REGENERASI TANAMAN *Shorea pinanga* Scheff. MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK

Plant Regeneration of Shorea pinanga Scheff. through Somatic Embryogenesis

Yelnitis

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Sleman – Yogyakarta
Telp. (0274) 895954, Fax. (0274) 896080

Naskah masuk: 28 Mei 2007 ; Naskah diterima: 4 Februari 2008

ABSTRACT

Shorea pinanga (Scheff.) is a member of Dipterocarpaceae, that has an important role as a timber product source. The experiment of plant multiplication through somatic embryogenesis to improve mass production of somatic embryo was conducted. The experiment of plant multiplication through somatic embryogenesis to mass produced of somatic embryo was conducted. Somatic embryos were produced from callus-derived immature embryo. Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with vitamin of B group, 30 gr/l sucrose and 8 gr/l agar, was used as basal medium. The experiment was conducted in three stages i.e embryogenic callus induction, somatic embryos induction and germination of somatic embryo. Calli were initiated by the treatment of 2,4-D (2.0 mg/l– 5.0 mg/l) or (0.5 mg/l – 2.0 mg/l) dicamba. For induction of somatic embryo, 100 mg/l the embryogenic callus was cultured on the medium supplemented with (0.5 mg/l – 1.5 mg/l) kinetin or (0.1 mg/l – 0.5 mg/l) BA or (0.1 mg/l – 0.3 mg/l) thidiazuron. For germination of somatic embryo, the MS and ½ MS supplemented with (0.1 mg/l – 0.5 mg/l) GA₃ were used. The observation was made on period of callus initiation, growth rate of embryogenic callus, texture and color of callus and embryogenic callus, number of somatic embryo and germination number of somatic embryo to plantlet. The results showed that the treatment with 5.0 mg/l 2,4-D was the best for callus initiation (10,1 days), and friable embryogenic callus induction with 95,5 % frequency. The medium supplemented with 1.5 mg/l kinetin was the best treatment to induce somatic embryo with the average number of somatic embryos was 271 globular embryos 110 cotyledon somatic embryos on eight weeks. The best treatment for germinating somatic embryo was ½ MS + 0.1 mg/l GA₃, that produced 5 plantlets from 10 embryos intact.

Key words : Embryogenic callus, *Shorea pinanga* Scheff., somatic embryo

ABSTRAK

Meranti (*Shorea pinanga* Scheff.) merupakan salah satu anggota suku Dipterocarpaceae yang berperan penting sebagai penghasil kayu. Perbanyakan tanaman secara generatif mempunyai kendala karena mempunyai masa berbuah sekali dalam 5 tahun dan termasuk buah rekalsitran. Penelitian perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik telah dilakukan untuk mendapatkan embrio somatik secara massal. Embrio dari buah yang masih muda digunakan sebagai eksplan. Media yang digunakan adalah media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang diperkaya dengan 30 gr/l sukrosa, vitamin grup B dan 8 gr/l agar. Penelitian dilakukan dalam 3 tahap yaitu tahap induksi kalus embriogenik, tahap induksi embrio somatik dan tahap perkecambahan embrio somatik. Pada tahap induksi kalus dan induksi kalus embriogenik diberikan perlakuan 2,4-D (2,0 mg/l – 5,0 mg/l) atau dicamba (0,5 mg/l – 2,0 mg/l). Pada tahap induksi embrio somatik 100 mg/l kalus embriogenik dikulturkan pada perlakuan kinetin (0,5 mg/l

– 1,5 mg/l) atau BA (0,1 mg/l – 0,5 mg/l) atau *thidiazuron* (0,1 mg/l – 0,3 mg/l). Pada tahap perkecambahan embrio somatik diberikan perlakuan GA₃ (0,1 mg/l – 0,5 mg/l) pada media MS dan ½ MS. Pengamatan dilakukan terhadap waktu induksi kalus, jumlah kalus embriogenik yang diperoleh, tekstur dan warna kalus hasil inisiasi dan kalus embriogenik, jumlah embrio somatik, jumlah embrio somatik yang berkecambah membentuk *plantlet*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D 5,0 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk inisiasi kalus dan induksi kalus embriogenik dengan rata-rata lama waktu inisiasi 10,1 hari, jumlah kalus embriogenik yang terbentuk adalah 95,5 %. Perlakuan kinetin 1,5 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk induksi embrio somatik dengan jumlah rata-rata 110 embrio somatik fase kotiledon dan 271 embrio fase globular. Perlakuan terbaik untuk perkecambahan embrio somatik adalah medium ½ MS + GA₃ 0,1 mg/l yang menghasilkan 5 *plantlet* dari 10 embrio yang ditanam.

Kata kunci : embrio somatik, kalus embriogenik, *Shorea pinanga* Scheff.

I. PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai pusat keanekaragaman hayati yang bermanfaat sebagai sumber kayu untuk bahan kayu pertukangan dan industri, sumber materi genetik, sumber zat bioaktif dan produk ikutan lainnya (Soekotjo, 1999). Masalah kehilangan biodiversitas di Indonesia sudah mencapai tahap yang mengkhawatirkan. Hutan yang merupakan sumber daya alam yang mempunyai peran yang sangat penting terhadap kehidupan manusia semakin terancam keberadaannya dan telah berada pada kondisi yang membahayakan (Rustam dan Simatupang, 2005). Penebangan hutan secara liar (*illegal logging*) merupakan masalah utama di sektor kehutanan yang mengakibatkan hutan menjadi semakin gundul. Hal ini memberikan dampak yang luar biasa, seluruh biodiversitas dan kekayaan alam termasuk kayu dapat punah. Sastrapradja, (2005) menyatakan bahwa 101 juta ha dari 120 juta ha luas kawasan hutan Indonesia merupakan kawasan hutan yang rusak dengan jumlah kerusakan setiap tahunnya sebanyak 3,2 juta ha. Diantara jenis tersebut adalah kelompok dipterokarpus termasuk di dalamnya berbagai jenis meranti yang memberikan kontribusi besar terhadap devisa negara. Tanaman ini merupakan jenis endemik yang tumbuh di pulau Kalimantan dan merupakan tanaman unggulan Asia Tenggara.

Dengan dicanangkannya pembangunan hutan tanaman industri yang pembangunannya dimulai pada tahun 1989 – 1990, dan setelah kurang lebih 10 tahun terakhir penggalakan penanaman meranti dilancarkan oleh pemerintah yang semula diharapkan dapat berfungsi untuk mengganti hutan alam karena hutan alam yang cenderung terus menurun untuk menghasilkan kayu pertukangan ternyata Hutan Tanaman Industri (HTI) untuk tanaman meranti belum terwujud.

Masalah utama dalam pembangunan hutan tanaman industri jenis meranti adalah belum tersedianya bibit dalam jumlah yang mencukupi untuk memenuhi kebutuhan bibit dalam kegiatan penanaman skala besar. Perbanyakan tanaman secara generatif belum dapat memenuhi kebutuhan bibit karena jenis dipterocarp berbuah sekali dalam 5 – 13 tahun. Selain itu bijinya bersifat rekalsitran sehingga bibit tidak dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama.

Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik perbanyakan *in vitro* yang paling baik karena mempunyai beberapa keuntungan antara lain jumlah tanaman yang diperoleh jauh lebih banyak, populasi tanaman yang dihasilkan identik dengan tetuanya dan embrio somatik tersebut dapat berkembang menjadi *plantlet*. Selain itu teknik ini dapat diotomatisasikan dengan menggunakan bioreaktor untuk produksi embrio somatik skala masal.

Perbanyakan tanaman *Shorea* melalui embriogenesis somatik telah dilakukan oleh Gunasekara *et al.* (1988) melalui kultur suspensi dan diperoleh kalus tetapi belum diperoleh embrio somatik. Selanjutnya Umboh *et al.* (1992) mendapatkan kalus embrional dari eksplan potongan embrio. Demikian juga Yelnitis *et al.* (2002) mendapatkan kalus kompak dari eksplan meristem *S. leprosula* dan *S. selanica* pada media MS (Murashige dan Skoog) dan media Gamborg (B5) yang ditambah dengan 2,4-D

(0.1 – 1.0 mg/l) dikombinasikan dengan NAA (0.5 dan 1.0 mg/l). Dari eksplan embrio *S. pinanga* diperoleh kalus yang ditumbuhkan pada media MS dan B5 ditambah 2,4-D (4.0 dan 5.0 mg/l) diperoleh embrio somatik, tetapi jumlahnya masih rendah. Dari hal diatas perlu dicari metode yang sesuai untuk mendapatkan embrio somatik dalam jumlah yang optimal.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh 2,4-D atau *dicamba* pada berbagai konsentrasi terhadap induksi kalus dan induksi kalus embriogenik, mengetahui pengaruh kinetin, BA, *thidiazuron* terhadap induksi embrio somatik dan untuk mengetahui pengaruh media MS dan ½ MS + GA₃ pada berbagai konsentrasi terhadap perkecambahan embrio somatik membentuk *plantlet*.

II. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Kultur Jaringan, Pusat Litbang Hutan Tanaman, Yogyakarta dan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dari bulan Januari 2004 sampai bulan Juli 2005.

Bagian tanaman yang digunakan adalah embrio yang diambil dari buah muda tanaman *S. pinanga* yang berumur ± 8 minggu setelah polinasi. Bahan tanaman diambil dari Kebun Percobaan Hutan Darmaga, Bogor Jawa Barat. Medium yang digunakan adalah medium dasar MS padat. Untuk induksi kalus diberikan perlakuan 2,4-D dan *dicamba* dan untuk induksi embrio somatik diberikan perlakuan kinetin, BA dan *thidiazuron* serta GA₃ untuk perkecambahan. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan menggunakan alkohol 70 % selama 10 menit, HgCl₂ 0.2 % selama 2 menit, bayclin 20 % selama 5 menit dan terakhir dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya buah dibelah, embrio dipisahkan dari kotiledon di potong-potong dengan ukuran 5 mm, ditumbuhkan pada medium perlakuan yang sudah disiapkan. Kultur dipelihara di ruangan inkubasi. Penelitian terdiri dari 3 tahap yaitu 1) tahap induksi kalus embriogenik, 2) tahap induksi embrio somatik, 3) tahap perkecambahan embrio somatik.

1. Tahap induksi kalus embriogenik

a. Induksi kalus

Pada tahap ini, embrio muda yang sudah disterilisasi dan dipotong-potong dengan ukuran 5 mm, ditumbuhkan pada media kultur untuk induksi kalus.

Tabel (Table) 1. Perlakuan yang diuji untuk induksi kalus (*the treatment for callus induction*)

Perlakuan media (<i>Media treatment</i>)	2,4-D (mg/l)	Dicamba (mg/l)
MS	2.0	-
	3.0	-
	5.0	-
MS	-	0.5
	-	1.0
	-	1.5
	-	2.0

Perlakuan yang diuji adalah medium MS padat dengan penambahan 2,4-D atau *dicamba* seperti terlihat dalam Tabel 1.

b. Induksi kalus embriogenik.

Kalus yang terbentuk pada tahap sebelumnya disubkultur ke medium baru dengan komposisi yang sama yaitu 2,4-D dan *dicamba* seperti tertera dalam Tabel 2.

Tabel (Table) 2. Perlakuan yang diuji untuk induksi kalus embriogenik (*the treatment for callus embriogenetic induction*)

Perlakuan media (<i>Media treatment</i>)	2,4-D (mg/l)	Dicamba (mg/l)
MS	2.0	-
	3.0	-
	5.0	-
MS	-	0.5
	-	1.0
	-	1.5
	-	2.0

Kalus dibiarkan sampai umur 8 minggu sehingga terbentuk kalus embriogenik. Pengamatan dilakukan terhadap waktu induksi kalus embriogenik, persentase kalus embriogenik yang terbentuk, penampakan visual kalus embriogenik yang dihasilkan. Penelitian dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 10 kali ulangan. Faktor yang diuji adalah konsentrasi zat pengatur tumbuh.

2. Tahap induksi embrio somatik

Pada tahap induksi embrio somatik digunakan kalus embriogenik yang diperoleh pada perlakuan terbaik dari tahap sebelumnya.

Tabel (Table) 3. Perlakuan yang diuji untuk induksi embrio somatik (*the treatment for somatic embryo induction*)

Perlakuan media (<i>Media treatment</i>)	Kinetin (mg/l)	BA (mg/l)	Thidiazuron (mg/l)
Kontrol (<i>Control</i>) MS	0.0		
	0.5		
	1.0		
	1.5		
MS		0.1	
		0.3	
		0.5	
MS			0.1
			0.15
			0.2

Perlakuan yang diuji adalah penambahan kinetin, BA dan *thidiazuron* dan tanpa zat pengatur tumbuh sebagai kontrol. Parameter yang diamati adalah jumlah embrio somatik fase kotiledon, embrio fase globular dan torpedo dan morfologi embrio somatik yang diperoleh. Penelitian dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 10 kali ulangan. Faktor yang diuji adalah konsentrasi zat pengatur tumbuh.

3. Tahap perkecambahan embrio somatik

Embrio somatik fase kotiledon yang mempunyai bentuk normal (mempunyai kotiledon dan hipokotil) dengan ukuran 5 mm ditumbuhkan pada perlakuan media MS dan ½ MS + GA3 seperti terlihat dalam Tabel 4.

Tabel (Table) 4. Perlakuan yang diuji untuk induksi embrio somatik (the treatment for somatic embryo germination)

Perlakuan / Treatment	Konsentrasi / Concentration (mg/l)
MS + GA3	0.0
	0.1
	0.3
	0.5
½ MS + GA3	0.0
	0.1
	0.3
	0.5

Parameter yang diamati pada tahap ini adalah jumlah embrio somatik yang berkecambah serta penampakan visual embrio somatik yang diperoleh. Penelitian dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 10 kali ulangan. Faktor yang diuji adalah jenis media dan konsentrasi zat pengatur tumbuh.

Struktur dan perkembangan embrio somatik diamati secara anatomi dengan preparat awetan. Untuk itu dibuat sediaan awetan dengan metode *section* dengan *embedding* Johansen (Johansen, 1940). Pengamatan sediaan awetan dan pengambilan gambar dilakukan dengan menggunakan mikroskop dan kamera Olympus tipe *BHA Research Photo*.

D. Analisa data

Data morfologi dan histologi yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan data kuantitatif seperti jumlah embrio somatik dihitung rata-rata dan standar deviasinya.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Tahap induksi kalus embriogenik

a. Induksi kalus

Kalus dapat diinisiasi dari semua perlakuan yang diuji. Eksplan (Gambar 1a) mengalami penebalan (Gambar 1b) pada bagian yang luka dan kontak langsung dengan media tumbuh dan diikuti oleh pembentukan kalus (Gambar 1 c - d). Tidak semua bagian eksplan awal yang ditumbuhkan dapat membentuk kalus. Kalus hanya terbentuk pada bagian perifer dari eksplan yang ditumbuhkan. Kalus yang diperoleh mempunyai tekstur yang beragam mulai dari tekstur kompak sampai remah. Hal ini disebabkan karena jenis dan konsentrasi auksin yang digunakan untuk induksi kalus juga berbeda. Menurut Gunawan (1987) penggunaan jenis dan konsentrasi auksin yang berbeda akan memberikan respon yang berbeda terhadap induksi kalus.

Kalus yang terbentuk berproliferasi dengan pertumbuhan yang beragam. Kalus yang diperoleh dari perlakuan dengan penambahan 2,4-D umumnya berwarna kekuningan dan mempunyai tekstur remah (Gambar 1e) sedangkan kalus yang diperoleh dari media yang ditambah dengan *dicamba* mempunyai tekstur kompak, berwarna hijau dengan pertumbuhan lambat. Su *et al.* (1997) menyatakan bahwa penggunaan auksin selain 2,4-D untuk induksi kalus, dihasilkan kalus dengan tekstur kompak dan pertumbuhan lambat.

Konsentrasi 2,4-D sebanyak 5.0 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk inisiasi kalus. Inisiasi kalus pada perlakuan ini terjadi rata-rata 10.1 hari setelah ditumbuhkan dan paling cepat dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Diduga penambahan 2,4-D dengan konsentrasi 5,0 mg/l menyebabkan konsentrasi auksin endogen mengalami perubahan dan ini menjadi faktor pencetus untuk induksi kalus.

Kalus yang berwarna putih kekuningan merupakan kalus yang dapat mengikuti pola embriogenesis somatik. Hasil yang sama dari penelitian Shimizu *et al.* (1997) yang mendapatkan kalus yang berwarna kekuningan pada tanaman *Iris germanica* dan dapat berkembang membentuk *plantlet*. Sel-sel kalus tersebut dapat berkembang membentuk embrio somatik tetapi tidak semua kalus tersebut mampu berkembang membentuk embrio somatik. Hal ini disebabkan karena adanya kompetisi antara sel embriogenik mengadakan perkembangan lebih lanjut.

Gambar (Figure) 1. Perkembangan eksplan menjadi embrio somatik pada perlakuan 2,4-D 5,0 mg/l. a. Eksplan potongan embrio; b. Penebalan potongan embrio zigotik pada umur 1 minggu; c. Kalus umur 2 minggu; d. kalus umur 6 minggu; e. Kalus umur 14 minggu; f. Kalus embriogenik umur 4 minggu; g. Kalus embriogenik umur 6 minggu; h. Kalus embriogenik umur 9 minggu. i. Embrio somatik pada berbagai fase (12 minggu); j. Embrio somatik fase kotiledon umur 8 minggu. Skala a = 2,1 mm; b = 3 mm; c = 0,9 mm; d = 1,1 mm; e = 1,5 mm; f = 1,7 mm; g = 2 mm; h = 1,5 mm; i = 2,3 mm; j = 1 mm. (Explant development to somatic embryo on 5.0 mg/l 2,4-D treatment. a. Piece embryo explant; b. Swollen of piece zygotic embryo on 1 week; c. Callus 2 weeks age; d. Callus 6 weeks age; e. Callus 14 weeks age; f. Embryogenic callus 4 weeks age; g. Embryogenic callus 6 weeks age; h. Embryogenic callus 9 weeks age; i. Somatic embryo on several stage (12 weeks); j. Somatic embryo cotyledon stage on 8 weeks. Scale a = 2,1 mm; b. 3 mm; c. 0,9 mm; d. 1,1 mm; e. 1,5 mm; f. 1,7 mm; g. 2 mm; h. 1,5 mm; i. 2,3 mm; j. 1 mm.)

Persentase rata-rata tertinggi kalus diperoleh dari perlakuan 2,4-D sebanyak 5,0 mg/l yaitu 43,7 %. Hal ini diduga disebabkan karena kandungan auksin endogen dari eksplan yang digunakan belum

mencapai keseimbangan untuk induksi kalus sehingga penambahan 2,4-D dengan konsentrasi 5,0 mg/l secara eksogen dapat merangsang terbentuknya kalus dan berproliferasi lebih cepat.

b. Induksi kalus embriogenik

Kalus yang diperoleh pada tahap pertama diinokulasi dan disubkultur beberapa kali ke dalam media segar dengan komposisi yang sama. Subkultur kalus yang berasal dari perlakuan 2,4-D 5,0 mg/l pada media yang sama berproliferasi dan membelah dengan sangat cepat (Gambar 1f). Hal ini disebabkan karena sel tumbuhan yang secara alamiah bersifat autotrof menjadi heterotrof dengan adanya kandungan hara yang cukup kompleks serta zat pengatur tumbuh yang terdapat di dalam media tumbuh. Dalam penelitian ini proliferasi kalus embriogenik diperoleh setelah dikulturkan selama 15 minggu terus menerus pada perlakuan 2,4-D tanpa melalui subkultur berulang atau melalui tiga kali subkultur dengan interval waktu 5 minggu, tetapi kalus embriogenik tidak ditemukan pada perlakuan *dicamba*. Hasil yang berbeda dari penelitian Shrikhande *et al.* dalam Su *et al.* (1997) menyatakan bahwa kalus embriogenik diperoleh setelah dua kali subkultur pada media yang sama. Pada beberapa spesies dan genotip tanaman kultur embriogenik dapat disubkultur pada periode waktu yang lama pada media dengan penambahan zat pengatur tumbuh yang sama dan kalus embriogenik tersebut mampu berkembang membentuk tanaman.

Dari data yang diperoleh pada penelitian ini perlakuan 2,4-D konsentrasi 5,0 mg/l lebih efisien dalam pembentukan kalus embriogenik. Proliferasi sel-sel kalus juga lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan lain. Inisiasi kalus embriogenik terjadi sebagai respon dari stress akibat pengaruh konsentrasi auksin yang relatif tinggi (Indrianto, 2002). Rata-rata persentase kalus embriogenik paling tinggi diperoleh dari perlakuan 2,4-D konsentrasi 5,0 mg/l yaitu 95,5 %. Tiap sel mempunyai kemampuan yang berbeda untuk membentuk kalus embriogenik sehingga konsentrasi auksin yang berbeda mempunyai kapasitas yang juga berbeda dalam menginduksi kalus embriogenik. Perubahan konsentrasi tersebut merupakan *triggering factor* atau faktor pencetus yang dapat mempengaruhi ekspresi gen dalam menentukan embriogenesis somatik. Sel-sel dari eksplan yang sama mempunyai kemampuan yang berbeda dalam membentuk embrio somatik.

Kalus embriogenik yang diperoleh berwarna kekuningan, nodular dan friabel (Gambar 1g-h) dan dapat berkembang membentuk embrio somatik. Hasil yang sama dengan penelitian Ortiz *et al.* (2000) menunjukkan bahwa kalus embriogenik yang berasal dari embrio zigotik muda dapat berkembang membentuk embrio somatik. Dalam perkembangannya kalus embriogenik melalui beberapa fase yaitu fase globuler, fase jantung, fase torpedo dan fase kotiledon.

2. Induksi embrio somatik

Pada tahap ini kalus embriogenik dikulturkan pada media regenerasi dengan penambahan kinetin, BA dan *thidiazuron* dengan berbagai konsentrasi untuk induksi embrio somatik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan sitokinin ke dalam medium regenerasi merangsang embrio somatik hijau muncul dan berkembang dari seluruh kalus yang dikulturkan (Gambar 1 i).

Gambar (Figure) 2. A1. Embrio somatik fase globuler; A2. Penampang membujur embrio fase globuler; pls (*procambium-like structure*); pd (protoderm); B1. Embrio fase jantung; B2. Penampang membujur embrio fase jantung; pd (protoderm); ck. (calon kotiledon); pls (*procambium-like structure*); C1. Embrio fase torpedo; C2. Penampang membujur embrio fase torpedo; 1 (kotiledon); 2 (calon akar); 3. (berkas pembuluh); 4 (meristem apikal); D1. Embrio fase kotiledon; D2. Penampang membujur embrio fase kotiledon. 1. kotiledon; 2. meristem apikal; 3. berkas pembuluh; 4. Protoderm. 5. calon akar. Skala A1 = 0,3 mm; B1 = 0,5 mm; C1 = 0,8 mm; D1 = 0,4 mm. A2 = 257 μ m; B2 = 500 μ m; C2 = 1 mm; D2 = 1,2 mm. (A1. Somatic embryo globular stage; A2. Vertical section of embryo globular stage; pls (*procambium-like structure*); pd (protoderm); B1. Heart stage embryo; B2. Vertical section of heart stage embryo; pd (protoderm); ck (*procotyledon*); pls (*procambium-like structure*); C1. Embryo torpedo stage; C2. Vertical section of embryo torpedo stage; 1. (cotyledon); 2. root primordia; 3. (vascular); 4. (apical meristem); D1. Embryo cotyledon stage; D2. Vertical section of embryo cotyledon stage. 1. cotyledon; 2. apical meristem; 3. vascular; 4. Protoderm; 5. Root primordia. Scale A = 0,3 mm; B1 = 0,5 mm; C1 = 0,8 mm; D1 = 0,4 mm; A2 = 257 μ m; B2 = 500 μ m; C2 = 1 mm; D2 = 1,2 mm.)

Dalam dua minggu ujung-ujung kelihatan hijau, pada minggu ke tiga eksplan menjadi membesar dari kalus embriogenik yang berwarna kekuningan dan embrio somatik fase kotiledon pertama muncul dari daerah perifer. Pada semua konsentrasi BA, kinetin dan *thidiazuron* yang diuji dapat dihasilkan embrio somatik fase kotiledon (Gambar 1 j) setelah dikultur selama 8 minggu. Proembrio berkembang menjadi embrio somatik fase globuler (Gambar 2 A1). Dari penelitian ini perlakuan dengan penambahan 1.5 mg/l kinetin merupakan perlakuan terbaik untuk induksi embrio fase globuler. Dari perlakuan ini diperoleh embrio somatik fase globuler dengan jumlah paling tinggi yaitu 271 (Tabel 1). Hasil yang berbeda diperoleh penelitian Lee *et al.* (2002), menunjukkan bahwa embrio fase globuler dibentuk pada medium cair tanpa penambahan zat pengatur tumbuh yang selalu disubkultur pada media yang sama sedangkan subkultur kalus ke dalam media dengan penambahan ABA 0.76 – 7.6 μ M diperoleh embrio fase globuler lebih tinggi dan fase torpedo serta fase kotiledon rendah dari perlakuan kontrol. Menurut Singh *et al.* (1999) perkembangan embrio somatik dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh sitokinin yang diberikan.

Embrio fase globular berkembang membentuk fase jantung. Pada fase ini embrio berkembang dengan dua kotiledon (ck) tetapi masih pendek (Gambar 2 B1) dimulai dengan adanya lekukan yang membentuk dua area dan terdapat pada bagian atas embrio.

Tabel (Table) 1. Jumlah embrio somatik yang terbentuk dari perlakuan BA, kinetin dan thidiazuron umur 6 minggu setelah dikultur (*sum of somatic embryo found from BA, kinetin and thidiazuron treatment after 6 weeks*)

Perlakuan (Treatment)		Jumlah embrio fase globuler	Jumlah embrio fase torpedo	Jumlah embrio fase kotiledon
Zpt	Konsentrasi			
Kontrol	0.0	-	-	-
BA	0.1	140 ± 4	20 ± 3	66 ± 7
BA	0.3	140 ± 4	17 ± 2	59 ± 5
BA	0.5	99 ± 11	23 ± 2	55 ± 6
kinetin	0.5	137 ± 6	118 ± 2	75 ± 7
kinetin	1.0	204 ± 7	142 ± 4	77 ± 4
kinetin	1.5	271 ± 7	139 ± 5	110 ± 4
thi	0.1	119 ± 6	118 ± 4	50 ± 5
thi	0.2	131 ± 4	162 ± 6	50 ± 6
thi	0.3	126 ± 3	126 ± 3	53 ± 6

Keterangan (Note) : thi = thidiazuron
zpt = zat pengatur tumbuh

Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Layser dan Day (2002) bahwa embrio fase jantung diawali dengan pembentukan satu atau dua kotiledon. Selanjutnya Yeung (1995) menyatakan bahwa kotiledon pada tanaman dikotil muncul dari bagian perifer sebagai tonjolan kecil pada bagian terminal embrio somatik.

Dari penelitian ini penggunaan jenis dan konsentrasi sitokinin yang berbeda memberikan pengaruh berbeda terhadap perkembangan embrio somatik. Rata-rata jumlah embrio somatik fase torpedo dapat dilihat pada Tabel 1. Dari perlakuan *thidiazuron* 0.2 mg/l diperoleh jumlah embrio somatik fase torpedo yang paling banyak yaitu 162. Pada fase ini embrio somatik memperlihatkan perkembangan lanjut dan struktur bipolar sudah semakin jelas (Gambar 2 C1 – C2). Hal ini ditandai dengan pemanjangan embrio dan pemanjangan kotiledon. Leyser dan Day (2003) menyatakan bahwa embrio bentuk jantung memanjang membentuk embrio fase torpedo dengan pola jaringan yang sama.

Embrio fase torpedo mengalami perkembangan membentuk embrio somatik fase kotiledon (Gambar 2 D1). Pada fase ini dapat dilihat polaritas embrio yang sangat jelas. Pembentukan kotiledon merupakan proses morfogenetik yang penting dalam embriogenesis somatik. Rata-rata jumlah embrio somatik fase kotiledon paling tinggi yaitu 110 per 100 mg kalus diperoleh dari perlakuan 1.5 mg/l kinetin. Berbeda dengan hasil penelitian Nanda dan Rout (2003) mendapatkan embrio somatik sebanyak 72.6 dari 150 mg kalus embriogenik setelah dikulturkan pada media dengan penambahan BA yang dikombinasikan dengan 2,4-D. Dari penelitian Rai dan McComb (2002) menunjukkan bahwa perlakuan media dengan penambahan *thidiazuron* 4.5 uM memberikan rata-rata jumlah embrio somatik paling tinggi yaitu sebanyak 14,2 sedangkan perlakuan dengan penambahan BA 6,4 uM memberikan rata-rata jumlah rata-rata embrio somatik paling rendah pada tanaman cendana. Guevin *et al.*, (1994) dalam Guevin dan Kirby (1997) menyatakan bahwa penggunaan sitokinin secara tunggal efektif untuk induksi embrio somatik dari eksplan embrio zigotik *Abies fraseri*. Embrio somatik fase kotiledon yang diperoleh dari perlakuan ini mempunyai dua kotiledon. Hal ini berarti bahwa embrio yang diperoleh dari teknik ini mempunyai bentuk normal seperti embrio biasa.

3. Perkecambahan embrio somatik

Embrio somatik yang diperoleh dipisahkan satu sama lainnya dan ditumbuhkan pada media perkecambahan. Perkecambahan tertinggi diperoleh dari perlakuan media $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/l GA₃ yaitu 5 *plantlet* dari 10 embrio somatik yang dikecambahkan dalam waktu 8 minggu. Hasil yang berbeda dari penelitian Capuana dan Debergh (1997) menunjukkan bahwa perkecambahan embrio somatik dari tanaman *Aesculus hippocastanum* sangat jelek, perkembangan menjadi *plantlet* kurang dari 1 %. Pada penelitian ini embrio somatik yang berkecambah memperlihatkan pemanjangan hipokotil diikuti oleh munculnya akar dan plumula setelah 5 minggu ditumbuhkan pada perlakuan pemberian GA₃.

Gambar (Figure) 3. Perkecambahan embrio somatik fase kotiledon. a. umur 4 minggu, b. umur 8 minggu. Skala a = 5 mm; b = 2,4 mm (Germination of somatic embryo cotyledon stage. A. 4 weeks. B. 8 weeks. Skala _ a = 5 mm; b = 2,4 mm.)

Embrio somatik yang dikecambahkan pada perlakuan $\frac{1}{2}$ MS tanpa penambahan GA₃ tidak menunjukkan adanya perkembangan setelah dikecambahkan selama 8 minggu. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Rai dan McComb (2002) yang menunjukkan bahwa penggunaan $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ diperoleh *plantlet* sebanyak 80 % pada perkecambahan embrio somatik cendana pada umur 6 minggu.

IV. KESIMPULAN

Peningkatan konsentrasi 2,4-D dari 2.0 mg/l sampai 5.0 mg/l mengakibatkan peningkatan jumlah kalus embriogenik yang diperoleh. Konsentrasi terbaik adalah perlakuan 2,4-D 5.0 mg/l. Perlakuan dengan penambahan kinetin 1,5 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk induksi embrio somatik dari kalus embriogenik yang menghasilkan rata-rata jumlah embrio somatik fase kotiledon tertinggi yaitu sebanyak 110. Perkecambahan embrio somatik terbaik diperoleh pada perlakuan medium $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ 0.1 mg/l yang menghasilkan 5 *plantlet* dari 10 embrio somatik yang ditanam.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Ari Indrianto yang telah memberikan bimbingan dan arahan yang berharga kepada penulis dari awal sampai selesainya penelitian ini, dan kepada Dr. Nur Masripatin, M.For.Sc yang telah memberikan kesempatan, bimbingan dan arahan yang sangat berharga bagi penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Capuana, M. and P.C. Debergh. 1997. *Improvement of the Maturation and Germination of Horse Chesnut Somatic Embryos*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48 : 23 – 29.
- 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. 267 – 269.
- Dunstan, D.I., T.E. Tautorius & T.A. Thorpe. 1995. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* In Thorpe, T.A. (ed) *In vitro embryogenesis in plants* (pp 471 – 538). Kluwer Acad.Publ. Dordrecht. The Netherlands.
- Guevin, T.G. & E.G. Kirby. 1997. *Induction of Embryogenesis in Cultured Mature Zygotic Embryos of Abies fraseri (Pursh) Poir*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49 : 219 – 222.
- Gunasekara, D.S., E.S. Scott and A.N. Rao. 1988. *Suspension Culture of the Dipterocarp Shorea roxburghii G. Don*. In *Somatic Cell Genetic of Woody Plant*. p 137 – 141.
- Gunawan, L.W. 1987. *Teknik Kultur Jaringan*. PAU – IPB. Bogor. 252 hal.
- Indrianto, A. 2002. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Fak. Biologi UGM. Yogyakarta. 134 hal.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Miceotechnique*. First edition. McGraw Hill Book Comp. Inc. New York. London.
- Lee, K.S., J.C. Lee & W.Y. Soh. 2002. *High Frequency Plant Regeneration from Aralia cordata Somatic Embryos*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68 : 241 – 246.
- Leyser, O. and S. Day. 2003. *Mechanism in Plant Development*. Blackwell Publ. 241 p.
- Ortiz, B.O.C., M.E.P. Reyes & P.E.M. Balch. 2000. *Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Acacia farnesiana and A. schaffneri*. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 36 : 268 – 272.
- Rai, V.R. & J. McComb. 2002. *Direct Somatic Embryogenesis from Mature Embryos of Sandalwood*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69 : 65 – 70.
- Rustam, D. dan H. Simatupang. 2005. Suatu Kajian terhadap Pelaksanaan Pengawasan dan Penegakan Hukum di Sektor Kehutanan. *Surili* 34 (1) : 8g – 8i.
- Sastrapradja, S.D. 2005. *Pengelolaan Sumber Daya Genetik Tumbuhan Hutan*. Makalah dalam Seminar Nasional Peningkatan Produktivitas Hutan, Peran Konservasi Sumber Daya genetik, Pemuliaan dan Silvikultur dalam mendukung Rehabilitasi Hutan, Yogyakarta. 9 hal.
- Shimizu, K., N. Nagaike, T. Yobuya and T. Edachi. 1997. *Plant Regeneration from Suspension Culture of Iris germanica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50 : 27 – 31.
- Singh, R.P., S.J. Murch and P.K. Saxena. 1999. *Role of Nitrogen in Morphogenesis In Vitro*. In *Nitrogen nutrition in higher plants* (eds.). *Science Publ. Inc. USA*. p. 205 – 223.

- Soekotjo, 1999. Silvikultur Intensif untuk Meningkatkan Produktifitas, Efisiensi, Kompetitif dan Kelestarian Hutan Humida Tropis Indonesia. Prosiding Seminar Status Silvikultur, peluang dan tantangan menuju produktifitas dan kelestarian sumber daya hutan jangka panjang. Fahutan UGM Jogjakarta. hal 1 – 9.
- Su, W.W., W.I. Hwang, S.Y. Kim & Y. Sagawa. 1997. *Induction of Somatic Embryogenesis in Azadirachta indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50 : 91 -95
- Umboh, M.I.J., S.A. Yani and D.J. Lawalata. 1992. *Proceeding of Tsukuba Workshop*. Tsukuba Science City. BIO-REFOR. P 112
- Yelnititis, E. Sapulete dan T. Herawan. 2002. Embriogenesis Somatik pada *S. leprosula*, *S. selanica* dan *S. pinanga*. Laporan Tahunan P3BPTH (tidak dipublikasikan).
- Yeung, E.C. 1995. *Structural and Developmental, Patterns in Somatic Embryogenesis In* Thorpe, T.A (eds.). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Acad. Publ. Netherland p. 205 – 230.