

BULETIN **AgroBio**

ISSN 0853-9022

Vol. 5, No. 2, 2002

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi pada Tanaman Kedelai	Saptowo J. Pardal ...	37
Perkembangan Penelitian Kultur <i>In Vitro</i> pada Tanaman Industri, Pangan, dan Hortikultura	Ika Mariska ...	45
Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya	Ragapadmi Purnamaningsih ...	51
Keragaman Genetik Strain <i>Ralstonia solanacearum</i> berdasarkan Karakterisasi Menggunakan Teknik Berbasis Asam Nukleat	Yadi Suryadi dan M. Machmud	59
Penyakit Hawar Daun (<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary) pada Kentang dan Tomat: Identifikasi Permasalahan di Indonesia	Haeni Purwanti	67



Penerbit

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya
Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian

Alamat Penerbit

Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

E-mail: borif@indo.net.id

Telepon: (0251) 339793, 337975

Faksimile: (0251) 338820

Kala Terbit

Dua nomor per volume

Penanggung Jawab

Sutrisno
Kepala Balai Penelitian
Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Redaktur Teknis

Novianti Sunarlim
M. Machmud
Ida Hanarida Somantri

Redaktur Pelaksana

Faizal Abidin
Ida N. Orbani

Buletin AgroBio (*dahulu bernama Buletin Penelitian*) memuat artikel tinjauan ilmiah hasil riset dalam bidang biologi dan bioteknologi tanaman. Naskah (boleh ditulis dalam bahasa Indonesia atau Inggris) yang diajukan untuk diterbitkan hendaknya belum pernah dipublikasikan pada media cetak manapun dan ditulis sesuai dengan "Pedoman Bagi Penulis" (lihat sampul belakang bagian dalam). Dewan Redaksi berhak menyunting naskah tanpa mengubah isi dan makna tulisan atau menolak menerbitkan suatu naskah.

Naskah dapat bersifat tinjauan ilmiah (kritis) atau tinjauan informatif (anotasi) terhadap subjek tertentu, atau gabungan antara keduanya. Tinjauan ilmiah merupakan hasil evaluasi, sintesis, dan analisis kritis tentang riset bagi kepentingan ilmu pengetahuan dan teknologi, sedangkan tinjauan informatif merupakan hasil evaluasi bagi kepentingan pengguna.

Isi naskah dapat membahas salah satu dari butir-butir berikut, yaitu: (a) status riset pada subjek tertentu, baik yang telah, sedang, maupun yang akan dikerjakan, (b) pengungkapan masalah dan pemecahannya, (c) pengembangan suatu metode atau konsepsi, dan (d) gagasan dan pendekatan yang dapat dijadikan landasan bagi suatu usulan riset. Sumber bacaan seyogyanya meliputi bahan pustaka terbitan dalam dan luar negeri yang terkini dan relevan.

Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya

Ragapadmi Purnamaningsih

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRACT

Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis and Some Gene Expression. Ragapadmi Purnamaningsih. The agriculture system need to be enhanced. In order that it is needed the qualified and uniform seedlings in plenty quantity. However it is very difficult to get that from conventional method. By using tissue culture method, seedling can be multiplied. The advantages of this method are (1) seedling can be obtained in plenty quantity, (2) seedling can be obtained in short time relatively, and (3) the seedlings have the same character with the mother plant. Multiplication of explant by using embryogenesis somatic is the one technique that can be applied. With this technique explant can be induced to form somatic seedling from several specific stages: embryogenic callus induction, maturation, germination, and hardening. All of the stages are depend on kind of explant and the composition of nutrition in the culture media (carbohydrate sources, kind, and concentration of plant growth regulator, etc.). Embryogenesis somatic process is regulated by several genes CHB3, CHB4, CHB5, and CHB6. The expression of these genes determine the stage of embryo development until somatic seedlings are formed.

Key words: Tissue culture, embryogenesis, gene

Salah satu faktor penting yang mendukung program pertanian adalah pengadaan bibit bermutu, seragam dan diperoleh dalam jumlah yang banyak. Kebutuhan tersebut sulit dipenuhi apabila pengadaan bibit dilakukan secara konvensional. Untuk mengantisipasi hal tersebut, dapat ditempuh cara perbanyak tanaman melalui kultur jaringan. Kultur jaringan telah terbukti dapat menyediakan bibit berbagai tanaman yang akan dieksploitasi secara luas terutama pada tanaman semusim (berdinding lunak). Melalui kultur *in vitro* tanaman dapat diperbanyak setiap waktu sesuai kebutuhan, karena faktor perbanyakannya tinggi.

Penggandaan biakan dalam kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Cara embriogenesis somatik banyak mendapat perhatian karena jumlah propagula

yang dihasilkan tidak terbatas dan dapat diperoleh dalam waktu yang lebih singkat. Di samping itu, untuk mendukung program pemuliaan tanaman melalui rekayasa genetika, penggunaan embrio somatik dapat mempercepat keberhasilan dengan peluang transformasi yang lebih tinggi karena embrio somatik dapat berasal dari satu sel somatik. Untuk penyimpanan jangka pendek maupun jangka panjang, embrio somatik dianggap merupakan bahan tanaman yang ideal untuk disimpan karena apabila diregenerasikan dapat membentuk bibit somatik.

Di samping keuntungan, terdapat beberapa kendala dalam penerapan embriogenesis, yaitu peluang terjadi mutasi lebih tinggi, metode lebih sulit, ada penurunan daya morfogenesis dari kalus embriogenik karena subkultur berulang serta memerlukan penanganan yang lebih intensif karena kultur lebih rapuh. Namun demikian, variasi yang dihasilkan sering dianggap meng-

untungkan karena dapat digunakan sebagai sumber keragaman genetik (*gene pool*).

Embriogenesis somatik merupakan suatu proses di mana sel somatik (baik haploid maupun diploid) berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet. Istilah embrio somatik pertama kali digunakan oleh Tolkin pada tahun 1964 yang menggambarkan pembentukan organisme dari suatu sel atau kumpulan sel somatik. Embrio somatik dapat dicirikan dari strukturnya yang bipolar, yaitu mempunyai dua calon meristem, yaitu meristem akar dan meristem tunas. Dengan memiliki struktur tersebut maka perbanyakannya melalui embrio somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif yang unipolar. Di samping strukturnya, tahap perkembangan embrio somatik menyerupai embrio zigotik. Secara spesifik tahap perkembangan tersebut dimulai dari fase globular, fase hati, fase torpedo, dan planlet (Henry *et al.*, 1998 dalam Gaj, 2001).

Embrio somatik dapat terbentuk melalui dua jalur, yaitu secara langsung maupun tidak langsung (melewati fase kalus). Keberhasilan akan tercapai apabila kalus atau sel yang digunakan bersifat embriogenik yang dicirikan oleh sel yang berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil-kecil dan mengandung butir pati. Embrio somatik dapat dihasilkan dalam jumlah besar dari kultur kalus, namun untuk tujuan perbanyakannya dalam skala besar, jumlahnya kadang-kadang dapat lebih ditingkatkan melalui inisiasi sel embrionik dari kultur suspensi yang berasal dari kalus primer (Wiendi *et al.*, 1991).

Embriogenesis mempunyai beberapa tahap spesifik, yaitu (1) induksi sel dan kalus embriogenik, (2) pendewasaan, (3) perkecam-

bahan, dan (4) hardening. Pada tahap induksi kalus embriogenik dilakukan isolasi eksplan dan penanaman pada media tumbuh. Untuk induksi kalus embriogenik kultur umumnya ditumbuhkan pada media yang mengandung auksin yang mempunyai daya aktivitas kuat atau dengan konsentrasi tinggi. Dari berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-D merupakan auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik. Zat pengatur tumbuh tersebut merupakan auksin sintesis yang cukup kuat dan tahan terhadap degradasi karena reaksi enzimatis dan fotooksidasi. Di samping auksin, sering pula diberikan sitokinin seperti benzil adedin (BA) atau kinetin secara bersamaan (Bhojwani dan Razdan, 1989).

Tahap pendewasaan adalah tahap perkembangan dari struktur globular membentuk kotiledon dan primordia akar. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa tahap pendewasaan adalah tahap yang paling sulit. Pada tahap ini sering digunakan auksin pada konsentrasi rendah.

Tahap perkecambahan adalah fase di mana embrio somatik membentuk tunas dan akar. Pada media perkecambahan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan sangat rendah atau bahkan tidak diberikan sama sekali.

Tahap hardening, yaitu tahap aklimatisasi bibit embrio somatik dari kondisi *in vitro* ke lingkungan baru di rumah kaca dengan penurunan kelembaban dan peningkatan intensitas cahaya.

Dalam makalah ini akan disajikan beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan perbanyak tanaman melalui jalur embriogenesis somatik, tahap perkembangan eksplan membentuk embrio somatik, serta bagaimana rangkaian proses tersebut dikendalikan oleh gen-gen tertentu.

FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI PEMBENTUKAN EMBRIO SOMATIK

Beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan embrio somatik adalah jenis eksplan, sumber nitrogen dan gula, serta zat pengatur tumbuh.

Jenis Eksplan

Penggunaan eksplan yang bersifat meristematis umumnya memberikan keberhasilan pembentukan embrio somatik yang lebih tinggi. Eksplan yang digunakan dapat berupa aksis embrio zigotik muda dan dewasa, kotiledon, mata tunas, epikotil maupun hipokotil.

Hasil penelitian Vesco dan Guerra (2001) menunjukkan bahwa penggunaan embriozigotik dewasa (*mature zygotic embryogenesis/MZE*) dapat menghasilkan embrio somatik yang lebih banyak dalam waktu yang lebih cepat daripada *immature zygotic embryogenesis (IZE)*. Sebaliknya hasil penelitian Gupta dan Crob (1995) dalam Vesco dan Guerra (2001) pada tanaman cemara menunjukkan bahwa penggunaan embrio zigotik muda (*IZE*) menghasilkan embrio somatik yang lebih banyak daripada embrio zigotik dewasa (*MZE*).

Dari beberapa hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa eksplan yang digunakan dapat berbeda tergantung jenis tanaman dan tahap perkembangan (*developmental stage*) dari eksplan.

Sumber Nitrogen dan Gula

Embriogenesis somatik mengalami proses perkembangan morfologi seperti yang terjadi pada embrio zigotik. Faktor yang penting dalam induksi dan perkembangan embriogenesis somatik adalah komposisi nutrisi pada media kultur. Nitrogen merupakan faktor utama dalam memacu morfogenesis secara *in vitro*.

Menurut Ammirato (1983) bentuk nitrogen reduksi dan beberapa asam amino seperti glutamin dan casein hidrolisat, sangat penting untuk inisiasi dan perkembangan embrio somatik. Penambahan asam amino dapat merangsang terjadinya komunikasi di antara sel dan jaringan pada organ multiselular (Young *et al.*, 1999 dalam Vesco dan Guerra, 2001). Untuk inisiasi dan pendewasaan embrio somatik diperlukan keseimbangan yang tepat antara NH_4^+ dan NO_3^- (Bhojwani dan Razdan, 1989). Konsentrasi NO_3^- yang terlalu tinggi akan meningkatkan pH media sehingga kalus tidak dapat membentuk embrio somatik.

Hasil penelitian Vesco dan Guerra (2001) pada tanaman *Feijoa sellowiana* menunjukkan bahwa penggunaan NH_4^+ dan NO_3^- pada konsentrasi 15 : 34 dan 34 : 15 mM dengan menggunakan medium LPM dapat menghasilkan jumlah embrio somatik terbanyak/eksplan. Penambahan glutamin 4 mM menghasilkan induksi kalus embriogenik tertinggi. Penggunaan NO_3^- (49 mM) sebagai sumber N tunggal menghasilkan jumlah embrio somatik yang rendah, tetapi ketika ke dalam media ditambahkan glutamin (4 mM) maka jumlah embrio somatik meningkat hingga 5,8 kali setelah 10 minggu. Sedangkan apabila NH_4^+ digunakan sebagai sumber N tunggal ternyata tidak terbentuk embrio somatik, selain itu laju pertumbuhan kalus rendah dan kalus berwarna coklat.

Induksi embrio somatik dipengaruhi oleh pH media kultur. Penggunaan NO_3^- meningkatkan pH melalui ekskresi HCO_3^- dari eksplan, sebaliknya pemakaian NH_4^+ akan menurunkan pH. Dalam penelitian tersebut juga diteliti penggunaan beberapa sumber asam amino terhadap pembentukan embrio somatik. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penggunaan asparagin,

glutamin, dan arginin sebesar 4 mM dapat meningkatkan jumlah embrio somatik dibandingkan dengan kontrol, walaupun tidak ada perbedaan yang nyata di antara respon penggunaan ketiga asam amino tersebut. Menurut Lea (1993) dalam Vesco dan Guerra (2001) nitrogen yang berasal dari asam amino diasimilasikan dengan cepat menjadi karbon skeleton selama metabolisme dan digunakan untuk sintesis protein. Selain itu, asam amino dapat meningkatkan perkembangan yang sinkron (*synchronous development*) menjadi torpedo dan kotiledon.

Selain nitrogen, gula merupakan salah satu komponen organik yang harus diberikan ke dalam media tumbuh. Gula berfungsi di samping sebagai sumber karbon, juga berguna untuk mempertahankan tekanan osmotik media. Anahazhagan dan Ganapathi (1999) melakukan penelitian tentang embriogenesis somatik dalam kultur suspensi pigeonpea (*Cajanus cajan*). Dalam penelitian tersebut dilihat pengaruh beberapa jenis gula (glukosa, fruktosa, maltosa) terhadap pembentukan embrio somatik (Tabel 1).

Dari Tabel 1 terlihat bahwa penambahan sukrosa ke dalam medium kultur dapat menghasilkan jumlah embrio somatik terbanyak dibandingkan dengan sumber gula lain. Selain itu, terlihat bahwa pemakaian sukrosa dengan konsentrasi 87,64 mM dapat menginduksi pembentukan embrio somatik tertinggi, masing-masing pada tahap globular (36,2%), hati (20,4%), dan torpedo (16,4%).

Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa organik yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan kultur. Promotor yang digunakan antara lain auksin (2,4-D, 3,5-T, picloram, dan NAA), sitokinin (BA, kinetin, dan adenin sulfat), GA₃, dan inhibitor ABA. Konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan tergantung pada tahap perkembangan yang terjadi.

TAHAP PERKEMBANGAN EKSPLAN MEMBENTUK EMBRIO SOMATIK

Hamama *et al.* (2001) melakukan penelitian tentang pembentukan embriogenesis somatik dengan

menggunakan jaringan daun jorjor (*Simmondsia chinensis*) sebagai eksplan. Penelitian terdiri dari dua tahap, yaitu (1) induksi kalus embriogenik dan (2) pendewasaan dan perkecambahan. Media dasar yang digunakan adalah MS ½ dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh (2,4-D dan BA) dan dua jenis sitokinin sintetik (CPPU dan F3iP) pada beberapa taraf konsentrasi (Tabel 2, 3, dan 4).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi kalus embriogenik, pendewasaan embrio somatik dan perkecambahan membutuhkan kombinasi auksin dan sitokinin yang berbeda. Induksi kalus tertinggi dari jaringan daun dihasilkan dari perlakuan 2,26 µM 2,4-D + 2,22 µM BA. Penggunaan 1,35-4,52 µM 2,4-D dikombinasikan dengan sitokinin (BA, CPPU, F3iP) pada konsentrasi rendah dapat menstimulasi produksi kalus embriogenik (Tabel 2). Setelah dilakukan 2 kali subkultur mulai terbentuk struktur proembrio (proembrio mass). Pembentukan proembrio terbanyak dihasilkan dengan menggunakan kombinasi 2,26 µM 2,4-D + 1,85 µM F3iP (Gambar 1A), selanjutnya proembrio berkembang (Gambar 1B-D).

Embrio somatik mulai terbentuk setelah dilakukan pemindahan pada media pendewasaan dan perkecambahan (Tabel 3 dan 4). Penggunaan media dasar MS ½ dan penambahan zat pengatur tumbuh dengan jenis dan konsentrasi yang tepat tampaknya dapat menginduksi pembentukan embrio somatik. Dalam hal ini media MS ½ + 3,44 µM IBA dan 0,44 µM BA merupakan media terbaik untuk menginduksi pendewasaan dan perkecambahan embrio somatik. Pada tahap ini terjadi pembelahan sel secara longitudinal dari 1 sel menjadi 6 sel hingga akhirnya terbentuk meristem tunas dan meristem akar (Gambar 2).

Tabel 1. Pengaruh penggunaan karbohidrat dan konsentrasi 2,4-D terhadap embriogenesis somatik pada kultur suspensi

Konsentrasi karbohidrat (mM)	Tahap embrio			
	Globular (%)	Hati (%)	Torpedo (%)	
Glukosa	55,49	2,4f	1,2h	1,2g
	110,99	6,8f	2,6h	2,4f
	166,48	10,2e	5,0f	4,2c
	221,98	13,6c	7,2d	6,4d
Fruktosa	55,49	6,2f	2,8g	2,4f
	110,99	12,4c	5,2f	4,6c
	166,48	6,4f	5,0f	4,2c
	221,98	2,4h	1,2h	1,2g
Sukrosa	29,21	12,4h	6,8c	6,2d
	58,43	20,2b	16,2b	14,6b
	87,64	36,2a	20,4a	16,4a
	116,86	12,6d	10,2c	8,4c
Maltosa	27,75	2,4h	1,2h	n.d.
	55,51	5,4g	2,6g	1,2g
	83,26	1,2i	n.d.	n.d.
	111,02	n.d.	n.d.	n.d.

Angka-angka dalam satu kolom yang diikuti huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT

Perlakuan terdiri atas 10 ulangan

Sumber: Anahazhagan dan Ganapathi (1999)

Tabel 2. Induksi kultur embriogenik

Zat pengatur tumbuh (μM)		Eksplan membentuk kalus (%)	Kalus membentuk kultur embriogenik (%)
Auksin	Sitokinin		
2,4 D	BA		
0,45	0,44	3,3 \pm 1,2	0,0
1,35	1,33	60,0 \pm 11,1	6,6 \pm 2,3
2,26	2,22	88,0 \pm 8,7	26,6 \pm 5,2
4,52	4,43	67,3 \pm 18,1	20,0 \pm 3,3
22,60	22,19	1,3 \pm 1,1	0,0
31,66	31,06	0,0	0,0
2,4 D	CPPU		
0,45	0,40	33,3 \pm 9,8	0,0
1,35	1,21	54,7 \pm 13,3	28,6 \pm 8,2
2,26	2,01	60,7 \pm 13,3	35,3 \pm 3,0
4,52	4,03	49,3 \pm 8,3	32,7 \pm 2,5
22,60	20,18	4,0 \pm 4,0	0,0
31,66	28,26	0,0	0,0
2,4 D	F3iP		
0,45	0,37	7,3 \pm 1,2	0,0
1,35	1,11	65,3 \pm 7,0	26,0 \pm 2,8
2,26	1,85	80,0 \pm 5,3	70,6 \pm 28,7
4,52	3,71	49,3 \pm 11,0	33,3 \pm 6,2
22,60	18,58	0,0	0,0
31,66	26,02	0,0	0,0

Potongan daun dikulturkan pada media MS $\frac{1}{2}$ yang diberi 0,45-31,66 μM 2,4-D dikombinasikan dengan 0,44-31,06 μM BA, 0,40-28,26 μM CPPU atau 0,37-26,02 μM F3iP. Pengamatan dilakukan pada umur 30 hari

Sumber: Hamama *et al.* (2001)

Tabel 3. Persentase kultur embriogenik yang membentuk embrio dewasa dan berkecambah setelah dipindah ke media MS $\frac{1}{2}$ dengan penambahan auksin yang berbeda serta dikombinasikan dengan sitokinin (percobaan 1)

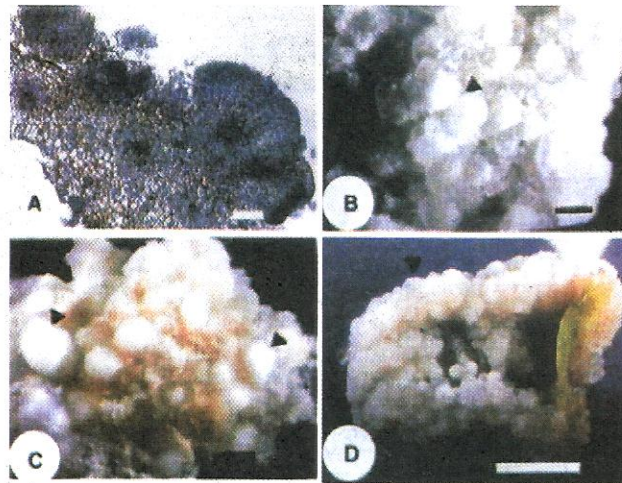
Zat pengatur tumbuh (μM)			Kalus embriogenik yang dipindahkan	Persentase embrio dewasa yang terbentuk	Persentase embrio yang berkecambah
Auksin	Sitokinin				
2,4-D 3,16	BA	1,33	82	1,2	0,0
	CPPU	1,22	74	1,3	0,0
	F3iP	1,11	65	3,1	0,0
NAA 3,75	BA	1,33	111	68,5	14,4
	CPPU	1,22	105	1,9	0,0
	F3iP	1,11	97	62,9	9,3
IBA 3,44	BA	1,33	103	67,0	13,6
	CPPU	1,22	78	10,2	0,0
	F3iP	1,11	82	54,9	12,2

Sumber: Hamama *et al.* (2001)

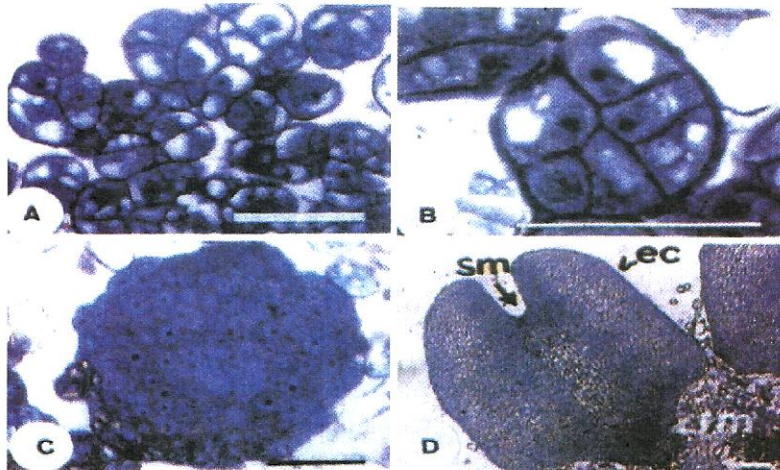
Tabel 4. Persentase kultur embriogenik yang membentuk embrio dewasa dan berkecambah setelah dipindah ke media MS $\frac{1}{2}$ dengan penambahan auksin yang berbeda serta dikombinasikan dengan sitokinin (percobaan 2)

Zat pengatur tumbuh (μM)			Kalus embriogenik yang dipindahkan	Persentase embrio dewasa yang terbentuk	Persentase embrio yang berkecambah
Auksin	Sitokinin				
2,4-D 3,16	BA	0,44	66	1,5	0,0
	CPPU	0,40	90	2,2	0,0
	F3iP	0,37	109	1,8	0,0
NAA 3,75	BA	0,44	132	68,9	9,8
	CPPU	0,40	135	10,4	2,2
	F3iP	0,37	130	51,5	6,9
IBA 3,44	BA	0,44	115	74,8	20,0
	CPPU	0,40	97	18,5	0,0
	F3iP	0,37	112	34,8	9,8

Sumber: Hamama *et al.* (2001)



Gambar 1. Pembentukan kultur embriogenik dari eksplan daun pada media MS ½ dengan penambahan 4,52 µM 2,4-D dikombinasikan dengan 3,71 µM F3iP (A,D), 4,43 µM BA (B) atau 4,03 µM CPPU (C) pada umur 60 hari



A = potongan jaringan kalus friabel yang terdiri atas sel-sel yang bersifat meristematik, B = pembelahan proembrio somatik membentuk satu, dua, tiga, dan empat sel, C = embrio globular pada tahap awal, D = pembentukan kotiledon dari embrio somatik

Gambar 2. Pemotongan longitudinal dari kalus embriogenik yang dipindahkan pada media pendewasaan dan perkecambah MS ½ yang diberi 3,44 µM IBA dan 1,33 µM BA pada 21 hari setelah perlakuan

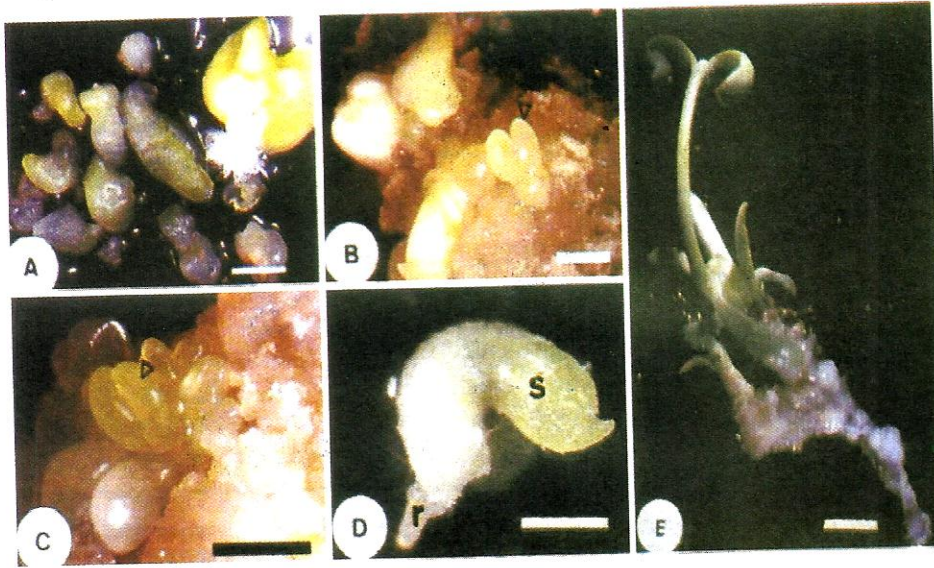
TAHAP PERKEMBANGAN EKSPLAN MEMBENTUK EMBRIO SOMATIK

Pada Gambar 3 diperlihatkan tahap perkembangan embrio somatik dari tahap globular, hati, torpedo, kotiledon, kecambah hingga terbentuk planlet. Penggunaan media yang tepat dapat menginduksi terjadinya seluruh tahap perkembangan embrio, sebaliknya pada media yang kurang sesuai tidak terlihat perkembangan embrio. Penggunaan auksin dikombinasikan de-

ngan sitokinin (BA, CPPU, dan F3iP) dapat menginduksi pembentukan kalus embriogenik, tetapi tidak dapat menginduksi perkembangan embrio somatik (Tabel 3 dan 4). Kombinasi zat pengatur tumbuh yang terbaik di mana dihasilkan kalus embriogenik yang dapat berkecambah adalah 3,44 µM IBA + 0,44 µM BA (Tabel 4).

Selanjutnya Hutami *et al.* (2001) melakukan penelitian tentang regenerasi tanaman pepaya (*Carica*

papaya L.) melalui jalur embriogenesis dengan menggunakan eksplan embrio zigotik muda dikombinasikan dengan penggunaan beberapa jenis zat pengatur tumbuh pada beberapa taraf konsentrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa formulasi media terbaik untuk induksi kalus embriogenik adalah MS + sukrosa 3% + vitamin B5 + 20 mg/l 2,4-D, sedangkan komposisi media terbaik untuk memproduksi embrio somatik dewasa dan bibit somatik



A = embrio somatik pada berbagai tahap perkembangan yang berbeda, dari perlakuan $3,75 \mu\text{M}$ NAA/ $0,44 \mu\text{M}$ BA, B = fase torpedo dari perlakuan $3,44 \mu\text{M}$ IBA/ $0,44 \mu\text{M}$ BA, C = fase kotiledon dari embrio somatik berasal dari perlakuan $3,44 \mu\text{M}$ IBA/ $0,37 \mu\text{M}$ F3iP, D = perkecambahan embrio dengan kotiledon dan akar primer, berasal dari perlakuan $3,75 \mu\text{M}$ NAA/ $0,37 \mu\text{M}$ F3iP, E = regenerasi plantlet dari embrio somatik berasal dari perlakuan $3,44 \mu\text{M}$ IBA/ $0,44 \mu\text{M}$ BA

Gambar 3. Perkembangan embrio somatik dan plantlet yang berasal dari embrio somatik setelah kalus embriogenik dipindah ke media pendewasaan dan perkecambahan

adalah MS + sukrosa 2% + $0,4 \text{ mg/l}$ BA + $0,1 \text{ mg/l}$ kinetin + 10 mg/l myoinositol + $0,1 \text{ mg/l}$ thiamin.

BEBERAPA GEN YANG BERPERAN DALAM PROSES EMBRIOGENESIS

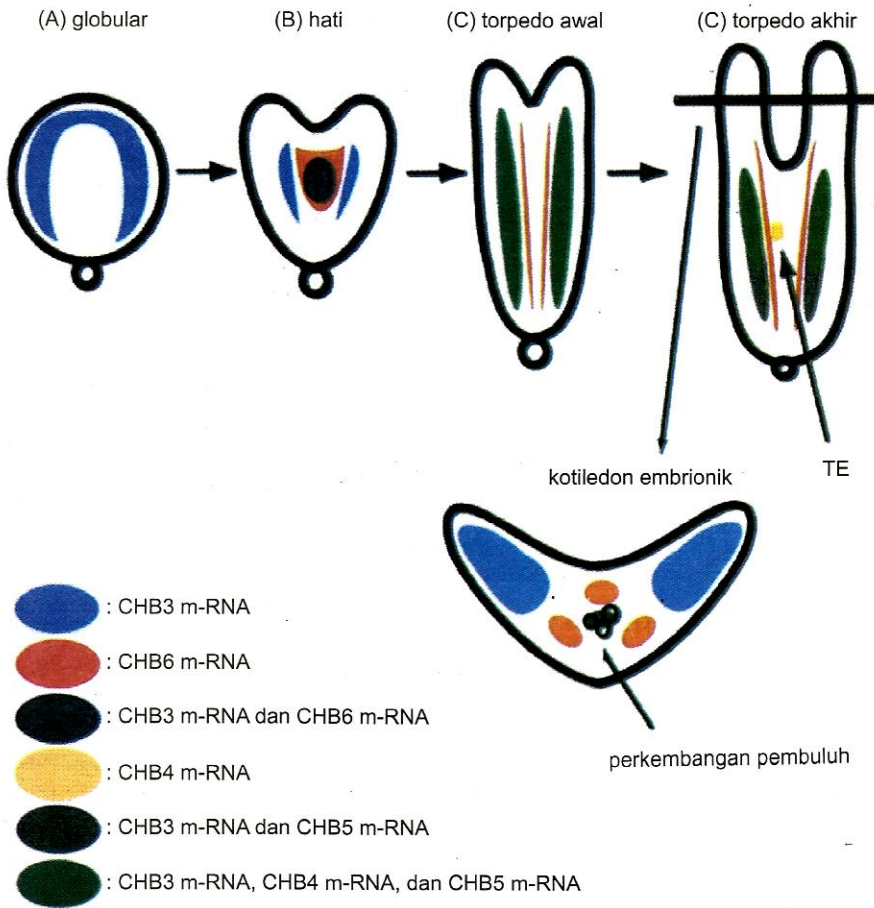
Proses pembentukan embriogenesis somatik dikendalikan oleh beberapa gen. Homeobox gene (HB) yang menyandi motif homeodomain (HD) pertama kali diidentifikasi sebagai wilayah sekuen yang terdiri dari beberapa gen yang terlibat dalam kontrol pengembangan *Drosophila* (Mc Ginnies *et al.*, 1984 dalam Hiwatashi dan Fukuda, 2000). HD protein dikenal sebagai *transcription factor* di mana HD merupakan sekuen yang berinteraksi dengan DNA.

Hiwatashi dan Fukuda (2000) mengisolasi 6 homeobox gen (CHBs) yang dikelompokkan sebagai famili HD Zip I dari embrio dan bibit wortel. Hasil analisis menunjukkan bahwa jumlah m-RNA dari gen CHB3, CHB4, CHB5, dan CHB6 meningkat sesuai dengan perkem-

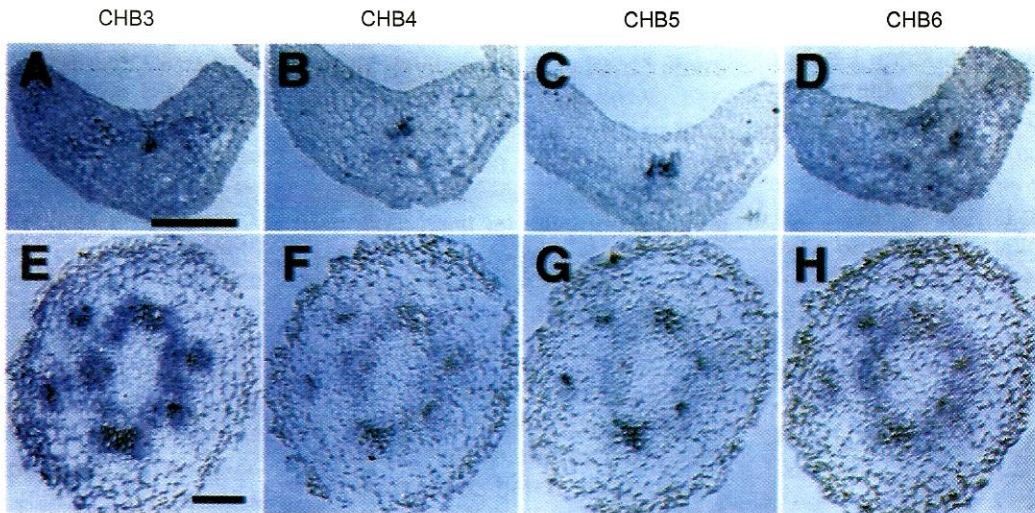
bangannya embrio somatik. Akumulasi m-RNA dari gen-gen tersebut tampak pada beberapa lokasi yang berbeda pada embrio dan bibit wortel sesuai dengan tahap perkembangannya. Pada embrio, akumulasi m-RNA dari CHB3 terlihat pada bagian aksis embrio pada fase globular, sedangkan pada awal fase hati sampai akhir torpedo, akumulasi m-RNA dari CHB3 tampak pada bagian paling dalam dari sel-sel korteks. Lapisan paling dalam dari sel-sel korteks tersebut berbeda dengan sel-sel korteks lain di mana lapisan tersebut banyak mengandung vakuola dan plastida. Lapisan ini akan berdiferensiasi membentuk sistem pembuluh. Ekspresi dari gen CHB4 dan CHB5 mulai terlihat pada fase torpedo. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekspresi gen CHB3, CHB4, dan CHB5 kemungkinan berhubungan dengan diferensiasi dari lapisan sel-sel korteks yang paling dalam. Peningkatan jumlah m-RNA dari gen CHB6 terlihat pada jaringan pembuluh yang masih muda dari fase hati

hingga terbentuknya embrio somatik. Hal ini menunjukkan bahwa gen CHB6 kemungkinan berhubungan dengan diferensiasi dan perkembangan sistem pembuluh. Secara skematik ekspresi dari keempat gen tersebut dan hubungannya dengan tahap perkembangan embriogenesis disajikan pada Gambar 4.

Pada organ kotiledon dan hipokotil, gen CHB3, CHB4, CHB5, dan CHB6 terekspresi dalam proses diferensiasi jaringan pembuluh. Hasil penelitian Hiwatashi dan Fukuda (2000) juga menunjukkan bahwa terlihat peningkatan jumlah m-RNA dari keempat gen pada jaringan pembuluh (Gambar 5). Pada kotiledon ekspresi gen CHB3 terdeteksi pada sel-sel pembuluh kotiledon yang berdiferensiasi, sedangkan pada hipokotil terlihat pada sel-sel korteks dan jaringan pembuluh muda yang berdiferensiasi.



Gambar 4. Akumulasi m-RNA dari CHB yang berbeda-beda selama embriogenesis somatik



(A), (B), (C), dan (D) = potongan melintang dari kotiledon embrionik; (E), (F), (G), (G), dan (H) = potongan melintang dari hipokotil dari bibit muda; (A) dan (E) = akumulasi m-RNA CHB3; (B) dan (F) = akumulasi m-RNA CHB4; (C) dan (G) = akumulasi m-RNA CHB5; (D) dan (H) = akumulasi m-RNA CHB6

Gambar 5. Lokalisasi m-RNA CHB pada kotiledon embrionik dan hipokotil dari bibit muda

KESIMPULAN

Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk penggandaan bibit bermutu dalam jumlah banyak adalah embriogenesis somatik.

Proses embriogenesis somatik dikendalikan oleh beberapa gen, yaitu CHB3, CHB4, CHB5, dan CHB6, di mana ekspresi masing-masing gen menentukan terjadinya tahap perkembangan embrio hingga terbentuk bibit somatik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ammirato, P.V. 1983.** Embryogenesis. In D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, and Y. Yamada (Eds.). Handbook of Plant Cell Culture 1:82-123.
- Anhazhagan, V.R. and A. Ganapathi. 1999.** Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of pigeon (*Cajanus cajan*). Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 56:179-184.
- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1989.** Plant tissue culture. Theory and Practise. Elsevier, New York.
- Gaj, M.D. 2001.** Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. Plant. Cell, and Organ Culture 64:39-46.
- Hamama, L., M. Baasiz, and R. Letouze. 2001.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of joba. Plant Cell and Organ Culture 65:109-113.
- Hiwatashi, Y. and H. Fukuda. 2000.** Tissue specific localization of m-RNA for carrot homeobox genes CHBs in carrot somatic embryos. Plant Cell Physiol. 41(5):639-643.
- Hutami, S., I. Mariska, R. Purnama-ningsih, M. Herman, D. Damayanti, and T.I.R. Utami. 2001.** Regeneration of papaya (*Carica papaya* L.) through somatic embryogenesis. Proc. of the 2nd Indonesian Biotechnology Conference. Indonesian Biotechnology Consortium. Jakarta.
- Vesco, L.L.D. and M.P. Gurerra. 2001.** The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. Plant, Cell, and Organ Culture 64:19-35.
- Wiendi, N.M.A., G.A. Wattimena, dan L.V. Gunawan. 1991.** Perbanyakan tanaman. Bioteknologi Tanaman I. PAU IPB. 507 hlm.