

# **INDUKSI EMBRIOGENESIS MIKROSPORA *Nicotiana tabacum* L. cv. Vorstenlanden DENGAN STRES PANAS DAN PELAPARAN**

INDUCTION OF MICROSPORE EMBRYOGENESIS IN *Nicotiana tabacum* L. cv. Vorstenlanden WITH HEAT SHOCK AND STARVATION STRESS

**Zuchrotus Salamah**

FKIP Program Studi P. Biologi Universitas Ahmad Dahlan

Jl. Prof. Dr. Soepomo , Yogyakarta

## **Abstract**

The aims of this research is to know the effect of heat shock 34<sup>0</sup> C and starvation of the tobacco, *Nicotiana tabacum* L. cv. Vorstenlanden microspore. Isolated microspore subjected to stress by culturing in starvation B medium and incubated at 34<sup>0</sup> C for 7 days in dark. After 7 days in starvation medium the microspore were subcultured to the embriogenesis medium (A2 medium), incubated in dark during 4 weeks at 25<sup>0</sup> C. Result showed that late uninucleat microspore was found in the bud with flower crown size (9–10) mm with precentage of 69%. After stres cytoplasm of the microspore morfologically change, showed star like (tipe-3) 21% . Multicellular microspore was found in the embriogenesis medium at 4% in the cv Vorstenlanden.

**Keywords: microspore, embriogenesis, *Nicotiana tabacum* L. cv. Vorstenlanden, heat shock and starvation stress**

## **PENDAHULUAN**

Embriogenesis mikrospora atau disebut juga dengan androgenesis merupakan salah satu alternatif untuk memperoleh tanaman haploid dengan menggunakan mikrospora sebagai sumber eksplan. Mikrospora adalah bentuk awal dari sel kelamin jantan (haploid) pada tumbuhan berbunga. Pada tahap awal perkembangan normal gametofit tanaman berbunga, mikrospora telah diprogram untuk berdiferensiasi menjadi pollen atau serbuk sari. Dengan pemberian perlakuan khusus mikrospora dapat dihambat perkembangan gametofitnya dan dibelokkan ke arah perkembangan sporofitik.

[Http://Jurnal.unimus.ac.id](http://Jurnal.unimus.ac.id)

Faktor lingkungan dapat berperan sebagai penyebab stres pada kultur *in-vitro*. Stres dapat diberikan pada tingkat sel, jaringan, organ ataupun individu. Mikrospora yang diperlakukan dengan stres akan berusaha untuk mempertahankan diri dengan cara melakukan metabolisme zat-zat yang diperlukan agar tetap hidup. Stres secara fisiologis dapat menginduksi pembentukan/produksi suatu set protein yang sama sekali baru, protein ini berperan penting dalam metabolisme.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk : menentukan stadium perkembangan mikrospora tembakau *Nicotiana tabacum* L cv Vorstenlanden, mengetahui perubahan mikrospora dalam medium pelaparan dan mengetahui perkembangan mikrospora dalam medium embriogenesis.

### METODE PENELITIAN

Penelitian ini dibagi menjadi empat tahap yaitu : (1) penanaman tembakau; (2) penetapan stadium perkembangan mikrospora; (3) pemberian praperlakuan stres terhadap mikrospora; (4) pemindahan mikrospora setelah pemberian praperlakuan stres ke medium A2.

*Nicotiana tabacum* L cv Vorstenlanden bibitnya diperoleh dari Klaten Penetapan stadium perkembangan mikrospora dilakukan dengan cara mengukur panjang mahkota bunga pada kuncup bunga tembakau *Vorstenlanden* antara 8-11 mm, kemudian mikrospora yang terdapat dalam anthera pada ukuran mahkota yang berbeda diisolasi dan dicat menggunakan DAPI. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop inverted.

Praperlakuan stres panas 34<sup>0</sup>C dan pelaparan dalam medium B (Kyo & Harada) diberikan terhadap mikrospora selama 7 hari. Setelah 7 hari dalam medium B dan suhu 34<sup>0</sup>C, selanjutnya disub kultur ke dalam medium A2 (Indrianto *et.al*, 2001) dan diinkubasi dalam gelap pada suhu 25<sup>0</sup>C selama 4 minggu. Pengamatan sitologi dengan pengecatan DAPI.

Data yang diperoleh adalah data stadium perkembangan mikrospora pada berbagai ukuran kuncup, perkembangan dari mikrospora yang telah diberi praperlakuan stres panas suhu 34<sup>0</sup>C dan pelaparan dalam medium B selama 7 hari ; perkembangan

mikrospora dalam medium A2 umur 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu. Semua data yang diperoleh akan dianalisa secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penetapan Stadium Perkembangan Mikrospora

Kuncup bunga *Nicotiana tabacum* L cv Vorstenlanden memiliki bentuk membulat, ujung kelopak bunga membuka sehingga antara kelopak dan mahkota bunga tampak lebih longgar sebelum bunga itu mekar.

Penetapan stadium mikrospora pada berbagai ukuran kuncup bunga dapat dilihat pada Tabel 1 sebagai berikut :

**Tabel 1.** Stadium perkembangan mikrospora *Nicotiana tabacum* L cv Vorstenlanden pada berbagai ukuran mahkota bunga. Dilakukan pengecatan dengan DAPI dan diamati dengan mikroskop fluoresen. Persentase rata-rata dihitung paling sedikit 300 mikrospora (5 kali ulangan)

Ukuran (mm)	Stadium Perkembangan (%)		
	Uninukleat awal-tengah	Uninukleat akhir	Binukleat
7 – 8	77,15 ± 2,31	22,90 ± 2,36	-
8 – 9	54,26 ± 1,31	44,68 ± 1,46	1,06 ± 0,50
9 – 10	27,24 ± 1,02	69,00 ± 0,74	3,76 ± 0,67
10 – 11	18,11 ± 1,42	47,96 ± 2,92	33,33 ± 3,31

Dari tabel di atas terlihat adanya korelasi positif antara panjang mahkota bunga dengan stadium perkembangan mikrospora. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya terhadap mikrospora segar tanpa dilakukan pengecatan dapat diketahui ada tidaknya vakuola. Sedangkan pengamatan dengan menggunakan mikroskop fluoresen terhadap mikrospora setelah dicat dengan DAPI dapat terlihat posisi inti dengan jelas. *Uninukleat* awal – tengah ditandai dengan bentuk mikrospora yang bulat, inti di tengah dan tanpa vakuola atau mulai terbentuk vakuola kecil-kecil. *Uninukleat* akhir ditandai dengan terbentuknya vakuola dan inti terlihat berada di tepi. Sedangkan pollen binukleat berbentuk bulat, ukuran bertambah besar, mempunyai 2 inti, telah terjadi pembentukan tepung, vakuola menghilang.

Pada tembakau fase yang paling baik untuk diinduksi adalah fase late-uninukleat. Touraev *et.al* (1996) menyatakan bahwa mikrospora uninukleat akhir dapat diinduksi untuk membentuk embrio dalam waktu yang lebih singkat dari pada menggunakan pollen binukleat. Hal tersebut karena ekspresi gen khusus gamet dimulai setelah pembelahan mitosis pertama yaitu saat mikrospora membelah asimetri. Pembelahan mitosis pertama pada mikrospora merupakan kunci keberhasilan utama dalam perkembangan pollen.

Pada *Nicotiana tabacum* L. cv Vorstenlanden uninukleat akhir terbanyak dijumpai dalam kuncup bunga dengan mahkota berukuran 9-10 mm, yaitu mencapai 69,00 %. Pada ukuran mahkota bunga 9-10 mm yang masih ada pada tanamannya diberi tanda dan diamati setelah tujuh hari mengalami perkembangan gametofitik secara *in-vivo*. Setelah tujuh hari ternyata bunga sudah mekar dan mikrospora sudah menjadi pollen masak yang siap untuk membuahi.

### Perkembangan Mikrospora Selama stres

Indrianto (2001) menyatakan bahwa bentuk-bentuk mikrospora yang terlihat dalam populasi mikrospora gandum setelah diberi praperlakuan stres panas dan pelaparan memperlihatkan tiga tipe mikrospora embriogenik, yaitu : **Tipe 1**, mikrospora dengan vakuola sentral besar dan inti terletak di tepi. Mikrospora ini identik dengan stadium perkembangan *late* uninukleat. **Tipe 2**, mikrospora telah terjadi fragmentasi vakuola dan terbentuk kantung sitoplasma, inti terletak di tepi. **Tipe 3**, mikrospora berbentuk seperti bintang (*star like*) dengan posisi inti di tengah. Karena ada kemiripan antara mikrospora gandum dan mikrospora tembakau maka kemungkinan mikrospora tipe 3 akan berkembang menjadi struktur multiseluler. Mikrospora yang diberi praperlakuan stres panas 34<sup>0</sup>C dan pelaparan selama 7 hari hasilnya pada Tabel 2.

Tabel.2. Viabilitas dan tipe Mikrospora Embriogenik tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) setelah diisolasi (mikrospora segar) dan setelah praperlakuan stres panas suhu 34°C dan pelaparan selama 7 hari, persentase rata-rata viabilitas mikrospora dihitung dari  $\pm 300$  mikrospora dengan 5 kali ulangan

	Praperlakuan	Viabilitas (%)	Mikrospora embriogenik (%)		
			T-1	T-2	T-3
Vorst	Mikrosp. segar	81,17 $\pm$ 0,97	-	-	-
	Stress 7 hari	54,93 $\pm$ 0,42	10,77 $\pm$ 1,06	22,87 $\pm$ 1,07	21,49 $\pm$ 0,27

Pada *Nicotiana tabacum* L cv vorstenlanden mikrospora yang viabel mencapai 54,93 % dengan tipe mikrospora embriogenik terbanyak pada tipe 2 yaitu 22,87 % sedangkan tipe 3 ada 21,49 % dan tipe 1 ada 10,77 %. Dari sejumlah mikrospora yang viabel setelah berada dalam stres selama 7 hari menunjukkan adanya perubahan sitologi yang ditandai dengan dijumpainya bentuk atau tipe yang berbeda,

Medium pelaparan merupakan medium tanpa karbohidrat dan nitrogen yang cukup. Yu (1999) menyatakan bahwa kekurangan gula dapat mengurangi akumulasi enzim-enzim yang berpengaruh terhadap biosintesis protein, pembentukan pigmen, metabolisme sukrose dll. Mikrospora yang diisolasi dan diperlakukan dengan stres terlihat menunjukkan beberapa kemungkinan dalam memberi tanggapan, antara lain : mikrospora dapat bertahan hidup saja dari stres yang diberikan, mikrospora dapat bertahan dan dapat melakukan perubahan atau pembalikan arah perkembangan dari jalur gametofitik ke arah jalur sporofitik, sedangkan kemungkinan ketiga adalah mati atau plasmolisis. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Mohr (1995) bahwa ada tiga cara yang harus dilakukan oleh sel agar dapat bertahan hidup dalam kondisi stres, yaitu toleransi melawan faktor stres, sel bertahan melawan faktor stres dengan menggunakan mekanisme pertahanan yang sesuai dan ketiga pengembalian efek stres dengan cara memperbaiki kerusakan yang telah terjadi.

#### Perkembangan mikrospora selama berada dalam medium A-2

Perkembangan mikrospora *Nicotiana tabacum* L. cv Vorstenlanden setelah dipindah dalam medium A2 dan diinkubasi dalam gelap (tabel 3), setelah satu minggu diadakan pengamatan ternyata menunjukkan penurunan viabilitas, mikrospora yang viabel 47% saja. Pembelahan mikrospora secara asimetri dan simetri belum ada. Hal itu menunjukkan belum adanya respon mikrospora untuk berkembang ke arah jalur sporofitik.

Di dalam medium pelaparan mikrospora yang ada pada stadium G2 akan terus melanjutkan siklusnya dan mampu melanjutkan pembelahan. Pada stadium G2 mikrospora telah mengalami replikasi sehingga jumlah DNANYa sudah dua kali lipat jumlah semula sehingga dalam medium pelaparan tidak mampu menghentikan pembelahan/mitosis. Sedangkan mikrospora yang berada pada tahap G1 inti tidak dapat membelah karena untuk dapat membelah diperlukan energi yang banyak padahal mikrospora berada dalam medium pelaparan tanpa gula dan sumber nitrogen oleh karena itu mikrospora berhenti pada stadium G1 sampai nanti dilepaskan dari stres dan berada dalam medium embriogenesis. Sebagian dari mikrospora sudah ada yang berada dalam stadium 3 sel dan 4 sel dengan terlihatnya sekat-sekat yang membagi mikrospora tersebut. Sel-sel yang tidak terinduksi selama berada dalam stres dan tetap mempertahankan sifatnya akan terlihat berkembang menjadi polen masak ditandai dengan munculnya granula-granula kasar atau terjadi amilogenesis dan mikrospora yang berkecambah.

**Tabel 3.** Perkembangan mikrospora *Nicotiana tabacum* L. cv vorstenlanden setelah diinkubasi dalam media yang diperkaya (A2) setelah praperlakuan stres panas suhu 34°C dan pelaparan selama 7 hari (dalam %)

Medium A2	Pembelahan simetri	Pembelahan asimetri	Std. 3 sel	Std. 4 sel	Multisel	Kecambah	Viabel
1 minggu	-	-	-	-	-	-	47,54 ± 0,69
2 minggu	0,99 ± 0,67	0,46 ± 0,73	0,06 ± 0,15	0,19 ± 0,27	-	0,13 ± 0,29	44,24 ± 0,75
3 minggu	1,62 ± 0,26	0,72 ± 0,22	0,7 ± 0,72	0,47 ± 0,57	0,32 ± 0,72	0,38 ± 0,75	40,85 ± 0,72
4 minggu	2,10 ± 0,26	1,64 ± 0,26	1,68 ± 0,21	1,27 ± 0,19	4,11 ± 0,22	0,97 ± 0,32	38,29 ± 0,46

Struktur multiseluler baru tampak setelah 3 minggu dalam medium A2. Struktur multiseluler tersebut berkembang dari sel mikrospora yang mengadakan pembelahan menjadi 2 sel, 3 sel, 4 sel dan seterusnya hingga muncul multiseluler. Setelah 4 minggu dalam medium embriogenesis struktur multiseluler menjadi 4%. Kenaikan itu

disebabkan mikrospora yang di minggu sebelumnya sudah berada dalam stadium 3 sel atau 4 sel berkembang menjadi bentuk multiseluler. Selanjutnya struktur multiseluler ini akan bertambah banyak, sedangkan sel yang tidak mampu bertahan dan berkembang akan mati. Struktur multiseluler terlihat dengan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dan akan tampak terbentuknya beberapa sekat yang membagi mikrospora tersebut.

Untuk membuktikan apakah dengan terbentuknya sekat-sekat yang membagi sel mikrospora tersebut menandakan intinya telah membelah maka dilakukan pengecatan menggunakan DAPI ( 4,6 - Diamidino - 2 - Phenylindole ). Prinsip kerja DAPI adalah dengan mengikat rantai DNA pada daerah-daerah yang banyak mengandung A-T sehingga inti tampak berpendar biru di bawah mikroskop fluorescent. Pengecatan DAPI juga dilakukan agar kita mengetahui dengan pasti apakah sel mikrospora membelah secara asimetri atau simetri. Mikrospora yang membelah secara asimetri tampak adanya perbedaan intensitas fluoresen antara inti vegetatif dengan inti generatif yang diamati di bawah mikroskop fluoresen. Inti generatif tampak lebih terang (intensitas fluoresensinya lebih kuat) bila dibandingkan dengan inti vegetatif. Mikrospora yang membelah secara simetri memperlihatkan intensitas fluoresensi yang sama. Mikrospora inilah yang nantinya akan berkembang menjadi proembrio (struktur multiseluler). Dalam medium embriogenesis selama 3 bulan ternyata struktur multiseluler tetap dan tidak terjadi adanya perubahan, hal itu kemungkinan disebabkan karena mikrospora tembakau cv. Vorstenlanden belum mampu memproduksi bahan-bahan yang diperlukan untuk berkembang menjadi embrio.

### KESIMPULAN

Dari penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa : Stadium late uninukleat terdapat pada kuncup dengan mahkota bunga berukuran 9-10 mm dengan presentase 69%. Setelah praperlakuan stres panas dan pelaparan mikrospora mengalami perubahan morfologi, dijumpai star like 21 %. Dalam medium A2 dijumpai mikrospora multiseluler 4%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Indrianto, A. 2001. Tracking System Reveals Development of Isolated Wheat Microspores. *Agricell Report*. Published by Agritech Consultants, Inc. Vol 36, number 2, February 2001.
- Mohr H. and Schopfer P. 1995. *Plant Physiology*. Biochemistry and Physiology Dept Rothmsted exp Station. Biologisches Institut II der Universitat. Gehrstuhl fur Botanik. Schanzlestrabet 79104 Freiburg.
- Touraev A., Ilham A., Vicente O. and Heberle-Bors E. 1996. Stress-induced Microspore Embryogenesis in Tobacco : an Optimized System for Molecular Studies. *Plant Cell Rep*. 15: 561-565.
- Yu, SM. 1999. Up date on Signal Transduction Cellular and Genetic Responses of Plants to Sugar Starvation. *Plnt Physiology*. 121 : 687-693.

## KESIMPULAN

Dari penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa : Stadium late uninkulter terdapat pada kuncup dengan mahkota bunga berukuran 9-10 mm dengan persentase 69%. Setelah pemaparan stres panas dan pemaparan mikrospora mengalami perubahan morfologi, dijumpai star like 21 %. Dalam medium A2 dijumpai mikrospora multiseluler 4%.