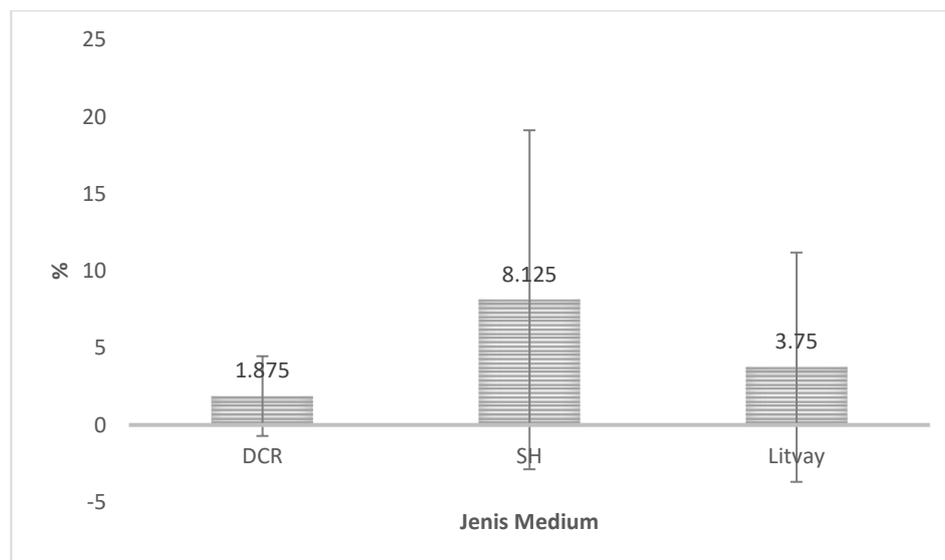


BAB IV

TEMUAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian mengenai induksi embrio somatik dari megagametofit *Pinus merkusii* dalam medium induksi dilakukan dengan mengkultur eksplan megagametofit pada 3 jenis medium, yaitu : DCR (Gupta dan Durzan, 1985), SH, dan Litvay. yang mengandung kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP masing-masing 9 μM dan 3 μM . Penggunaan kombinasi ini digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ramadani (2007) dimana induksi tertinggi didapatkan dari medium yang mengandung 9 μM 2,4-D dan 3 μM BAP.

Setelah eksplan dikultivasi dalam medium selama 8 minggu, eksplan memberikan respon induksi embriogenesis somatik seperti yang ditunjukkan pada grafik pada Gambar 4.1. Respon keberhasilan induksi embriogenesis somatik dengan nilai paling besar didapatkan dari megagametofit yang ditanam pada medium SH, yaitu dengan nilai persentase sebesar 8.12%, sedangkan respon keberhasilan induksi embriogenesis somatik dengan nilai terkecil didapatkan dari kultur megagametofit yang ditanam pada medium DCR, yaitu dengan nilai persentase sebesar 1.87%. Data primer untuk induksi embriogenesis somatik terlampir pada lampiran 3.



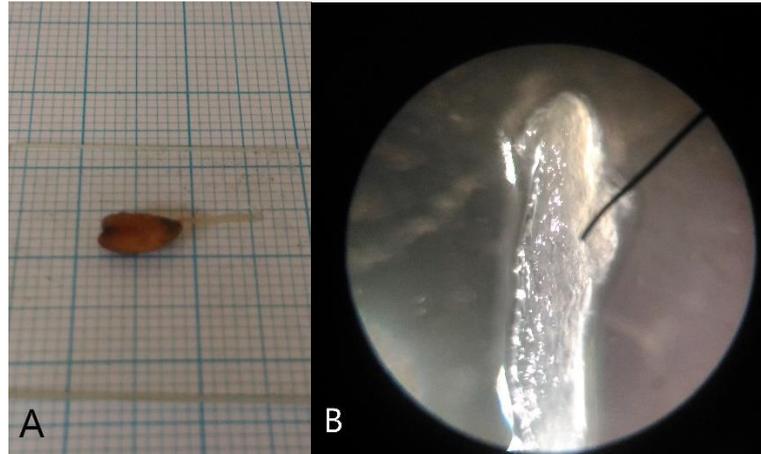
Gambar 4.1. Induksi embrio somatik *Pinus merkusii* pada 3 jenis medium setelah 8 minggu kultivasi

4.1 Keberhasilan Induksi Embrio Somatik

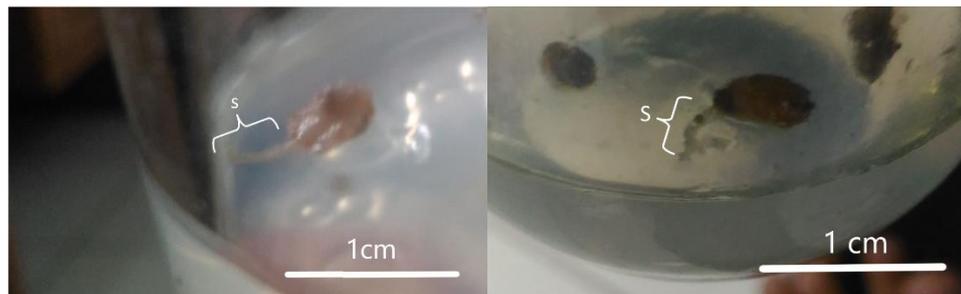
Keberhasilan induksi embriogenesis somatik pada penelitian ini didapatkan hasil paling baik pada kultur megagametofit yang ditanam pada medium SH, dengan nilai persentase sebesar 8.12%. Keberhasilan induksi dengan nilai paling kecil didapatkan dari kultur megagametofit yang ditanam pada medium DCR dengan nilai persentase sebesar 1.87% .

Keberhasilan induksi embrio somatik secara kasat mata ditandai dengan keluarnya juluran jaringan seperti benang tipis dari ujung mikropil (Gambar 4.2.). Juluran seperti benang ini merupakan suspensor dan jaringan embrio yang keluar dari megagametofit. Menurut Lelu-Walter *et al.* (1999) respons pertama megagametofit utuh yang dikultur adalah ekstrusi suspensor dan embrio dari ujung mikropilar yang merupakan kelanjutan dari proses *cleavage polyembryony*. Kemunculan suspensor membutuhkan waktu yang berbeda dari setiap eksplan yang terinduksi mulai dari 3 sampai 7 hari sejak dilakukan penanaman eksplan.

Proses induksi embrio somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor. Rikiishi *et al* (2008) mengatakan bahwa faktor yang mempengaruhi Induksi embriogenesis somatik di antaranya adalah : genotipe, kondisi kultur, medium kultur dan usia eksplan.



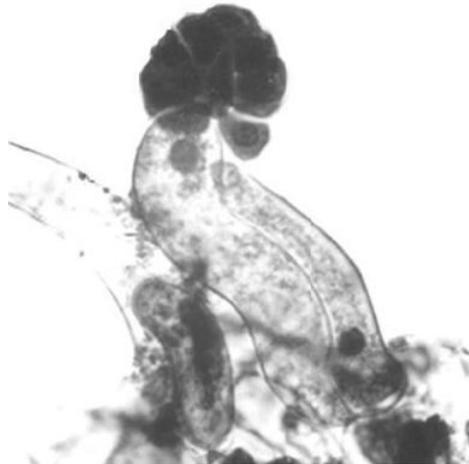
Gambar 4.2. Megagametofit yang terinduksi, ditanam pada medium SH dengan kombinasi ZPT 2,4-D 9 μ M dan BAP 3 μ M (A). Juluran suspensor dengan perbesaran 40x (B).



Gambar 4.3. Eksplan megagametofit yang terinduksi dalam medium SH

Ket :

S = suspensor



Gambar 4.4. Tahap awal pembentukan embrio somatik. Bagian apikal, sel yang kaya sitoplasma dan sel suspensor vakuolat yang tembus cahaya. (Stojičić,2007)

Menurut Brown *et al.* (1995) komponen utama pada media kultur untuk embriogenesis somatik harus menyediakan yang berikut: sumber karbon dan energi, makro dan mikronutrien anorganik dengan kalium dan zat besi EDTA, tingkat nitrogen tereduksi, senyawa organik vitamin dan asam amino, zat pengatur tumbuh seperti auksin dan sitokinin.

Karena variabel bebas pada penelitian ini hanya mencakup perbedaan jenis medium, maka dari itu komponen yang mempengaruhi perbedaan hasil keberhasilan induksi embriogenesis somatik adalah di antaranya yakni: tingkat nitrogen tereduksi makro dan mikronutrien dengan kalium dan zat besi EDTA,, dan senyawa organik vitamin dan asam amino.

4.1.1 Pengaruh Makronutrien dan Sumber Nitrogen

Dari ketiga jenis medium yang digunakan, perbedaan yang terlihat signifikan dapat dilihat dari sumber nitrogen tereduksi pada masing-masing jenis medium. Pada medium SH digunakan NH_4NO_3 sebanyak 300 mg/L (67,5 mg NH_4 , 232,5 mg NO_3) dan KNO_3 sebanyak 2500 mg/L (1534,65 mg NO_3). Pada medium DCR digunakan NH_4NO_3 sebanyak 400 mg/L (90 mg NH_4 , 310 mg NO_3), dan KNO_3 sebanyak 340 mg/L (208,71 mg NO_3). Dan pada medium Litvay digunakan

NH_4NO_3 sebanyak 1650 mg/L (371,25 mg NH_4 , 1278,75 mg NO_3), KNO_3 sebanyak 1900 mg/L (1166,33 mg NO_3), dan $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sebanyak 556 mg/L (420,39 mg NO_3). Dan juga tambahan L-glutamin sebanyak 730 mg/L (89,99 mg NH_4) pada komposisi medium DCR turut menyumbang suplai amonia yang berasal dari gugus amina. Sebagaimana yang dikatakan Kamada dan Harada (1982), asam amino tertentu seperti glutamin, dapat berfungsi sebagai sumber nitrogen tereduksi dalam media dan efektif dalam mendorong embriogenesis dalam kalus *Daucus carota*.

Ion nitrat adalah sumber nitrogen yang penting bagi sebagian besar kultur tanaman, dan hampir semua media menyediakan sebagian besar nitrogen yang tersedia dalam bentuk nitrat. Namun, begitu berada di dalam sel nitrat harus direduksi menjadi amonium sebelum digunakan secara biosintesis. Alasan untuk tidak menggunakan nitrogen dalam bentuk NH_4^+ dan menghindari penggunaan NO_3^- secara penuh terletak pada toksisitas laten ion amonium dalam konsentrasi tinggi, dan pada kebutuhan untuk mengontrol pH medium. (George *et al.*, 2008)

Sebagian besar media mengandung lebih banyak nitrat daripada ion amonium, tetapi karena media kultur jaringan tanaman biasanya tidak dilakukan penyanggaan pada pH, konsentrasi ion amonium dan nitrat yang ditetapkan mungkin lebih disebabkan oleh kontrol pH praktis, daripada kebutuhan jaringan tanaman untuk satu bentuk nitrogen atau yang lain (George *et al.*, 2008). Penyerapan nitrat hanya terjadi efektif dalam pH asam, tetapi disertai dengan ekstrusi anion dari tanaman, yang mengarah ke medium secara bertahap menjadi lebih sedikit asam. Sebaliknya, pengambilan amonium menghasilkan sel-sel yang mengekskresikan proton (H^+) ke dalam medium, membuatnya lebih asam. Pertukaran ion menjaga keseimbangan muatan jaringan dan juga dapat membantu pembuangan kelebihan proton atau ion hidroksil (OH^-) yang dihasilkan selama metabolisme (Raven, 1986).

Biasanya media kultur pada mulanya berada pada pH 5,4-5,8. Namun, dalam medium yang mengandung ion nitrat dan amonium, penyerapan amonium yang cepat ke dalam jaringan tanaman menyebabkan pH turun menjadi 4.2-4.6. Ketika ini terjadi, pengambilan amonium lebih lanjut terhambat, tetapi terjadi stimulasi

penyerapan ion nitrat, menyebabkan pH naik kembali. Oleh karena itu, dalam media yang tidak disangga, penyerapan nitrogen yang efisien dapat bergantung pada keberadaan kedua ion tersebut (George *et al.*, 2008)

Menurut Halperin dan Wetherell (1965) ketersediaan nitrogen tereduksi diperlukan untuk embriogenesis somatik dalam kultur sel dan kalus. White (1954) mengatakan bahwa adanya ion amonium pada medium biasanya cukup untuk melakukan induksi embriogenesis dalam kalus atau kultur suspensi yang mengandung NO_3^- , tetapi pada media di mana NH_4^+ dalam proporsi yang sedikit. Hal ini sesuai dengan hasil yang keberhasilan induksi yang didapatkan di mana pada medium SH didapatkan nilai persentase paling besar. Sedangkan pada medium DCR didapatkan nilai persentase keberhasilan paling kecil.

Pada hal ini, terdapat kecenderungan keberhasilan induksi embriogenesis berkaitan erat dengan selisih komposisi dari kedua zat tersebut, di mana rasio NO_3^- yang lebih besar terhadap NH_4^+ menentukan keberhasilan induksi embriogenesis somatik.

Street (1979) menganjurkan proporsi optimal NH_4^+ untuk embriogenesis adalah sekitar 10 mM (dari NH_4Cl) untuk 12-40 mM NO_3^- (dari KNO_3): yaitu: **[Rasio NO_3^- terhadap NH_4^+ , dari 55:45 hingga 80:20; Total N 22-50 mM]**

Masing-masing rasio NO_3^- terhadap NH_4^+ pada setiap medium berada pada kardar yang berbeda. Pada medium DCR **[Rasio NO_3^- ke NH_4^+ , 60,5:25; Total N 17,05 mM]**, medium SH **[Rasio NO_3^- ke NH_4^+ , 28,5:3,75; Total N 32,25]**, dan pada medium Litvay **[Rasio NO_3^- ke NH_4^+ , 39,435:20; Total N 59,435 mM]**.

Konsentrasi garam makronutrien ini juga turut berpengaruh terhadap potensi osmotik pada media kultur. Potensi osmotik dari media kultur terkait dengan konsentrasi zat terlarut, terutama yang dari makronutrien dan gula. (George *et al.*, 2008). Garam makronutrien berkontribusi besar pada potensial osmotik karena konsentrasinya pada komposisi medium yang paling besar.

Menempatkan jaringan dalam larutan dengan potensi osmotik tinggi akan menyebabkan sel menjadi plasmolisis, menyebabkan terputusnya interkoneksi sitoplasma antara sel yang berdekatan (plasmodesmata). Wetherell (1984)

mengemukakan bahwa ketika sel dan kelompok sel tanaman yang lebih tinggi diisolasi oleh proses ini, mereka menjadi memungkinkan untuk berkembang secara mandiri, dan mengekspresikan totipotensi mereka. Dia menunjukkan bahwa isolasi sel tanaman yang lebih rendah tingkat induksi regenerasinya, dan plasmolisis telah lama dikenal untuk memulai regenerasi pada alga multiseluler, daun lumut, pakis prothallia, dan *gemmae* dari lumut hati (Narayanaswami dan LaRue, 1955; Miller, 1968).

Pada medium yang digunakan pada penelitian ini, jumlah mol zat terlarut yang berasal dari garam makronutrien ada pada kadar yang berbeda. Medium DCR memiliki 0,03545 mol ion terlarut, medium SH memiliki jumlah ion terlarut sebanyak 0,06396 mol, dan medium Litvay memiliki jumlah ion terlarut sebanyak 0,0918 mol. Keberhasilan induksi terbanyak didapatkan dari eksplan yang berasal dari medium SH, hal ini diduga karena medium ini menyediakan lingkungan potensi osmotik yang sesuai untuk jaringan megagametofit *Pinus merkusii* untuk melakukan induksi embriogenesis somatik.

Potensi osmotik suatu media dapat mempengaruhi terhadap induksi embriogenesis somatik dan mengatur pemeliharaan embrio. Seperti yang akan ditunjukkan di bawah ini, potensi osmotik rendah sering kali bersifat menguntungkan, tetapi ini tidak selalu terjadi. Misalnya kotiledon muda *Glycine max* menghasilkan embrio somatik pada medium L2 yang mengandung sukrosa kurang dari 2%, tetapi tidak jika konsentrasi gula meningkat di atas level ini (Lippmann dan Lippmann, 1984). Kalus yang berasal dari hipokotil *Albizia richardiana*, menghasilkan jumlah terbesar tunas adventif pada media B5 yang mengandung sukrosa 4%, tetapi embrio somatik tumbuh paling mudah ketika sukrosa 2% ditambahkan. (Tomar dan Gupta, 1988).

Ćulafić *et al.* (1987) dengan kalus dari tunas aksila *Rumex acetosella*: tunas adventif diproduksi pada media yang mengandung garam MS dan sukrosa 2%, tetapi embriogenesis terjadi ketika konsentrasi sukrosa ditingkatkan menjadi 6% atau jika medianya dilengkapi dengan sukrosa 2% ditambah 21,3 g/l mannitol atau sorbitol (yang bersama-sama memiliki osmolalitas yang sama dengan 6% sukrosa).

Potensi osmotik yang rendah (sangat negatif) membantu menginduksi embriogenesis somatik pada beberapa tanaman lain. Menambahkan 10-30 g / l sorbitol ke dalam media L-6 (total ion makronutrient 64,26 mM; sukrosa 20 g / l), menyebabkan ada tingkat embriogenesis yang tinggi dalam suspensi *Vigna aconitifolia* dan kapasitas embriogenesis untuk dipertahankan dalam kultur jangka panjang. Pembentukan embrio somatik dalam kalus ovarium *Fuchsia hybrida* dipercepat dengan menambahkan sukrosa 5% ke media B5, dan induksi kalus embriogenik *Euphorbia longan* membutuhkan kultur *leaflet* muda pada media B5 dengan 6% sukrosa (Litz, 1988).

Terdapat pengecualian, khususnya yang berkaitan dengan pertumbuhan embrio. Proporsi pucuk embrio somatik *Ipomoea batatas* membentuk pucuk paling besar ketika media yang mengandung MS anorganik mengandung 1,6%, dari pada medium yang mengandung 3% sukrosa (Chee *et al.*, 1990). Proliferasi anggrek paling cepat ketika jaringan dikultur dalam sukrosa konsentrasi tinggi, tetapi untuk pertumbuhan planlet, tingkat sukrosa harus dikurangi (Homès dan Vanseveran-Van Espen, 1973).

Ho dan Vasil (1983) menggunakan sukrosa 6-10% dalam media MS untuk menaikkan pembentukan proembrio dari daun muda *Saccharum officinarum*. Namun, dalam percobaan Ahloowalia dan Maretski (1983), pembentukan embrio somatik dari kalus tanaman ini paling baik pada media MS dengan sukrosa 3%, tetapi pertumbuhan embrio menjadi planlet lengkap mensyaratkan bahwa embrio harus dikultur terlebih dahulu pada media MS dengan sukrosa 6% dan kemudian pada MS dengan Sukrosa 3%.

4.1.2 Pengaruh Mikronutrien FeEDTA dan Kalium

Wang *et al* (1980) menunjukkan embriogenesis dapat diinduksi paling efektif pada kalus yang berasal dari antera *Hevea brasiliensis*, dengan menggandakan konsentrasi unsur mikro dalam medium MS (Tabel 4.3. terlampir pada lampiran 2) , sementara pada saat yang sama mengurangi tingkat makronutrien menjadi 60-80% dari yang asli. Dari ketiga jenis medium yang digunakan, medium DCR memiliki

jumlah mikronutrien dengan angka yang mendekati jumlah dua kali mikronutrien pada medium MS.

Penggunaan mikronutrien dalam konsentrasi yang sangat tinggi seperti pada medium Litvay *et al.*, (1981), di mana Mg, B, Zn, Mo, Co dan I masing-masing 5 kali konsentrasi mikro MS, dan Mn dan Cu masing-masing 1,25 dan 20 kali berpengaruh pada peningkatan induksi dan pemeliharaan kalus dan pertumbuhan suspensi sel organ remaja dan dewasa dari kedua Douglas fir dan pinus loblolly. (Verma *et al.*, 1982). Hal ini bisa menjelaskan hasil repon pembentukan kalus yang didapatkan (tabel 4.4.), dimana hasil dengan persentase pembentukan kalus terbesar berasal dari medium Litvay.

Penelitian lain yang menggunakan mikronutrien tingkat tinggi adalah Barwale *et al.*, (1986) yang dengan menambahkan empat kali konsentrasi normal garam minor ke media MS mendorong induksi tunas adventif dari kalus 54 genotipe *Glycine max*.

Pada proses induksi embriogenesis somatik efek kumulatif dari mikronutrien dan makronutrien memiliki peran dalam mempengaruhi tingkat auksin endogen (Dhananjay *et al.*, 2012) beberapa unsur mikronutrien telah ditemukan perannya dalam proses induksi embriogenesis somatik.

Penambahan zinc mampu meningkatkan induksi embriogenesis somatik dan pertumbuhan akar pada *Manihot esculenta*. (C.J.J.M Raemakers, komunikasi pribadi. dalam George *et al.*, 2008). Namun, konsentrasi zinc yang sangat tinggi ternyata bersifat menghambat. Terdapat keterkaitan antara zinc pada nutrisi tanaman dan kandungan auksinnya (Skoog, 1940). Telah dikemukakan bahwa zinc adalah komponen dari enzim yang berkaitan dengan sintesis triptofan yang merupakan prekursor IAA (Tsui, 1948).

Boron mempengaruhi perkembangan suspensor embrio somatik dalam *Larix deciduas* (Behrendt & Zoglauer, 1996). Pada *Daucus carota*, boron mengubah perkembangan embrio: pengembangan akar didukung pada konsentrasi rendah dan pengembangan pucuk pada tinggi. Kondisi ini terdapat kecocokan dengan rasio

auksin-sitokinin yang tinggi dan rendah, berturut-turut (Mashayekhi & Neumann, 2006).

Pasternak *et al.* (2002) membuktikan bahwa pemberian perlakuan Fe sebagai asam etilenadiaminetetraasetat-besi (FeEDTA) ($1 \times 10^{-3}M$) dalam percobaan mereka dengan sel turunan protoplas daun alfalfa menghasilkan perkembangan yang sama morfologi sel seperti dalam kasus medium dengan 2,4-D ($10 \mu M$). Dalam hal ini membuktikan bahwa reaksi stres terlibat dalam proses SE. Pemberian Fe-EDTA meningkatkan aktivitas askorbat peroksidase (AP), pemecah H_2O_2 , menunjukkan respon stres oksidatif dalam sel.

Hasil yang sama diperoleh dari agen penginduksi stres oksidatif lainnya seperti tembaga, menadione, paraquat atau alloxan; pengaplikasian pada konsentrasi *non-lethal*, agen ini tampaknya mendorong pembelahan sel dan pembentukan sel embriogenik dalam kondisi non-embriogenik (Ötvös *et al.* 2005). Mereka mendalilkan bahwa aktivasi paralel daripada auksin dan pensinyalan stres dapat menjadi peristiwa kunci dalam adaptasi seluler, pemrograman ulang pola ekspresi gen, metabolisme dan fisiologi seluler, menghasilkan totipotensi dan perolehan kompetensi embriogenik sel somatik tanaman.

Besi adalah unsur kecil yang penting karena mengaktifkan beberapa oksidase dan diperlukan untuk pertumbuhan tanaman hijau (Gibbs, 1974). Unsur ini memainkan peran penting dalam metabolisme tanaman dan selanjutnya dibutuhkan oleh sel untuk membelah dan menghasilkan embrioid somatik multiseluler (Evans *et al.*, 1981). Unsur ini juga merupakan komponen dari beberapa enzim penting (ferredoxin, pyrocatechase, metapyrocatechase, sitokrom oksidase, sitokrom C, peroksidase, dan katalase). Gauch (1973) melaporkan bahwa penurunan konsentrasi besi menyebabkan penurunan aktivitas katalase. He *et al.* (1991) mengamati bahwa penghilangan zat besi dari media kultur menyebabkan penurunan nyata dalam hasil dan pembentukan tunas yang buruk pada kalus embriogenik gandum. Dengan tidak adanya zat besi, frekuensi induksi kalus embriogenik dari scutellum hanya 12%, sementara itu didapatkan 80% keberhasilan pada media yang mengandung zat besi. Mereka menyarankan bahwa zat besi memainkan peran

penting dalam pembentukan kalus embriogenik gandum (*Triticum aestivum* L.). Zat besi penting dalam embriogenesis dan juga diamati pada kultur anthera *Nicotiana tabacum* di mana tidak adanya penambahan zat besi dalam medium mampu menekan androgenesis. Loh dan Lim (1992) melaporkan bahwa Fe kemungkinan menjadi faktor pengendali untuk pengembangan embriogenesis kultur *B. napus*. Mereka menunjukkan bahwa embriogenesis sekunder secara signifikan ditekan ketika konsentrasi garam FeEDTA dalam medium MS berkurang. Dalam medium tanpa zat besi, embriogenesis sekunder benar-benar ditekan dan kultur eksplan tampaknya mengalami etolasi. Embriogenesis sekunder dapat diperoleh kembali setelah pemindahan media MS dengan garam besi proporsi penuh. Mihaljevic *et al.* (2002) mengamati bahwa peningkatan konsentrasi zat besi dalam media MS atau dalam media B5 meningkatkan pertumbuhan embrio *Taxus baccata* L. Bertentangan dengan hasil ini, Oswald *et al.* (2006) menemukan bahwa tingkat zat besi yang tinggi mendorong lebih banyak pertumbuhan kalus tetapi menekan frekuensi pembentukan embrio somatik dalam kacang kedelai (*Glycine max* (L.) Merr. Cv. Bragg).

Niedz dan Evens (2008) mengamati bahwa nutrisi K^+ merupakan regulator penting untuk pertumbuhan kalus embriogenik jeruk manis (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Para peneliti sebelumnya telah mengamati bahwa kalium mendukung induksi embriogenesis somatik dari *Asparagus cooperi* (Sosh & Sen, 1991) dan *Medicago sativa* (Shetty & McKersie, 1993). Banyak protein menunjukkan spesifisitas tinggi untuk kalium yang bertindak sebagai kofaktor, mengubah konfigurasi mereka sehingga mereka menjadi enzim aktif. Ion kalium juga menetralkan anion organik yang diproduksi di sitoplasma, sehingga menstabilkan pH dan potensi osmotik sel. Pada seluruh tanaman, defisiensi kalium menyebabkan hilangnya turgor sel, jaringan lemah dan meningkatnya kerentanan terhadap kekeringan, salinitas, kerusakan akibat suhu dingin, dan serangan jamur. (George, 2008)

4.1.3 Pengaruh penggunaan asam amino dan vitamin

Pada penelitian ini, penggunaan asam amino hanya diberikan pada jenis medium DCR, berupa L-Glycin 2 mg/L dan L-Glutamin sebanyak 730 mg/L. Untuk perlakuan jenis medium SH dan Litvay tidak diberikan asam amino sama sekali.

Menurut George *et al.* (2008) Asam amino dapat ditambahkan ke media tanam untuk memenuhi kebutuhan nitrogen tereduksi pada kultur, tetapi karena harganya mahal untuk dibeli, asam amino hanya akan digunakan dalam media untuk kebutuhan propagasi massal di mana ini menghasilkan hasil yang lebih baik. Untuk sebagian besar tujuan kultur jaringan, penambahan asam amino mungkin tidak diperlukan, menyediakan ion nitrat dan amonium yang memadai, dan proporsi yang tepat pada media sudah cukup untuk memenuhi kebutuhan.

Asam amino juga dapat menyediakan nitrogen tereduksi dalam media kultur menggantikan NH_4^+ dan sebagai suplemen untuk NO_3^- . Namun biasanya digunakan sebagai tambahan kecil untuk media yang mengandung NH_4^+ dan NO_3^- . Penyerapan asam amino ke dalam jaringan yang dikultur menyebabkan penurunan pH medium, sama halnya ketika ketika ion NH_4^+ diserap. George *et al.* (2008)

Pertimbangan variasi kebutuhan vitamin, disesuaikan dengan sifat tanaman dan jenis kultur (George *et al.*, 2008). Dari sekian banyak vitamin ditambahkan ke formulasi media kultur sel tanaman, hanya myo-inositol dan tiamin yang dianggap penting untuk meningkatkan pertumbuhan kalus atau induksi morfogenesis (Rayns & Fowler, 1993). Namun, myo-inositol lebih terkait dengan proliferasi sel dan tiamin dengan proses morfogenesis.

Pada penelitiannya, Gupta *et al.* (1988) menemukan bahwa penambahan 5g / L myo-inositol ke media DCR-1 (Gupta dan Durzan,1985) bersifat essensial untuk menginduksi embriogenesis (embrional massa suspensor) dari jaringan gametofit betina *Pseudotsuga menziesii* dan *Pinus taeda*. Konsentrasi yang diperlukan tampaknya tidak cukup untuk bertindak sebagai stimulus osmotik. Myo- Inositol mengurangi tingkat proliferasi pada kultur pucuk *Euphorbia fulgens* (Zhang *et al.*, 1986).

Pada beberapa spesies, tiamin ditemukan penting untuk induksi kalus embriogenik atau untuk meningkatkan frekuensi embrio somatik (George *et al.*,

2008). Rasio tiamin yang digunakan pada medium DCR : SH : Litvay adalah 10 : 50 : 1. Konsentrasi tiamin yang lebih tinggi dalam formulasi SH dapat menjelaskan respon embriogenik yang lebih tinggi yang diperoleh.

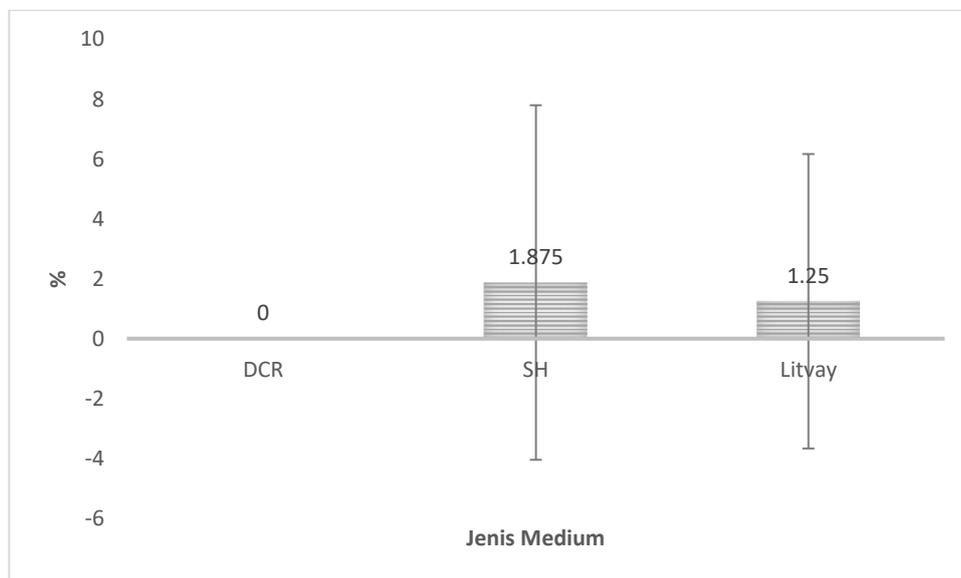
Diperkirakan terdapat interaksi antara tiamin dan ZPT, khususnya kelompok sitokinin. Digby dan Skoog (1966) menemukan bahwa kultur kalus normal tembakau menghasilkan kadar tiamin yang memadai untuk mendukung pertumbuhan pada pemberian kinetin yang relatif tinggi (sekitar 1 mg / l), tetapi jaringan gagal tumbuh ketika dipindahkan ke medium dengan kurang menambahkan kinetin kecuali tiamin diberikan.

Media MS mengandung thiamine 0,3 μ M. Kandungan thiamine sebanyak ini mungkin tidak cukup untuk mendapatkan hasil yang optimal dari beberapa kultur diilustrasikan oleh hasil Barwale *et al.* (1986): meningkatkan konsentrasi tiamin-HCl dalam medium MS hingga 5 μ M, meningkatkan frekuensi dimana embrio zigotik *Glycine max* membentuk embrio somatik dari 33% menjadi 58%. Menambahkan 30 μ M asam nikotinat (biasanya 4 μ M) meningkatkan terjadinya embriogenesis lebih jauh lagi menjadi 76%. Tiamin ditemukan penting untuk merangsang induksi kalus embriogenik di *Zoysia japonica* (Asano *et al.*, 1996).

Zat pengatur tumbuh turut berpengaruh terhadap keberhasilan induksi embrio somatik, mengingat zat pengatur tumbuh endogen pada setiap eksplan ada dalam kadar yang berbeda. Sharp *et al.*, (1980) menyatakan bahwa auksin diperlukan untuk menginduksi penentuan embriogenik dalam proporsi sel dalam kultur kalus atau suspensi, tetapi pada saat yang sama menyebabkan sel-sel yang diinduksi ini untuk menghentikan perkembangan lebih lanjut menjadi embrio. Disarankan bahwa pembelahan sel pro-embriogenik dan perkembangannya menjadi embrio hanya dilanjutkan pada konsentrasi auksin yang lebih rendah. Namun, ada banyak pengecualian yang dicatat untuk pengamatan umum ini, di mana embrio somatik diinduksi bahkan dalam kultur yang tumbuh di media tanpa auksin. Ada kemungkinan bahwa dalam hal ini, embriogenesis telah diinduksi oleh auksin endogen, yang konsentrasinya kemudian dikurangi oleh metabolisme untuk memungkinkan pembentukan embrio.

4.2 Prolirerasi Embrio Somatik

Pada penelitian ini, kultur megagametofit terinduksi yang berhasil melakukan proliferasi hanya sejumlah 5 eksplan atau 22,7% dari total keseluruhan megagametofi yang terinduksi. Keberhasilan proliferasi dengan nilai paling baik didapat dari kultur megagametofit yang ditanam pada medium SH, dengan nilai persentase 1,87%. Pada kultur megagametofit yang ditanam pada medium Litvay didapatkan nilai keberhasilan proliferasi sebesar 1,25%. Pada medium DCR tidak ditemukan keberhasilan proses proliferasi. Data primer untuk proliferasi embriogenesis somatik terlampir pada lampiran 4.



Gambar 4.5. Proliferasi embrio somatik *Pinus merkusii* pada 3 jenis medium setelah 8 minggu kultivasi

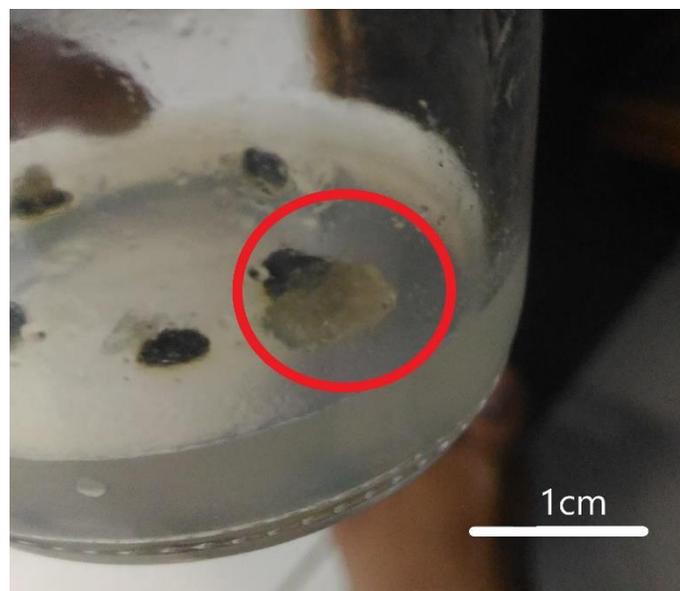
Proliferasi embrio smpatik secara kasat mata ditandai dengan tumbuhnya kalus embrionik pada bagian daerah ujung mikropil eksplan (Gambar 4.6.)

Menurut Stojičić (2007), Media yang digunakan untuk pemeliharaan proliferasi jaringan embriogenik pada sebagian besar penelitian sama dengan medium yang digunakan pada tahap induksi. Akan tetapi terjadi pemberhentian perkembangan

lebih lanjut dari eksplan yang sudah terinduksi, sehingga persentase keberhasilan respon proliferasi embrio somatik yang didapatkan ada pada angka yang rendah.

Berhentinya perkembangan embrio dipengaruhi beberapa faktor, salah satunya adalah konsentrasi zat pengatur tumbuh. Menurut George *et al* (2008) embrio somatik pada umumnya diinduksi pada media dengan kadar auksin yang tinggi (terutama 2,4-D) tetapi embrio tidak melakukan perkembangan lebih lanjut kecuali dilakukan pengurangan konsentrasi ZPT. Pada *Pinus holdingreichii*, untuk pembentukan dan proliferasi jaringan embriogenik, perlu untuk memindahkan eksplan ke media dengan penurunan tingkat regulator pertumbuhan. Hasil yang sama juga dilaporkan untuk *P. elliottii* (Jain *et al.*, 1989).

Faktor lain yang menghambat perkembangan jaringan embrio adalah zat fenolik yang ada pada medium. Pemindahan eksplan ke dalam media baru bertujuan untuk menghindarkan jaringan embrio yang sudah terbentuk dari senyawa fenolik yang diproduksi selama proses kultivasi. Youssief (2009) mengatakan Subkultur yang berkala ke media segar juga dapat membantu sehingga senyawa fenolik toksik tidak menghambat aktivitas ZPT pada jaringan.



Gambar 4.6. Proliferasi embrionik dari megagametofit dari medium Litvay..

Senyawa fenolik adalah zat tanaman yang pada umumnya memiliki cincin aromatik yang mengandung satu atau lebih gugus hidroksil (Harborne 1998). Senyawa ini biasanya dipandang sebagai senyawa berbahaya selama kultur in vitro, karena eksudat dan oksidasinya secara negatif mempengaruhi eksplan, menyebabkan kecoklatan dan nekrosis (Warrag *et al.* 1990) Produksi senyawa fenolik dalam jaringan tanaman tergantung pada banyak faktor eksternal dan internal, seperti intensitas cahaya, suhu, pengatur pertumbuhan, dan kandungan mineral dan gula dalam medium, dan juga tergantung pada tahap perkembangan kultur (Ptak *et al.* 2013).

Penumpukan senyawa fenol menyebabkan *browning* enzimatik pada eksplan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.7. *Browning* juga dapat terjadi karena stimulasi kimia atau jika lingkungan eksplan menyediakan bahan kimia yang mendorong pembentukan senyawa fenolik, seperti, konsentrasi tinggi auksin dalam medium. (Pancaningtyas, 2015). Hal ini menjelaskan bahwa pemindahan secara berkala ke dalam medium baru bukan hanya bertujuan untuk menghindari jaringan embrio yang sudah terbentuk dari senyawa fenolik yang diproduksi, tapi juga untuk memberikan kondisi lingkungan baru pada jaringan embrio dengan konsentrasi ZPT yang sesuai.



Gambar 4.7. Kultur megagametofit dari medium Litvay yang mengalami *browning*.

Penanggulangan *browning* pada jaringan khususnya pada eksplan yang baru diisolasi dan pada media tumbuh yang digunakan, menurut George dan Sherrington (1984) seringkali dilakukan dengan menggunakan salah satu cara dari beberapa pendekatan, yaitu: (1) Menghilangkan senyawa fenol, (2) Modifikasi potensial redoks, (3) Penghambatan aktivasi enzim fenol oksidase, dan (4) Penurunan aktivitas fenolase dan ketersediaan substrat.

Hutami (2008) mengatakan, bahwa ekstraksi enzim dari tanaman aktif sering dihambat oleh adanya polifenol atau tanin. Berbagai metode untuk menghindari pembentukan fenol telah dilakukan, dan yang paling umum adalah dengan memindahkan eksplan ke dalam media yang baru. Tetapi peningkatan jumlah subkultur seringkali menyebabkan akumulasi mutasi sel-sel dan menyebabkan hilangnya sel yang efektif untuk membentuk embriogenesis. Maka dari itu, penambahan berbagai senyawa (khususnya protein, amida, dan poliamida) pada medium agar bereaksi dengan fenol, dapat memulihkan kembali aktivitas enzim. Inhibitor fenolat dapat dihindari dengan cara menambahkan arang aktif ke dalam

media kultur (Hutami 2006). Arang aktif menghilangkan noda dengan menyerap dan mengoksidasi fenol dan menginaktifkan peroksidase.

Beberapa penelitian sebelumnya membuktikan keefektifan arang aktif dalam mengurangi pencoklatan. Diantaranya pada eksplan palem dan kultur media (Tisserat, 1979), media pertumbuhan tunas *Strelitzia regnae* dan *Anemone aronaria* (Mensuali-Sodi *et al.*, 1993), dan pada medium pertumbuhan dan eksplan jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) (Aliyu dan Mashood, 2005)

Kecenderungan senyawa menjadi teroksidasi atau tereduksi tergantung pada potensial oksidasi-reduksi (redoks) dari suatu larutan. Senyawa pereduksi yang redoks potensialnya rendah seperti asam askorbat sangat efektif untuk menghindari pencoklatan dari isolasi jaringan tanaman atau ekstrak tanaman dan sering diasumsikan bahwa hal tersebut menghambat oksidasi fenol (George dan Sherrington 1984).

Senyawa penkhelat/pengikat mempunyai kemampuan untuk mengganggu aktivitas enzim peroksida. Weinstein *et al.*, 1951 dalam George dan Sherrington (1984) menemukan bahwa EDTA dapat menghambat aktivitas polifenol oksidase pada daun bunga matahari yang dikulturkan secara *in vitro*, dan disimpulkan bahwa senyawa khelat menghilangkan metal esensial untuk aktivitas enzim oksidase. NaFeEDTA dan EDTA keduanya dapat menghilangkan penghitaman pada tunas pucuk *Carex* dan Simth (1968) menyatakan bahwa hal tersebut terjadi karena pengikatan tembaga yang dibutuhkan dalam pembentukan enzim fenolase. Beberapa reaksi oksidatif juga dikatalisir secara biokimia oleh ion-ion seperti Cu^{++} , Co^{++} , dan Zn^{++} .

Pengurangan aktivitas enzim spesifik atau pengurangan substrat untuk oksidasi dapat mengurangi tingkat oksidasi fenol. Aktivitas oksidasi polifenol tertinggi pada pH 6,5 dan menurun pada pH lebih rendah (Ichihashi dan Kako 1977 dalam George dan Sherrington 1984). Perendaman eksplan pada campuran asam askorbat dan asam sitrat tidak hanya mengekspose eksplan pada senyawa reduksi tetapi juga pada pH rendah.

Wu dan Toit (2004) melaporkan bahwa pengurangan *oxydative browning* terbaik adalah dengan mengaduk eksplan selama 1 jam dalam larutan anti oksidan yang mengandung asam askorbat 100 mg/l dan asam sitrat 1500 mg/l sebelum ditanam dalam medium. Kombinasi perlakuan tersebut dengan fotoperiodisitas 16 jam, mampu menghasilkan pertumbuhan tunas hingga 100%.

Faktor lain yang menghambat terjadinya proses proliferasi dari embrio somatik pada penelitian ini adalah karena pemilihan eksplan yang terlalu matang. Menurut Bozhkov *et al.*, (1997) bahwa pada sebagian besar spesies seperti *Pinus* yang memiliki pembelahan polyembryony, kultur embriogenik dimulai dari embrio zygotik yang belum matang sebelum perkembangan kotiledon. Hal ini berkaitan dengan proses *cleavage polyembryony* yang hanya terjadi pada fase embriogeni awal. ESM terbentuk secara *in vitro* sebagai hasil dari kelanjutan dari proses pembelahan yang diinduksi dalam zigot.

Menurut Klimaszewska (2007) Penelitian yang dilakukan selama dua dekade terakhir telah terbukti bahwa SE dalam *Pinus* diinduksi paling efisien dari embrio zygotik yang belum matang. Ada kemajuan yang terbatas jika memulai SE dari benih dewasa atau dari pohon-pohon usia selektif pada *P. Taeda*. Sejauh ini, frekuensi inisiasi yang dilaporkan untuk eksplan benih matang terlalu rendah untuk aplikasi praktis. Masalah potensial pada SE pinus disebabkan oleh poliembrioni. Embrio muda dalam jumlah ganda dalam benih yang sedang berkembang menjadi keistimewaan untuk semua spesies *Pinus* (Singh 1978). Poliembrioni secara sederhana adalah pembuahan lebih dari satu telur (archegonium) per biji.

Poliembrioni penting karena eksplan yang paling sering digunakan untuk menginisiasi SE pada spesies *Pinus* adalah megagametofit utuh yang belum matang pada tahap pengembangan benih yang tepat ketika beberapa embrio zygotik hidup, dan embrio somatik ini berasal dari embrio zygotik tersebut. Tahap awal pengembangan benih ini ada pada 3-6 minggu paska pembuahan, ketika embrio zygotik yang dominan berada pada tahap perkembangan *precotyledonary* (Becwar *et al.*, 1990).

Proses pematangan eksplan bisa terjadi selama proses kultivasi. Sesuai dengan pernyataan Yang *et al.*, (2013) yang menyebutkan bahwa media dengan penggunaan agen pematat dapat menyebabkan proses pematangan pada eksplan. Pemberian 0,1 mg L⁻¹ 6-benzyladenine (BA) efektif untuk konversi tanaman; tingkat konversi tanaman adalah 43,3% pada embrio somatik dari kultur padat dan 36,5% dalam embrio dari kultur cair.