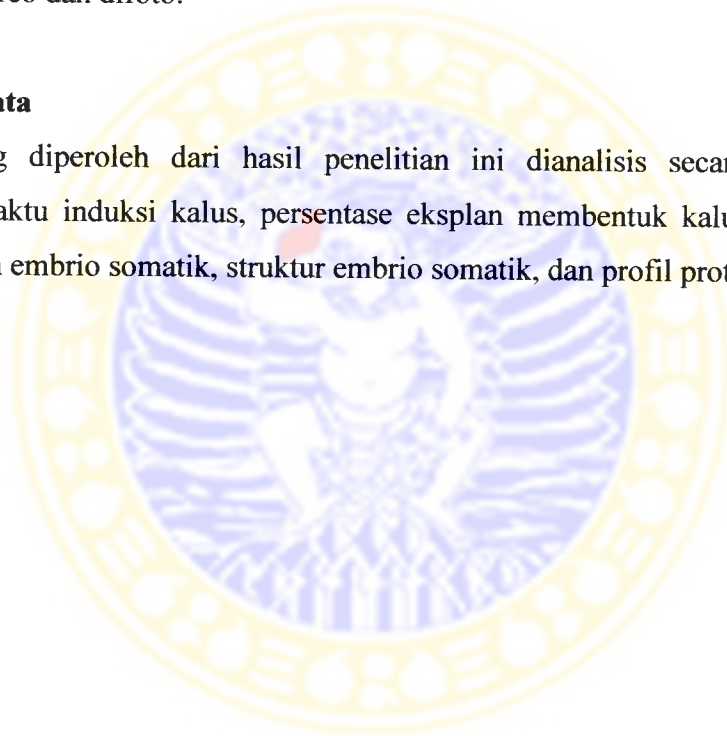
Pengamatan terhadap perkembangan embrio somatik dimulai dari embrio somatik stadium globular sampai embrio somatik stadium skutelar. Pengamatan terhadap embrio skutelar didasarkan atas pernyataan Schiavone dan Racusen (1990) bahwa stadium skutelar merupakan bagian yang essensial untuk regenerasi dan sebagai pemelihara polaritas embrio

somatik. Diamati pula penampang membujur embrio somatik stadium skutelar untuk mengetahui apakah meristem pucuk sudah terbentuk. Hal ini perlu diamati karena meristem pucuk merupakan salah satu bagian yang sangat penting dalam embriogenesis somatik. Hal ini disebabkan karena kualitas dan kemampuan berkecambah embrio somatik ditentukan oleh perkembangan dan fungsi meristem pucuk yang normal, yang selanjutnya berkembang menjadi tunas dengan diikuti munculnya primordia daun. Selanjutnya perkembangan meristem tunas dapat mengatur pertumbuhan dan perkembangan meristem akar (Yeung, 1995).

Pembuatan penampang membujur embrio somatik dilakukan dengan menggunakan metode paraffin. Pengamatan pola-pola perkembangan embrio somatik menggunakan mikroskop stereo dan difoto.

#### **b. Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisis secara deskriptif dengan mengamati waktu induksi kalus, persentase eksplan membentuk kalus, visual kalus, pola perkembangan embrio somatik, struktur embrio somatik, dan profil protein.





## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

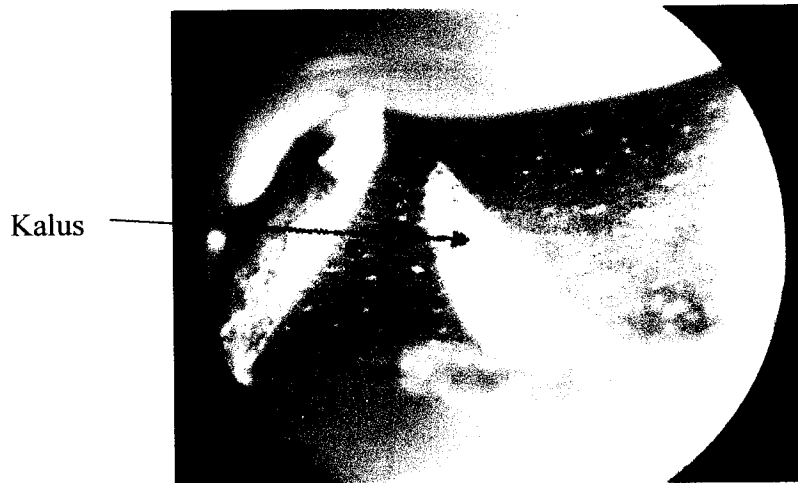
#### A. Induksi kalus

Dari dua sumber eksplan yang telah dicoba yaitu eksplan embrio zigotik dan eksplan segmen internodus ibu tangkai bunga, ternyata kalus hanya dapat di inisiasi dari segmen internodus ibu tangkai bunga (Tabel 3), kalus dapat di inisiasi dari semua perlakuan yang diuji (Tabel 3). Kalus muncul pada bekas potongan bagian yang luka (Gambar 4). Munculnya kalus ini merupakan hasil interaksi yang sangat kompleks antara eksplan, komposisi media tumbuh, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan selama periode inkubasi. Pada tahap awal penelitian ini dibutuhkan auksin dan sitokinin untuk inisiasi kalus. Dudits *et al* (1995) menyatakan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh secara eksogen merupakan faktor eksternal yang berperan dalam reaktivasi siklus sel. Auksin dan sitokinin dapat mengaktifasi sinyal transduksi sehingga sel dapat melakukan pemrograman kembali ekspresi gen yang diperlukan untuk induksi kalus dan menginduksi pembelahan untuk pertumbuhan kalus. Gunawan (1987) menyatakan bahwa pembelahan sel-sel kalus dirangsang oleh kandungan hormon endogen serta zat pengatur tumbuh auksin dan atau sitokinin yang ditambahkan secara eksogen sehingga terjadi perubahan inter dan intra seluler yang mengakibatkan pertumbuhan sel tidak terkontrol. Auksin juga dapat menyebabkan sel yang telah terdiferensiasi mampu mengalami proses dediferensiasi. Dediferensiasi merupakan reversi dari sel-sel hidup yang telah terdiferensiasi menjadi tidak terdiferensiasi atau meristematik kembali.

Tabel 3. Inisiasi kalus pada eksplan embrio zigotik dan eksplan segmen internodus ibu tangkai bunga pada kultur umur 2 minggu

Perlakuan	Eksplan			
	Segmen Internodus	Embrio Zigotik umur .... bulan		
		2	3	4
I <sub>0</sub> N <sub>0</sub>	-	-	-	-
I <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	+	-	-	-
I <sub>3</sub> N <sub>1</sub>	+	-	-	-
I <sub>4</sub> N <sub>1</sub>	+	-	-	-
I <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	+	-	-	-

Keterangan: I= 6-(y,y-dimethyl-allylamino) purine (2iP); N= *α-naphthalenacetic acid* (NAA); + = terjadi inisiasi kalus; - = tidak terjadi inisiasi kalus



Gambar 4. Segmen internodus ibu tangkai bunga *P amabilis* (L) B1

Waktu inisiasi kalus (Tabel 4) pada setiap perlakuan yang diberikan bervariasi, inisiasi kalus tercepat diperoleh pada perlakuan I<sub>2</sub>N<sub>1</sub> yaitu rata-rata 5,062 hari. Diduga penambahan 2iP dan NAA dengan konsentrasi 2 mg/L dan 1 mg/L menyebabkan perubahan konsentrasi auksin dan sitokinin endogen sehingga tercapai keseimbangan relatif untuk inisiasi kalus. Dari tabel 4 juga nampak bahwa hampir semua perlakuan yang diuji mampu menginisiasi kalus. Kalus yang diperoleh dari penelitian ini mempunyai tekstur yang seragam yaitu tekstur remah, berwarna putih dan bening. Menurut Su *et al.* (1997) kalus yang mempunyai tekstur remah mempunyai kandungan air yang lebih banyak dibandingkan dengan kalus kompak sehingga mudah dipisahkan.

Tabel 4. Waktu inisiasi kalus dan persentase eksplan membentuk kalus pada perlakuan 2 iP dan NAA

Perlakuan	Waktu inisiasi kalus (hari ke ....)	Persentase eksplan membentuk kalus (umur 4 minggu setelah dikultur)	Visual kalus umur 4 minggu setelah dikultur
I <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	5,062	100	Putih, remah
I <sub>3</sub> N <sub>1</sub>	9,875	93,75	Bening, remah
I <sub>4</sub> N <sub>1</sub>	10,1875	100	Bening, remah
I <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	11,29	100	Bening, remah

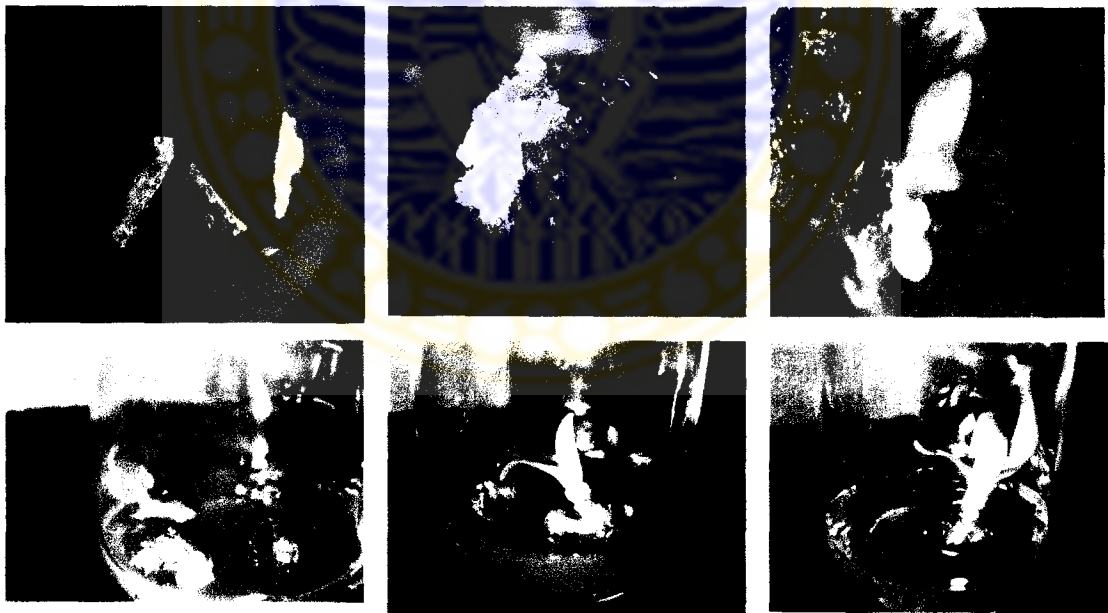
Dari hasil pengamatan, semua eksplan segmen ibu tangkai bunga pada semua perlakuan menghasilkan phenol. Adanya phenol baik pada eksplan dan pada media sangat mengganggu penyerapan dan menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan, sehingga setiap minggu eksplan harus dipindah ke media baru. Kalus yang ditumbuhkan pada suatu media perlu dipindahkan secara teratur dalam jangka waktu tertentu. Masa kultur yang panjang dalam media yang sama akan menyebabkan kehabisan hara dan air karena terjadi penguapan. Selain itu sel-sel dalam eksplan mengeluarkan senyawa-senyawa hasil metabolisme seperti phenol yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan kalus. Kalus dengan ciri-ciri kalus embriogenik yang diperoleh dari media terbaik pada tahap inisiasi kalus (I2N1) disubkultur ke media baru dengan komposisi hara dan penambahan ZPT yang sama. Kalus dari perlakuan I2N1 yang disubkultur pada media baru yang sama berproliferasi dengan cepat. Hal ini disebabkan karena sel tumbuhan yang secara alamiah bersifat autotrof menjadi heterotrof dengan adanya kandungan hara yang lengkap di dalam media tumbuh. Kalus yang diperoleh dari perlakuan I3N1; I4N1; I5N1 berwarna bening dan remah, pertumbuhannya stagnan, dan menghitam, akhirnya mati, sedangkan kalus dari perlakuan I2N1 berwarna putih. Dari hasil pengamatan, kalus yang berwarna putih merupakan kalus yang dapat mengikuti pola embriogenik. Sel-sel kalus tersebut dapat berkembang menjadi embrio somatik, tetapi tidak semua kalus tersebut mampu berkembang menjadi embrio somatik. Hal ini disebabkan karena adanya kompetisi antara sel embriogenik mengadakan perkembangan lebih lanjut. Kalus yang mempunyai kompeten membentuk embrio somatik mempunyai kriteria seperti remah dan berwarna putih atau kekuningan.

## **B. Struktur dan perkembangan embrio somatik**

Untuk mengkaji struktur dan perkembangan embrio somatik, dilakukan pengamatan secara anatomi dengan membuat irisan membujur kalus embriogenik umur 2 mgg, 4 mgg, 7 mgg, 7 mgg, 10 mgg, dan diperoleh hasil yang disajikan pada gambar 6. Pada gambar (6A) nampak pro-embrio tahap globular (umur 2 minggu), disini bentuk sel membulat pada ujungnya dan mulai terbentuk inisial meristem ujung batang pada bagian anterior embrio yang ditandai dengan sel-sel yang tersusun rapat serta memiliki inti sel yang besar, sedang bagian embrio yang berlawanan (bagian posterior) tersusun atas sel-sel yang berukuran besar. Gambar (6B) nampak pro-embrio tahap globular lanjut (umur 4 minggu), disini

nampak embrio telah mengalami pemanjangan dan muncul struktur baru yaitu *suspensor like-struktur* (SLS) pada bagian posterior embrio dan pada bagian puncak (anterior) embrio mulai membentuk *leaf-like organ* (LLO) yang tersusun dari sel-sel kecil-kecil dan rapat. Gambar (6C) nampak embrio (umur 6 minggu) mulai membentuk *leaf-like organ* (LLO) pada ke dua sisinya. Gambar (6D) nampak embrio (umur 7 minggu) mulai berkembang lebih lanjut dan telah terbentuk *leaf-like organ* (LLO) dan nampak meristem tunas apikal. Gambar (6E) nampak embrio (umur 10 minggu) dengan *leaf-like organ* (LLO) dan meristem tunas apikal yang telah berkembang lebih lanjut dan nampak mulai terbentuk *procambial strand* (PS).

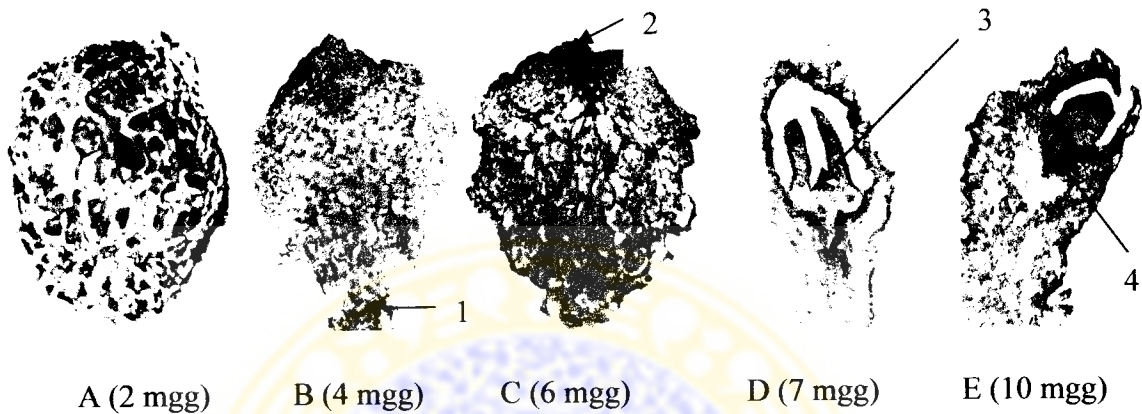
Dari gambar 6 tampak bahwa meristem ujung batang dibentuk pada tahap pertumbuhan embrio pada minggu ke 6. Inisial meristem ujung batang telah tampak pada minggu ke-2 setelah ditanam dalam media NP ditambah ZPT I2N1. Pertumbuhan tunas terjadi dari daerah meristem ujung batang . Hasil pengamatan menunjukkan bahwa embrio somatik *P amabilis* yang berumur 7 minggu setelah ditanam mampu membentuk calon tunas.



Gambar 5. Perkembangan embrio somatik *P amabilis* (L.) Bl.



Hasil pengamatan menunjukkan bahwa penambahan ZPT I2N1 ke dalam medium dapat menginduksi kalus embriogenik (proembrio) menjadi embrio somatik. Pembentukan embrio somatik diawali dengan adanya perubahan warna kalus. Kalus yang berwarna putih (proembrio) berbentuk globuler berkembang menjadi memanjang dan selanjutnya mengalami perubahan secara perlahan menjadi hijau diikuti terbentuknya *protocorm like bodies* (PLB), dan akhirnya terbentuk tunas (Gambar 5).



Gambar 6. Struktur embrio somatik

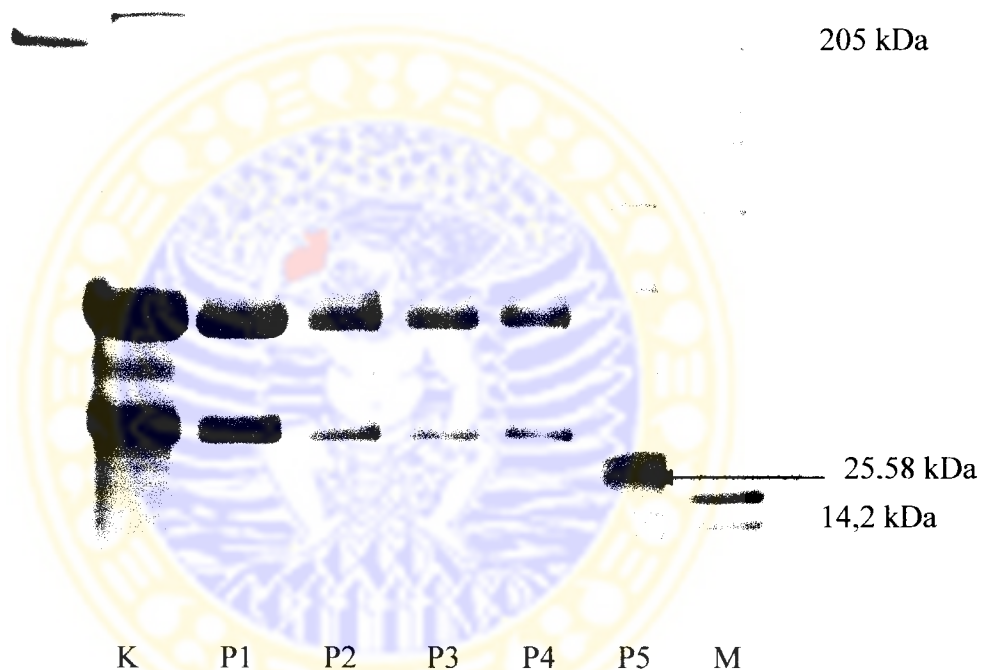
Keterangan: 1 = Suspensor like strukture; 2= Leaf like organ; 3= Meristem tunas apical; 4= Procambial Strand

#### a. Profil protein

Untuk mengetahui profil protein pada fase awal perkembangan eksplan *P. amabilis* (L) B1 yang dikultur pada media ND tanpa ZPT dan media ND ditambah I<sub>2</sub>N<sub>1</sub> pada kultur umur 1, 2, 3, 4, dan 5 hari setelah tanam, fraksi protein dipisahkan menggunakan gel akrilamid dengan konsentrasi 12 % dan dianalisis secara elektroforesis. Hasil elektroforesis pada gambar 7 menunjukkan bahwa eksplan yang dikultur pada media ND + ZPT I<sub>2</sub>N<sub>1</sub> nampak pita protein yang lebih banyak dibanding pada media ND tanpa ZPT I<sub>2</sub>N<sub>1</sub> dan merupakan pita-pita protein baru dan pita-pita baru tersebut tidak muncul pada eksplan yang dikultur pada media tanpa ZPT. Pita protein tersebut adalah mempunyai berat molekul 100,46 kDa; 97,79 kDa; 92,98 kDa; 57, 54 kDa; 36,47 kDa; dan 25,58 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ZPT I<sub>2</sub>N<sub>1</sub> secara eksogen mampu menginduksi sintesis protein baru. Selain menginduksi sintesis protein baru pemberian ZPT I<sub>2</sub>N<sub>1</sub> secara eksogen juga mampu menekan sintesis protein yang sudah ada. Hasil tersebut menunjukkan adanya pengendalian dalam sistem ekspresi gen. Eksplan yang dikultur dalam media + ZPT memiliki lebih banyak



gen yang aktif terutama gen-gen yang menyandi informasi yang diperlukan sel untuk melakukan pembelahan sel, pemanjangan sel, dan inisiasi kalus. Hal ini sesuai dengan pendapat Fukuda *et al.* 1994 yang menyatakan bahwa pembelahan pada sel eukariotik diatur oleh interaksi beberapa protein tertentu yang disintesis oleh kelompok gen dan terjadi pada fase awal pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Salah satu kelompok protein yang mengatur pembelahan pada sel eukariotik adalah protein siklin. Pada tumbuhan, protein tersebut terekspresi pada sel yang dikultur secara *in vitro*.



Gambar 7. Profil protein eksplan *Ph amabilis* (L.) BI (SDS-PAGE) pada kontrol (K) dan perlakuan (P) dengan penambahan ZPT I2N1 dengan umur kultur yang berbeda. P1 = 1 hari; P2 = 2 hari; P3 = 3 hari; P4 = 4 hari; P5 = 5 hari; M = Marker

Protein baru dengan berat molekul 25,58 kDa muncul pada hari ke 2 setelah eksplan dikultur dalam media ND ditambah ZPT I2N1, pita tersebut tidak muncul pada kontrol dan tampak menebal pada hari ke-5 setelah eksplan dikultur. Berdasarkan hasil elektroforesis tersebut, diduga bahwa protein yang baru muncul pada hari ke 2 setelah eksplan ditanam merupakan jenis protein yang menandakan kemampuan di induksinya kalus pada eksplan anggrek *P amabilis*. Hal ini merupakan respon yang pertama muncul/nampak pada saat

jaringan/organ tanaman dilukai yaitu terbentuknya sel-sel penutup luka yang sel-sel nya terus mengalami pembelahan membentuk massa sel yang disebut kalus. Dari hasil tersebut nampak bahwa untuk inisiasi kalus dipengaruhi oleh pemberian ZPT eksogen. Hal ini sesuai dengan pendapat Arnold *et al.*, 2002 yang menjelaskan bahwa faktor eksternal yaitu pemberian ZPT secara eksogen seperti auksin berperan penting dalam reaktivasi siklus sel . Auksin mampu mengaktifasi sinyal transduksi sehingga sel dapat mengadakan pemrograman kembali ekspresi gen dan menginduksi pembentukan kalus dan bersama-sama dengan sitokinin, auksin mampu menginduksi pembelahan sel.



## **BAB V**

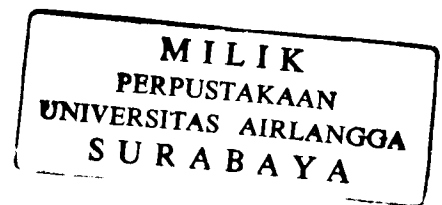
### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

1. Segmen internodus ibu tangkai bunga adalah eksplan terbaik untuk induksi kalus *P amabilis* (L) Bl
2. Zat pengatur tumbuh 2iP dan NAA dengan konsentrasi 2 mg/L dan 1 mg/L adalah yang sesuai untuk induksi kalus embriogenik *P amabilis* (L) Bl
3. Struktur dan pola perkembangan embrio somatik *P amabilis* (L) Bl menyerupai pola perkembangan embrio zigotiknya.
4. Pemberian ZPT I2N1 2 hari setelah tanam mampu merubah profil protein eksplan *P amabilis* (L) Bl

#### **B. Saran**

1. Penggunaan sistein 10 mg/L untuk menanggulangi pencoklatan pada kultur segmen internodus ibu tangkai bunga pada penelitian kurang efektif, sehingga perlu ditingkatkan konsentrasinya
2. Perlu dicoba menggunakan sumber eksplan yang lain yaitu segmen protokorm
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut blotting Protein dengan BM 25,58 kDa atau di sequencing asam aminonya



## DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 1976. *Anggrek Indonesia*. Lembaga Biologi Nasional LIPI. Bogor. Hal. 103
- Archana, C., K.Paramjit. 2002. Gene Expression During Somatic Embryogenesis-Recent Advances. *Current Science*. Vol. 83. No.6 : 715-727
- Arditi, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley and Sons, New York. P. 571-581
- Arnold, S.V., D.Clapham., V.Egertsdotter., I.Ekberg., H.Mo., H.Yibrah. 1995. Somatic Embryogenesis in Norway Spruce (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 416-418
- Arnold, S.V., I.Sabala., P.Bozhlov., J.Dyachok., L.Filonova. 2002. Developmental Pathway of Somatic Embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 233-249.
- Attree, S.M. and L.C. Fowke. 1993. Embryogenesis of Gymnospermae Advances in Synthetic Seed Technology of Conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 68:30-34.
- Atsushi, K., Natsuko, M., Koji, N. 2005. 2004. SIVB Congress Symposium Proceeding: Mechanism of Somatic Embryogenesis in Carrot Suspension Morphology, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 41: 6-10.
- Bajaj, Y.P.S. 1995a. Somatic Embryogenesis and its Applications for Crop Improvement. In: Y.P.S. Bajaj (edit). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. pp. 105-118.
- Bajaj, Y.P.S. 1995b. Cryopreservation of Somatic Embryos. In: Y.P.S. Bajaj (edit). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. p. 221-227.
- Banks, D.P. 1999. *Tropical Orchids of Indonesia*. Periplus Editions (HK) Ltd. Singapore
- Brischia, R., E. Piccioni., A.Standardi. 2002. Micropropagation and Synthetic Seed in M.26 Apple Rootstock (II): A. New Protocol for Production of Encapsulated Differentiating Propagules. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 68:137-141.
- Canhoto, J.M., J.F.Mesquita., G.S.Cruz. 1996. Ultrastructural Changes in Cotyledons of Pineapple Guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. *Annals of Botany*. 78: 513-521.
- Chithra,M., K.P. Martin., C. Sunandakumari., P.V. Madhusoodanan. 2005. Somatic Embryogenesis, Encapsulation, and Plant Regeneration of *Rotula aquatica.*, A Rare Rhoeophytic Woody Medical Plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 41 : 28-31

- Chrumbach, A. & Rodbard, D. 1985. Quantitative and Preparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis. in: *Gel Electrophoresis of Protein A Practical Approach*. Eds. Flames, B.D & Rickwood, D. IRI. Press. Oxford, Washington.
- Chopra, V.L., R.P. Sharma., M.S. Swaminatun. 1996. *Agricultural Biotechnology*. 2<sup>nd</sup> Asia Pasific Conference. Science Publishers, Inc., Lebanon
- Cleland, RE. 1990. Auxin and Cell Elongation. In: *Plant Hormone and Their Role in Plant Growth and Development*. Eds Davies, P.J. Kiuwer Ac. Press Pub. Boston-London. p. 132-148
- Cosgrove, DJ. 1997. Relaxation in a High-Stress Environment. The Molecular Bases of Extensible Cell Walls and Cell Enlargement. *Plant Cell*. 9: 1031- 1041
- Cosgrove, DJ. 1998. Cell Walls Lossening by Expansins. *Plant Physiol*. 118: 333-339
- Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Cambridge University Press. UK
- Cullen, J. 1992. *The Orchid Book: a guide to the identification of cultivated orchid species*. 1<sup>st</sup> ed. Cambridge Univ Press
- Denchev, P.D. and A.I. Attanassov. 1995. Micropropagation through Somatic Embryos. In: Y.P.S. Bajaj (edit). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. pp. 193-206.
- Dudits, D. J. G., L. Bogre and L. Bako. 1995. Molecular Biology of Somatic Embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (eds) *In Vitro Embryogenesis in Plant*. Kluwer Acad. Publ. p. 268-269
- Dunstan, D.I., T.E. Tautorus., TA. Thorpe. 1995. Somatic Embryogenesis in Woody Plant. In: T.A. Thorpe (edit). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. Boston. London. p: 471-540
- Ellis, D. 1995. Genetic Transformation of Somatic Embryos. In: Y.P.S. Bajaj (edit). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. p. 207-218
- Ferriera, P., Hemerly, A. S., Almeida, E. J., Van, M. M., Engler, G & Inze, D. 1994. Developmental Expression of the Arabidopsis Cyclin Gene *cyc At*. *Plant Cell*. 6:1763-1774
- Fosket, D. E. 1994. *Plant Growth and Development a Molecular Approach*. Academic Press. New York, London, Sydney. p.298-331
- Fukuda, H., Ito, M., Sugiyama, M. & Komamine, A. 1994. Mechanism of the Proliferation and Differentiation of Plant Cell Culture Systems. *Int. J. Dev. Biol*. 38: 287-299



- Gunawan, L. W. 1987. Teknik kultur jaringan. PAU-IPB. Bogor, hal 252
- Gray, D.J., ME. Compto., R.C. Harell., Cantliffe. 1995. Somatic Embryogenesis and the Technology of Synthetic Seed. In: Y.P.S. Bajaj (edit). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*.p. 126-145
- Hu, Z, L. 1996. Protein Electrophoresis. In: *Practical Protocols in Molecular Biology*. Eds. Li, Y. & Zhao, Y. Science Press: Beijing, New York. p. 235- 243
- Igasaki, T., N. Akashi., T. Ujino-Ihara., Y. Matsubayashi., Y. Sakagami & K. Shinohara. 2003. Phytosulfokine Stimulates Somatic Embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol.* 44(12): 1412-1416
- Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M., Tanaka, M. 1998. Callus Induction and Somatic Embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Report.* 17: 446-450
- Iswanto, H. 2001. *Anggrek Phalaenopsis*. Agro Media Pustaka. Jakarta
- Johanis, P., Djunaedi, G., Harry, W., Rusdy, E.N., Irawati. 2001. *Tumbuhan Langka Indonesia*. Puslitbang Biologi-LIPI.
- Jones, S.B. and A.E. Luchsinger. 1986. *Plant Systematics*. 2<sup>nd</sup> ed. Mc Graw Hill. New York
- Katuuk, J.R.P. 1989. *Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropropagasi Tanaman*. Depertemen P dan K. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. PPLPTK. Jakarta. p. 56-60
- Komura, K., and A.Komamine. 1995. Physiological and Biochemical Aspects of Somatic Embryogenesis. In: T.A.Thorpe (edit). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publisher Dordrecht. Boston. London. p. 249-253
- Li, Y., Liu, Z.B., Shi, X., Hagen, G & Guilfoyle, T.J. 1994. An Auxin-Inducible Element in Soybean SAUR Promoters. *Plant Physiol.* 106: 37-43
- Lyndon, R.F. 1990. *Plant Development The Cellular Basis*. Unwin Hyman. London, Boston, Sydney. p. 190-200
- Mamiya, K., Y. Sakamoto. 2001. A Method to Procedure Encapsulatable Units For Synthetic Seed in *Asparagus officinalis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 64: 27-32
- Mc Kersie, B.D., S. Van Acher., F.M. Lai. 1995. Role of Maturation and Desiccation of Somatic Embryos in the Production of Dry Artificial Seed. In: Y.P.S. Bajaj (edit). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. p.153-167
- Morel, G. M. 1974. *The Orchids*. Editor : C.L. Withner 1<sup>st</sup> ed. John Wiley & Sons Inc. Canada. P. 254

- Nieves, N., M.E. Martinez., L. Castillo., M. A. Blanco., J.L.G.Olmedo. 2001. Effect of Abscisic Acid and Jasmonic Acid on Partial Desiccation of Encapsulated Somatic Embryos of Sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.65:15-21
- Raghavan, V. 1997. *Molecular Embryology of Flowering Plants*. Cambridge University Press. p. 394-439
- Raghavan, V. 1976. *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*. Academic Press. London. pp. 349-350; 358-381
- Schiavone, F.M., R.H.Racusen. 1990. Microsurgery Reveal Regional Capabilities for Pattern Reestablishment in Somatic Carrot Embryos. *Dev. Biol.* 141, 211
- Setiawati, Y. 1991. Anggrek. *Buletin PAI* 1. 6-12
- Shinoyama, H., Y. Nomura., T. Tsuchiya., T. Kazuma. 2004. Simple and Efficient Method for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaves of Chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Plant Biotechnology* 21 (1): 25-33
- Sicurani, M., E. Piccioni., A.Standardi. 2001. Micropropagation and Preparation of Synthetic Seed in M.26 Apple Rootstock I: Attempts towards Saving Labor in the Production of Adventitious Shoot Tips Suitable for Encapsulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66: 207-216
- Sripaoraya, S., R. Marchant., J. B. Power., M. R. Davey. 2003. Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis and Organogenesis in Commercial Pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cellular & Development Biology*. 39: 450-454
- Stephen, H. H. 1998. *Molecular Genetic of Plant Development*. Cambridge University Press. p. 55-80
- Su, W. W., W. I. Hwang, S. Y. Kim and Y. Sagawa. 1997. Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50 : 91-95
- Suryowinoto, M. 1982. *Mengenal anggrek-anggrek spesies*. Jilid II. Penyandraan. Fak Biologi. UGM. Yogyakarta. 93-94
- Sweet, H.R. 1980. *The Genus Phalaenopsis*. The Orchid Digest Inc. U.S.A. pp 128
- Taiz, L. & Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers: Sunderland.

- Tokuhara, K., M. Mii. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cell. Dev Biol-Plant.* 37 : 457-461
- Tokuhara, K., M. Mii. 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cell. Dev Biol-Plant.* 39 : 635-639
- Vargas, T. E., E.D. Garcia., M. Oropeza. 2005. Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* from Cell Suspension Cultures: Histological Analysis and Extracellular Protein Pattern. *Journal of Plant Physiology* 162: 449-456
- Yeung, E.C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: T.A.Thorpe (edit): *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publisher. Netherland. p. 205-250
- Zhang, N & Hanestein, K.H. 2000. Distribution of Expansins in Graviresponding Maize Roots. *Plant Cell Physiol.* 41(12): 1305-1312

