

KAJIAN KARAKTER MORFOLOGI MIKROSPORA TEBAKAU VIRGINIA YANG MENGALAMI CEKAMAN PELAPARAN DAN SUHU TINGGI SECARA IN VITRO

Baiq Farhatul Wahidah

Dosen Pada Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar

Abstract: *The effect of treatment combination by heat shock (34°C) and starvation medium on embryogenesis induction in microspore culture of selected genotype of Nicotiana tabacum L.cv. Virginia was examined.*

The microspores which were isolated aseptically by maceration and centrifugation, were cultured on starvation medium (B medium) without sugar and nitrogen during 6 days at 34°C. The culture contained relatively homogeneous population of developed stage microspore (late uninucleate stage). The viability and development of microspore was observed. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) was used to stain the nucleus. Stained microspores were examined under a fluorescence microscope.

The result showed that during stress treatment by starvation and heat shock (34°C) the structure of microspore change into 3 types of embryogenic microspore. Type 1 was identical to the late uninucleate microspore stage; in type 2 the vacuole of microspore was fragmented and peripheral cytoplasmic pocket contain the nucleus; and type 3 the nucleus was positioned in cytoplasmic pocket in the centre of the microspore.

Key words: *Nicotiana tabacum L.cv. Virginia, Starvation, heat shock.*

I. PENDAHULUAN

Mikrospora merupakan stadium muda dalam tahap perkembangan pollen. Secara normal, perkembangan mikrospora selanjutnya akan berdiferensiasi menjadi pollen yang berperan sebagai alat reproduksi jantan pada tumbuhan. Dengan kata lain bila tidak ada persatuan antara alat reproduksi jantan dan alat reproduksi betina tidak akan terjadi individu baru sehingga mikrospora /pollen ini akan terbuang secara percuma, padahal dalam setiap pohon tembakau mengandung ribuan mikrospora. Dengan kultur mikrospora, pollen dalam stadium muda ini bisa diinduksi menjadi embrio. Jika jumlah mikrospora dalam satu kuncup bunga adalah ribuan (satu antera paling

tidak mengandung 300 mikrospora) maka dapat diprediksikan jumlah planlet/individu baru yang dihasilkan dari kultur mikrospora tembakau ini. Selain itu keuntungan dari kultur mikrospora adalah dapat diketahui sifat-sifat resesif yang muncul ketika dikulturkan yang tidak mudah ditemukan pada metode pemuliaan tanaman yang lain. Dengan adanya kelebihan ini maka proses pemuliaan tanaman dapat dilakukan dengan mudah dan cepat. Sehubungan dengan kebutuhan manusia akan tembakau berkualitas tinggi pada tahun-tahun mendatang diharapkan dapat diatasi dengan kayanya sumber plasma nuftah dari kultur mikrospora ini.

Prinsip dasar dari kultur mikrospora adalah menginduksi mikrospora yang bersifat embriogenik dengan cara membelokkan arah perkembangan gametofitik ke arah sporofitik sehingga menghasilkan embrio yang bersifat haploid. Fenomena ini dikenal dengan nama *androgenesis* atau *embriogenesis mikrospora*. Pada embrio yang bersifat haploid, proses penggandaan kromosom lebih lanjut dapat dilakukan sehingga dihasilkan tanaman yang bersifat *doble haploid* (homozigot) sifat ini sangat penting dalam pemuliaan tanaman.

Seperti dikemukakan di atas prinsip dasar dari kultur mikrospora adalah menginduksi mikrospora yang bersifat embriogenik dengan cara membelokkan arah perkembangan gametofitik ke arah sporofitik, perubahan jalur gametofitik ke arah sporofitik dapat diinduksi dengan mengaplikasikan beberapa perlakuan misalnya berupa stres pelaparan, stres temperatur (dengan temperatur tinggi dan rendah) (Touraev *et al.*, 1997). Stres berupa temperatur tinggi (30-35°C) telah terbukti meningkatkan respon androgenesis pada *Brassica*, *Zea mays* L, *Triticum aestivum* serta *Oryza sativa* L (Li *et al.*, 1988; Reddy *et al.*, 1985). Gandum akan menunjukkan respon androgenesis pada temperatur optimal 32°C selama 6 hari (Li *et al.*, 1988) dan pada suhu 33°C yang dikombinasi pelaparan (Touraev *et al.*, 1996). Metode yang sama sebelumnya diterapkan pada *Oryza sativa* (Ogawa *et al.*, 1994) Sedangkan *Brassica campestris* menunjukkan respon androgenesis pada temperatur 35°C selama 3 hari.

Disamping perlakuan stres temperatur tinggi, perlakuan berupa temperatur rendah pada kuncup bunga sebelum dilakukan isolasi antera atau mikrospora dilaporkan dapat meningkatkan respon androgenesis pada sereal seperti *Hordeum vulgare* L, *Oryza sativa*, dan *Zea mays* L. Perlakuan temperatur rendah berkisar antara 2-15°C dalam waktu 2-28 hari (Kiviharju dan Pehu, 1998).

Tanaman yang akan dipergunakan dalam penelitian ini adalah *Nicotiana tabacum* L cv. vortenlanden. Varietas tembakau ini merupakan bahan dasar pembuatan sigaret, dan sangat diminati di pasar eropa. Selain itu varietas

tembakau ini merupakan varietas unggulan di Daerah NTB khususnya Lombok Timur, Lombok tengah dan juga Lombok Utara (54% produksi tembakau *Nicotiana tabacum* L. cv. Virginia di Indonesia dihasilkan NTB). Besarnya antusias pasar eropa terhadap varietas tembakau ini menyebabkan Indonesia harus meningkatkan produksi tembakau tidak hanya secara kuantitas tetapi juga secara kualitas. Secara konkrit permasalahan ini digambarkan Kuswanto (2005) adalah bagaimana meningkatkan tembakau virginia lombok bisa meningkat dari 35.000 ton menjadi 75.000 ton tetap kompetitif, bagaimana bisnis tembakau Virginia meningkat dari 500milyar menjadi 1 triliyun, bahkan bagaimana bila sektor pertanian ini menjadi pilihan profesi bagi generasi muda.

Meskipun seharusnya tujuan akhir dari penelitian adalah menghasilkan tanaman tembakau yang berkualitas tinggi, tetapi penelitian ini lebih ditujukan untuk melihat tahapan perubahan karakter morfologi pada mikrospora tembakau yang diinduksi secara invitro.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini dijabarkan sebagai berikut: Untuk mengetahui bagaimana perubahan karakter morfologi mikrospora tembakau *Nicotiana tabacum* L. cv. Virginia setelah diberi perlakuan cekaman pelaparan dan suhu tinggi.

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan Penelitian

1. **Bahan Habis** pakai berupa: Kuncup *Nicotiana tabacum* L cv. Virginia ukuran mahkota bunga kuncup 7-11 mm, Medium B (starvasi), Deterjen, NaClO 5,25% / Sunclin/HgCL₂ 0,05%, Asam Asetat Glacial, Pewarna DAPI (4,6-Diamidino 2-phenylidole), Alkohol 70%, gliserin.

2. **Alat-alat** berupa :Laminar air flow, sentrifugasi, timbangan analitik, inkubator yang distel pada suhu 34°C, cawan petri, kertas payung, aluminium foil, autoclave, scalpel, pinset, batang penggerus, flakon, tabung sentrifus, mikropipet dan mikrotip, gelas benda dan gelas penutup, mikroskop fluorescen, label dan pensil.

Cara kerja

a. Pengadaan eksplan: Dimulai dengan persiapan media tanam yaitu menyediakan tanah kering yang kemudian dicampur dengan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1. lalu dibiarkan selama 10 hari. Campuran tanah tersebut dimasukkan ke dalam polybag. Pada saat bibit akan ditanam terlebih

dahulu diberi pupuk fosfat. Pemupukan selanjutnya adalah dengan pupuk yang mengandung nitrogen yaitu pada hari ke 7 dan hari ke 28 masa tanam. Bagian tanaman yang akan dijadikan eksplan adalah kuncup bunganya, yang umumnya akan didapatkan setelah 3 bulan masa tanam.

- b. Penentuan stadium Perkembangan Mikrospora :** Mikrospora diisolasi dari antera, kemudian diamati di bawah mikroskop. Penentuan stadium perkembangan mikrospora dilakukan pada beberapa ukuran mahkota kuncup bunga yaitu 7-11mm yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu : 7-8mm, 8-9mm, 9-10mm, 10-11 mm. stadium yang diperlukan adalah stadium *Late uninucleate* yang ditentukan atas dasar letak inti, jumlah inti dan vakuolisasi yang terjadi.
- c. Isolasi mikrospora dan kultur :** Perlakuan stres diberikan pada mikrospora yang sudah diisolasi secara aseptik. Perlakuan berupa kombinasi stres pelaparan (medium B yang mengandung: KCl 1490mg/l, CaCl₂ 147mg/l, MgSO₄7H₂O 250 mg/L, Manitol 54700mg/l, KH₂PO₄ 140mg/l pH 7) dan suhu 34°C selama 6 hari. Untuk melihat perkembangan inti dilakukan pewarnaan DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole).
- d. Pengecatan DAPI :** Pengecatan DAPI bertujuan untuk melihat perkembangan inti sel mikrospora dengan prosedur sebagai berikut :
- 1) Mikrospora difiksasi alkohol 70% dan asam asetat glacial dengan perbandingan 1:3 selama 15 menit. Kemudian dicuci alcohol 70% sebanyak 2 kali
 - 2) Larutan DAPI dituangkan dan dibiarkan selama 20 menit lalu ditetesi gliserin
 - 3) Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop fluorescen.
Pengecatan ini bisa dilakukan pada saat : mikrospora masih segar dan setelah perlakuan cekaman pelaparan dan suhu tinggi.

B. Parameter penelitian:

Parameter penelitian meliputi hal-hal berikut :

1. Stadium perkembangan mikrospora meliputi mikrospora uninukleat awal-tengah, uninukleat akhir, binukleat;
2. Perkembangan inti dilakukan setelah perlakuan stres. Dihitung mikrospora uninukleat, binukleat asimetris, binukleat simetris;
3. Viabilitas mikrospora sebelum dan sesudah perlakuan stres. Viabilitas ditandai dengan mikrospora berbentuk bulat, dan tidak terplasmolisis;
4. Prosentase mikrospora embriogenik setelah perlakuan;

C. Teknik Pengumpulan dan Analisis data :

Pengumpulan data dilakukan secara deskripsi dengan menghitung rata-rata dan standar deviasi dari masing-masing parameter. Selain itu akan dilakukan dokumentasi berupa pemotretan obyek penelitian baik pada preparat segar, preparat mikrospora yang sudah diberikan perlakuan stres pelaparan dan suhu 34°C selama 6 hari. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop cahaya dan fluorescen.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Penetapan Stadium Perkembangan Mikrospora

Stadium perkembangan sangat penting dalam menentukan keberhasilan induksi embryogenesis mikrospora karena embrio yang terbentuk dalam jumlah banyak didapat dari stadium yang responsive yaitu anthera yang mengandung mikrospora pada stadium uninukleat akhir dan sebelum mitosis (Dunwell, 1996). Dalam penelitian ini terdapat korelasi antara ukuran panjangkuncup bunga dengan stadium perkembangan mikrospora.

Penelitian dilakukan pada 4 kelompok bunga berdasarkan ukuran kuncup masing-masing: 7-8mm, 9-10mm, 11-12mm, 12-13mm. berdasar hasil pengamatan dari keempat kelompok tersebut terlihat semakin panjang ukuran kuncup maka stadium mikrospora semakin dewasa. Stadium perkembangan pada penelitian ini ada 3 kelompok yaitu uninukleat awal-tengah, uninukleat akhir dan binukleat. Uninukleat awal-tengah memiliki ciri mikrospora berbentuk bulat dengan vakuola kecil-kecil. Dengan pengecatan DAPI kedudukan inti terletak ditengah. Pada stadium selanjutnya / uninukleat akhir kedudukan inti makin kepinggir dan ukuran vakuola semakin besar bahkan menempati sebagian besar volume sel. Sedangkan untuk stadium binukleat dicirikan dengan adanya 2 inti dalam mikrospora tersebut.

Hasil pengamatan menunjukkan ada beberapa perbedaan persentase stadium perkembangan mikrospora pada keempat kelompok ukuran kuncup tersebut dengan perincian sebagai berikut:

Tabel 1. Stadium perkembangan mikrospora *L. cv. Virginia* (5kali ulangan)

Ukuran kuncup (mm)	Rata-rata stadium perkembangan		
	uninukleat awal- tengah	uninukleat akhir	binukleat.
7-8	77,58 ± 1,23	21,42 ± 1,72	-
9-10	54,13 ± 1,47	45,17 ± 1,97	0,67 ± 0,92
11-12	27,96 ± 1,01	69,48 ± 1,52	2,55 ± 0,73
12-13	17,74 ± 2,67	38,56 ± 1,96	44,73 ± 3,76

Dari table di atas persentase tertinggi mikrospora stadium uninukleat akhir adalah pada ukuran kuncup 11-12mm. menurut Dunwell (1996) ukuran ini merupakan ukuran terbaik sebagai eksplan untuk induksi embryogenesis mikrospora. Touraev *et.al* (1995) pada *Nicotiana tabacum cv petit Havana SR1* menyebutkan stadium uninukleat awal berada pada fase G1 sedangkan stadium uninukleat akhir berada pada fase G2 dalam siklus sel. Tetapi menurut Indrianto *et al* (2001) mikrospora pada stadium uninukleat akhir merupakan transisi antara Fase G1 dan S. Fase G1 merupakan periode presintesis DNA sedangkan fase S merupakan masa berlangsungnya sintesis DNA. Pada mikrospora yang diberi perlakuan cekaman ketika memasuki check point G1 yang berada di antara fase G1 dan S akan menghasilkan proses seluler yang berbeda dari proses alaminya. Dalam hal ini terjadi proses pembelokan arah perkembangan gametofitik kearah sporofitik.

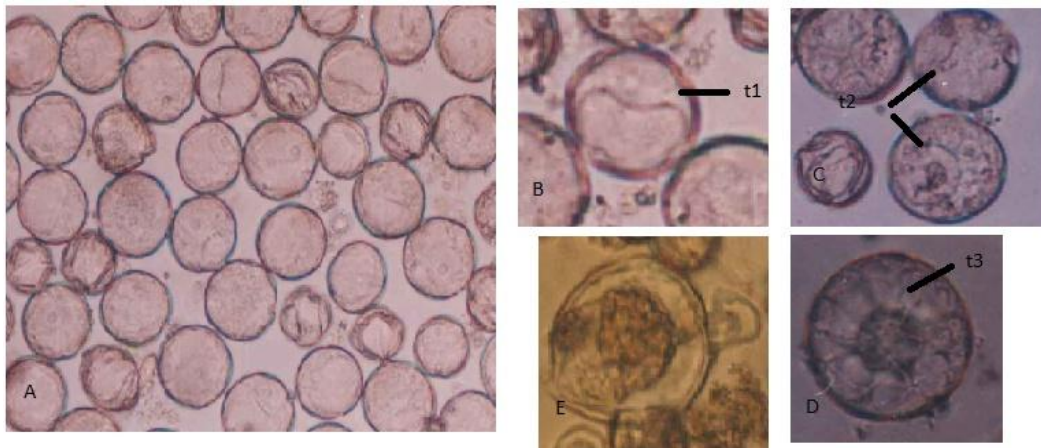
B. Perkembangan Mikrospora Setelah Perlakuan Cekaman Pelaparan dan Suhu Tinggi

Mikrospora yang diisolasi dan diberi perlakuan cekaman pelaparan dan panas 34°C akan mengalami perubahan baik viabilitas maupun perubahan secara morfologi dan sitologi. Viabilitas setelah perlakuan cekaman akan mengalami penurunan. Pada table 2 menunjukkan korelasi antara lama strss (6 hari) dengan viabilitas mikrospora. Hal ini disebabkan karena sebagian mikrospora tidak dapat bertahan hidup pada kondisi yang tidak normal yaitu suhu tinggi dan medium pelaparan.

Table 2. Mikrospora Embriogenik *Nicotiana Tabacum* L. cv. Virginia Setelah Perlakuan Cekaman Pelaparan Dan Suhu 34°C

Perlakuan	Viabilitas	Mikrospora Embriogenik		
		Tipe 1	Tipe 2	Tipe3
Segar	74,99 ± 1,33	-	-	-
Cekaman 6 hari	50,93 ± 0,59	12,88 ± 1,11	16,22 ± 0,73	21,79 ± 0,68

Selain berkurangnya viabilitas, mikrospora mengalami perubahan morfologi dan sitologi. Tujuan dari pemberian cekaman adalah untuk menginduksi mikrospora yang bersifat embriogenik. Dari hasil pengamatan morfologi mikrospora embriogenik dibagi menjadi 3 tipe (Indrianto, et al. 2001) yaitu tipe 1, tipe 2, tipe 3, mikrospora tipe 1 memiliki ciri yang identik dengan mikrospora fase uninukleat akhir dengan vakuola berukuran besar hampir memenuhi seluruh ruang sel, inti masih di tepi dekat dengan dinding sel. Selama proses cekaman tipe ini akan mengalami perubahan yaitu ukuran sel akan bertambah besar. Secara sitologi pada mikrospora embriogenik terjadi juga perubahan pada organel-organel yang lain yaitu terdapat granula amilum/ secara morfologi tampak lebih jernih, ukuran dan jumlah plastid berkurang, demikian juga mitokondria dan ribosom. Perkembangan selanjutnya adalah vakuola mulai terfragmentasi karena terbentuknya strand sitoplasmik yang melewati vakuola dan menghubungkan sitoplasma perinuklear dengan sitoplasma subcortical, inti masih ada dekat dinding sel mikrospora. Mikrospora yang berada dalam keadaan ini dikelompokkan dalam tipe 2 fragmentasi vakuola yaitu terbentuknya vakuola kecil dimaksudkan untuk mencegah pecahnya dinding mikrospora akibat bertambahnya ukuran vakuola selama cekaman berlangsung. Inti kemudian bergerak ke pusat sel sehingga membentuk struktur seperti bintang (*star like*). Mikrospora ini dikelompokkan ke dalam tipe 3. Selama proses induksi dan sebelum pembelahan sel terjadi reorganisasi pada sistem skeleton mikrospora. Tubulin-tubulin terakit menjadi filamen mikrotubul. Mikrotubul kemudian membentuk preprofase band (PPB). Diprediksikan PPB ini merupakan tempat terbentuknya dinding baru pada sel anakan hasil dari mitosis (Simmons, 1999).



Gambar 1. Perubahan Karakter Morfologi Sel Mikrospora Setelah Mengalami Cekaman Pelaparan Dan Suhu Tinggi

Keterangan:

Populasi Mikrospora Segar; B-D mikrospora yang telah mengalami cekaman (B) Tipe 1, (C) tipe 2, (D) tipe 3 terlihat struktur *star like*; E. Sel mikrospora yang berkecambah (tidak mengalami cekaman)

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah diuraikan di atas, maka dapat diambil kesimpulan :

1. Setelah perlakuan cekaman mikrospora mengalami perubahan morfologi menjadi 3 tipe mikrospora embriogenik yaitu tipe 1, tipe 2, dan tipe 3.
2. Mikrospora yang tidak diberi perlakuan cekaman akan berkembang membentuk buluh serbuk sari (berkecambah)

DAFTAR RUJUKAN

- Bhojwani, SS and Bhatnaga, S.P. 1999 .*The Embriology Of Angiosperm*. New Delhi. Vicas Publishing Hause PVT LTD.
- Cahyono, B. 1998. *Tembakau Budidaya dan Analisis Usaha Tani*. Yogyakarta. Penerbit Kanisius
- Dunwell J.M. 1996. *Microspore Culture*. In Jain S.M; S.K. Sopory and R.E Veilleux (Eds). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants* vol I Fundamental aspect in Method. Nederlands. Kluwer Academics Publishers. p:205-216

- Ferrie, A.M.P. and Keller, W.A. 1995. *Microspore Culture For Haploid Plant Production* in : Gamborg O.L. and Philips. G.C. (eds) *Plant Cell, tissue and Organ Culture Fundamental Methods*. Heidelberg German. Springer verlag Berlin.
- Indrianto,A; Barinova, I; Touraev,A and Heberle–Bors,E. 2001. *Tracking Individual Wheat Microspores In vitro: Identifikasi of Embriogenic Microspores and Body Axis Formation in Embryo*. *Planta* 212 : 163-174
- Karp, G. 1999. *Cell and Molecular Biology*. Concepts and Experiments 2nd ed. Canada. Jhon Wiley and Sons.,Inc.. Pp.606-613
- Kiviharju, E and Pehu,E. 1998. *The Effect of Cold and Heat Pretreatment on Anther Culture Response of Avena sativa and Avena sterilis*. *Plant cell tissue and organ culture* 54: 97-104
- Kuswanto, 2005. *Kerjasama kemitraan antara swasta dan Perguruan Tinggi dalam Penelitian untuk Meningkatkan daya Saing Daerah (Virginia lombok Espektasi dan Revitalisasi)*. PT Sadana Arif Nusa. Makalah disampaikan pada PENLOK Nasional METOPEN. 29-30 september 2005 (tidak dipublikasikan)
- Li H.K; Javed, A.Q; and Kutty, K.K. 1988. *The Influence of Different Temperature Treatments on Anthere Culture Response of Spring Wheat (Triticum aestivum L.)* *Plant sci.* 57: 55-61
- Ogawa, T.F; Hiroyuki and Ohkawa, Y. 1994. *Introduction of Cell Division of Isolated Pollen Grains by Sugar Starvation in Rice*. *Breeding Science* Vol. 44 : 75-77 No.1
- Palmer C.E. and Keller, W.A. 1997. *Pollen Embryos*. In Sivana K.R. and V.K. Sawhney (eds) *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement* Cambridge University Press.
- Raghavan, V. 1997. *Molecular Embriology*. *Plant Molecular Biology*. Cambridge University Press. New York.
- Reddy VS; Leelavanti,S and Sen, S.K . 1985. *Influence of Genotipe and Culture Medium in Microspore Callus Induction and Green Plant Regeneration in Anthera of Oryza sativa*. *Physiol. Plant* 63: 309-314
- Reynolds, T.L. and Raghavan, V. 1982. *An Auto Radiographic Study of RNA Synthesis During Maturation and Germination of Pollen Grains of Hyosciamus niger*. *Protoplasma*.
- Suryowinoto, 1996. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press.

Tjitrosoepomo, 1996. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta) Cet. Ke-5*. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press

Toonen. M.A.J.and S.C. De Vries. 1996. *Initiation of Somatic Embryo from Single Cells in: T.L. Wang and cuming (eds) Embryogenesis : The Generation of Plant*. Bios Scientific Publishers. Pp. 173-189

Touraev, A; Indrianto, A; Wratschko, I; Vincente,O and Heberle-Bors, E. 1996. *Efficient Microspore Embriogenesis in Wheat (Triticum aestivum L) Induced by Starvation at High Temperature*. Sex Plant reprod 9: 209-215

Touraev, A; Vincente, O. and Heberle Bors, E. 1997. *Initiation of Microspore Embriogenesis by Cekaman*. Trends Plant Sci 2: 285-303.

Yu, S.M. 1999.*Update on Signal Tranduction Celluler and Benetic Responses of Plant to Sugar Starvation*. Plant physiology. 121: 687-693

Zarsky,V; Garrido, D; Rihova, L; Tupy, J; Vicente,O and Heberle-Bors, E. 1992. *Depression of the Cell Cycle by Starvation is Involved in The Induction of Tobacco Pollen Embryogenesis*. Sexual plant Reproduction 5. 189-194