

PENGARUH SUKROSA DAN GLUTAMIN PADA KULTUR ANTER *Solanum khasianum* CLARKE

Djunaedi Gandawidjaja

Balitbang Botani, Puslitbang Biologi-LIPI

ABSTRACT

Effect of Sucrose and Glutamine on Anther Culture of Solanum khasianum Clarke, Djunaedi Gandawidjaja. Anther of Solanum khasianum Clarke were cultured on MS medium enriched with sucrose (30, 60, 75, 90 g/l) combined with glutamine (0, 200, 400, 600 mg/l) or with sucrose (60 g/l) combined with glutamine at low concentrations (0, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 mg/l). Callus formation was affected by the interaction of sucrose and glutamine. Callus formation decreased with the increasing concentration of sucrose or glutamine. Combination of sucrose and glutamine was unable to regenerate planlet from the callus.

Keywords: *Solanum khasianum*, anther, sucrose, glutamine, callus.

PENDAHULUAN

Kultur anter merupakan salah satu cara untuk mendapatkan tanaman haploid dan sangat membantu dalam upaya pemuliaan tanaman. Melalui tanaman haploid sifat-sifat resesif mudah dideteksi dan sifat fenotipe dari tanaman haploid merupakan gambaran dari sifat genotipnya (Owen, Veileux, Haynes dan Haynes, 1988).

Anter dari berbagai jenis tanaman baik monokotil (Martin dan Milo, 1983; Hinche dan Fitch, 1984; Hu dan Zeng, 1984; Powell, 1988) maupun dikotil (Redenbaugh, Westfall dan Karnosky, 1981; Hammerschlag, 1983; Thurling dan Chay, 1984) telah berhasil diregenerasikan menjadi tanaman. Anter dan suku Solanaceae termasuk paling tanggap terhadap perlakuan dalam kultur dan mudah diregenerasikan menjadi tanaman (Nitsch dan Nitsch, 1969, Sunderland dan Roberts, 1977; Reynolds, 1986), namun beberapa jenis dan galurnya ada yang kurang tanggap (Gresshoff dan Doy, 1972; Dunwell dan Sundertland, 1973).

Solanum khasianum Clarke merupakan tanaman pendatang yang dimasukkan ke Indonesia dari India pada tahun 1977 (Sudkrto, 1981; Sudiarto dan Rosita, 1982). *S. khasianum* merupakan salah satu tanaman penghasil solasodin. Solasodin adalah senyawa organik dengan struktur steroid tetapi bersifat alkaloid. Solasodin dapat dikonversikan menjadi senyawa pregnan dan digunakan sebagai salah satu bahan dasar dalam pembuatan pil kontrasepsi.

Keragaman pada jenis tanaman ini dapat dilihat baik dari segi morfologinya maupun dari segi fisiologinya. Pemanfaatan kultur anter dalam

upaya mencari kultivar yang sesuai dengan kebutuhan kiranya akan sangat membantu pengembangan komoditas ini. Sejauh ini pustaka mengenai kultur anter dari *S. khasianum* belum pernah ditemukan.

Gula dalam media kultur tidak hanya berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik tetapi juga merupakan sumber karbohidrat yang efektif (Hu dan Zeng, 1984). Keller, Rajhathy dan Lacapra (1975) menyatakan bahwa sukrosa merupakan sumber gula terbaik dibanding dengan glukosa, maltosa atau rafinosa. Mereka juga menyatakan bahwa anter *Brassica campestris* membutuhkan konsentrasi gula yang tinggi bagi pertumbuhan dan perkembangannya dalam kultur. Apabila konsentrasi gula dalam kultur kurang dari 6 persen (60 g/l media) maka tidak akan terbentuk embrioid, sedangkan pada konsentrasi gula 2 persen terbentuk kalus dari filamen dan dinding anter. Peningkatan konsentrasi gula dalam media kultur ternyata menghambat pembesaran sel somatik dan pembentukan kalus dan sel-sel somatik tetapi merangsang pembelahan sel dari polen. Frekwensi pembentukan embrioid tertinggi didapatkan pada perlakuan dengan kandungan gula sebanyak 10 persen (100 g/l media). Wakupun demikian temyata perkembangan embrioid selanjutnya hanya bisa berlangsung dalam media dengan kadar gula rendah (2 persen) dan tanpa zat pengatur tumbuh. Sebaliknya Redenbaugh, Westfall dan Karnosky (1981) mendapatkan bahwa pembentukan planlet dihaploid pada kultur anter *Ulmus americana* makin meningkat akibat interaksi antara kandungan gula dan zat pengatur tumbuh dalam media kultur.

Pierik (1987) menyatakan bahwa kandungan gula dalam media kultur pada umumnya berkisar antara 2 - 4 persen, tetapi untuk jenis-jenis tanaman tertentu kadar gula ini bisa lebih tinggi. Hu dan Zeng (1984) mendapatkan bahwa untuk sereal kandungan gula tertinggi dalam media kultur bisa sampai 0.35 M (118 g/l). Pada kultur anter *triticale* (gandum-gandum) pembentukan kalus jauh lebih baik pada perlakuan dengan kandungan gula 100 g/l dibanding dengan kandungan gula 60 g/l media. Gandawidjaja (1992, 1993) mendapatkan regenerasi tanaman pada pemindahan kalus anter *S. khasianum* dari media kultur dengan konsentrasi sukrosa 60 g/l ke dalam media kultur dengan sukrosa 30 g/l media.

Dari kelompok asam-asam organik diketahui bahwa glutamin atau L-asparagin dengan konsentrasi 1×10^{-4} M sampai 3×10^{-3} M dalam media kultur dapat merangsang pembentukan planlet. Sebaliknya L-arginin atau adenin dengan konsentrasi 1×10^{-4} M sampai 4×10^{-4} M bersifat menghambat (Nitsch dan Nitsch, 1969). Keller *et al* juga melaporkan bahwa perkembangan embrioid kultur anter *Brassica campestris* dirangsang oleh glutamin.

BAHAN DAN METODA

Selain sukrosa diketahui pula bahwa penambahan glutamin ke dalam media kultur dapat merangsang pembentukan planlet (Nitsch dan Nitsch, 1969; Keller *et al*, 1975). Dalam percobaan ini dicoba perlakuan kombinasi sukrosa dengan glutamin. Susunan percobaan adalah 2^4 faktorial dengan rancangan acak lengkap (RAL). Faktor pertama berupa empat taraf konsentrasi sukrosa, yaitu 30, 60, 75 dan 90 g/l media. Faktor kedua berupa empat taraf konsentrasi glutamin yang ditambahkan ke dalam media kultur, yaitu 0, 200, 400 dan 600 mg/l media kultur. Di samping itu dicobakan juga pemberian glutamin pada konsentrasi 0.5-5.0 mg/l dengan konsentrasi sukrosa 60 g/l media kultur.

Sebagai media kultur dipilih media MS. Ke dalam media ditambahkan NAA sebanyak 0.1 mg/l, BA sebanyak 2 mg/l dan agar sebanyak 6 g/l. Keasaman media sekitar 5.8 sebelum disterilkan. Sebanyak 6 ml media kultur dituangkan ke dalam tabung kultur berukuran 1 x 16 cm dan ditutup dengan kertas timah. Medium disterilkan dalam autoclave pada tekanan sekitar 15 psi selama 25 menit.

Bunga yang berukuran panjang 4.5 - 5.0 mm setelah disimpan selama 48 jam pada suhu 100C disterilkan dalam larutan clorox 25 persen selama 25 menit. Tabung kultur ditempatkan pada rak yang mendapat penyinaran 16 jam terang dan 8 jam gelap dari dua buah lampu tabung 40 watt dengan jarak vertikal 50 cm dari dasar rak. Tiap perlakuan terdiri dari 5 tabung dan diulang empat kali. Suhu ruangan berkisar antara 31 ° C pada siang hari dan 26°C pada malam hari.

Pengamatan dilakukan selama tiga bulan. Unsur unsur yang diamati meliputi perubahan warna dan anter, jumlah anter yang berhasil tumbuh/berkembang, bentuk pertumbuhan/ perkembangan dari anter dan morfologi bentuk pertumbuhan/perkembangan anter.

HASIL

Pembentukan kalus dari anter yang dikulturkan pada umumnya terjadi antara minggu ketiga sampai minggu keempat terhitung sejak anter dikulturkan. Morfologi kalus yang terbentuk yaitu amorf dengan tekstur longgar. Pada awal pemunculannya kalus berwarna pucat dan berangsur-angsur menjadi kehijauan terutama pada bagian dasarnya.

Jumlah kalus yang terbentuk semakin sedikit dengan semakin tingginya konsentrasi sukrosa dalam media kultur (Tabel 1). Secara statistik konsentrasi sukrosa sebanyak 90 g/l media kultur menghasilkan jumlah kalus paling sedikit dan berbeda nyata dari pada perlakuan dengan konsentrasi sukrosa 30 g/l media kultur (Tabel 2 dan Gambar 2). Demikian juga saat mulai terbentuknya kalus cenderung semakin lambat dengan semakin tingginya kadar sukrosa dalam media kultur.

Penambahan glutamin ke dalam media kultur pada batas konsentrasi yang dicoba tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata baik terhadap jumlah rata-rata pembentukan kalus maupun terhadap pola peretumbuhan dan perkembangan kalus. Jumlah pembentukan kalus pada perlakuan tanpa glutamin secara keseluruhan relatif lebih banyak dari pada perlakuan dengan glutamin (Tabel 1 dan Gambar 1).

Interaksi antara sukrosa dengan glutamin menunjukkan bahwa tampaknya peran sukrosa terhadap pembentukan kalus lebih dominan dibanding dengan peran glutamin. Penggunaan glutamin pada konsentrasi tinggi harus disertai pemberian sukrosa pada konsentrasi rendah (30 g/l (tabel 1 Gambar 3).

Tabel 1. Jumlah kalus yang terbentuk pada pedakuan kombinasi sukrosa dengan glutamin

Glutamin Sukrosa	Omg/l	200 mg/l	400 mg/l	600mg/l
30g/l	24	24	14	26
60g/l	18	10	13	11
75g/l	14	16	8	9
90g/l	14	2	2	6

PEMBAHASAN

Pemilihan bunga dengan ukuran panjang 4,5- 5,0 mm didasarkan pada hasil pemeriksaan secara empiris. Pada bunga seukuran tersebut polen berada pada stadia beinti satu (uninucleate). Berdasarkan hasil berbagai percobaan kultur anter dari berbagai jenis tanaman, polen pada stadia berinti satu adalah yang paling banyak berhasil meregenerasikan tanaman dibanding polen pada stadia lain.

Pembentukan sel-sel baru pada kalus terjadi pada bagian permukaan sehingga sel-sel yang tua berada di lapisan bawah. Semakin tua sel semakin lengkap komponennya dan semakin tinggi aktivitasnya, termasuk kegiatan fotosintesis. Akibatnya semakin tua sel semakin tinggi pula kandungan klorofilnya dan karena itu maka sel-sel yang berada di bagian bawah kalus tampak berwarna hijau.

Tabel. Uji kehomogenan pembentukan kalus antar pedakuan kombinasi sukrosa dengan glutamin

Sukrosa mg/l	Glutamin mg/l	Pembentukan kalus		
		(+)	(-)	Total
		Pengamatan	Pengamatan	
30	9	24 (13.19)	6 (16.81)	6 (16.81)
60	0	18 (13.19)	12 (16.81)	12 (16.81)
75	0	14 (13.19)	16 (16.81)	16 (16.81)
90	0	14 (13.19)	16 (16.81)	16 (16.81)
30	200	24 (13.19)	6 (16.81)	6 (16.81)
60	200	10 (13.19)	20 (16.81)	20 (16.81)
75	200	16 (13.19)	14 (16.81)	14 (16.81)
90	200	2 (13.19)	28 (16.81)	28 (16.81)
30	400	14 (13.19)	16 (16.81)	16 (16.81)
60	400	13 (13.19)	17 (16.81)	17 (16.81)
75	400	8 (13.19)	22 (16.81)	22 (16.81)
90	400	2 (13.19)	28 (16.81)	28 (16.81)
30	600	26 (13.19)	4 (16.81)	4 (16.81)
60	600	11 (13.19)	19 (16.81)	19 (16.81)
75	600	9 (13.19)	21 (16.81)	21 (16.81)
90	600	6 (13.19)	24 (16.81)	24 (16.81)
Total		211 (211.00)	269 (269.00)	480 (480.00)

Chi-kuadrat = 107.224, D.B.= 15, Prob. = 4.486E-07 (Angka dalam kurung menunjukkan nilai harapan)

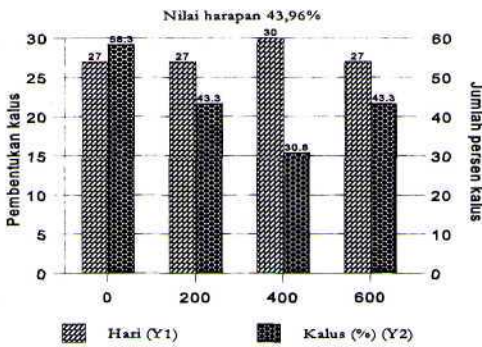
Konsentrasi sukrosa yang tinggi dalam media kultur dapat menghambat pertumbuhan sel-sel somatik tetapi sebaliknya dapat merangsang pertumbuhan sel-sel generatif (polen). Pemeriksaan sitologi kalus dari anter yang ditumbuhkan pada berbagai konsentrasi sukrosa tidak menunjukkan adanya sel haploid. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun pada konsentrasi gula tinggi (90 g/l) telah terjadi penghambatan pembentukan kalus dari sel

somatik namun juga tidak merangsang pertumbuhan sel-sel generatif. Rendahnya jumlah pembentukan kalus pada media kultur dengan konsentrasi sukrosa tinggi diduga akibat tekanan osmotik yang semakin tinggi dan telah menyebabkan kematian sel-sel terutama sel - sel pada dinding anter.

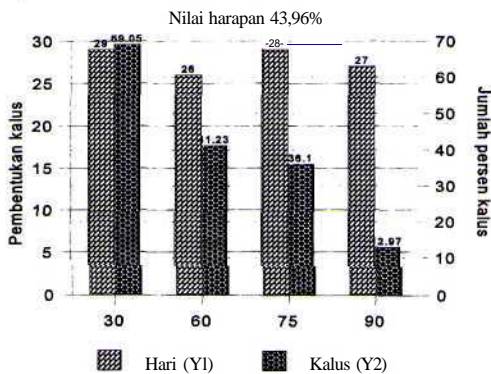
Usaha meregenerasikan kalus dengan memin-dahkannya ke dalam media regenerasi yang pernah berhasil meregenerasikan tanaman (Gandawidjaja,

, 1993) atau ke dalam media yang telah dimodifikasi tetap tidak berhasil. Kondisi kultur yang mampu merangsang perkembangan kalus menjadi planlet masih harus dicari.

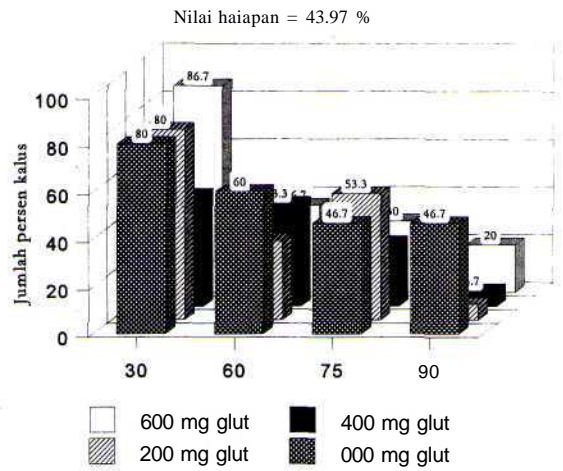
Pemberian glutamin pada konsentrsai rendah, yaitu 0,5 sampai 50 mg/l media kultur dengan sukrosa 60 g/l juga tidak menghasilkan bentuk pertumbuhan dan perkembangan kalus yang berbeda. Jumlah pembentukan kalus cenderung meningkat sampai pada pemberian glutamin sebanyak 10 mg/l media kultur, selanjutnya terlihat menurun lagi (Gambar 4). Dapat disimpulkan bahwa pemberian glutamin pada konsentrasi rendah cenderung merangsang pembentukan kalus sedangkan pada konsentrasi tinggi bersifat menghambat.



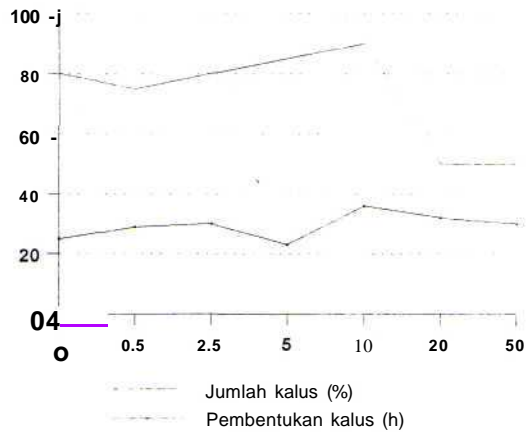
Gambar 1. Hubungan antara konsentrasi glutamin dengan rata-rata jumlah kalus dan awal pembentukan kalus.



Gambar 2. Hubungan antara konsentrasi sukrosa dengan rata-rata jumlah kalus dan awal pembentukan kalus.



Gambar 3. Pengaruh interaksi antara sukrosa dengan glutamin terhadap jumlah pembentukan kalus.



Gambar 4. Hubungan antara konsentrasi glutamin dengan rata-rata jumlah kalus dan awal pembentukan kalus.

Pemeriksaan sitologi dari kalus menunjukkan bahwa jumlah kromosom pada kalus adalah $2n = 24$, artinya tingkat ploidi sel kalus sama dengan ploidi sel somatik. Pemeriksaan preparat irisan dari anter yang sedang membenruk kalus memperlihatkan bahwa sel-sel kalus tersebut berasal dari sel-sel somatik pada dinding anter.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa pemberian sukrosa dan glutamin yang dimaksudkan untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan sel-sel generatif dan menghambat pertumbuhan sel-sel vegetatif ternyata tidak efektif. Efek penghambatan pertumbuhan sel-sel somatik dari anter akibat peningkatan konsentrasi sukrosa atau glutamin memang terjadi tetapi sebaliknya pengaruhnya terhadap perangsangan pertumbuhan sel-sel generatif tidak terlihat.

Pemberian sukrosa di atas 60 g/l media kultur atau glutamin pada konsentrasi tinggi dalam hal ini tidak pedu. Pengaruh sukrosa terhadap pembentukan kalus lebih menonjol dibanding dengan pengaruh glutamin. Upaya terbaik untuk menghindarkan pertumbuhan dari sel somatik adalah dengan cara kultur polen. Namun tampaknya polen dari anter *S. khasianum* hanya bisa dilepas apabila dikocok dalam media cair. Betapapun tuanya anter *S. khasianum* tidak pernah pecah dalam kondisikultur *in vitro*. Tentunya kondisi kultur polen lebih khusus dibanding kondisi kultur anter.

Manipulasi berbagai unsur hara dan zat pengatur tumbuh serta faktor lingkungan tampaknya masih harus dikaji untuk mendapatkan androgenesis dari anter *S. khasianum*.

DAFTAR PUSTAKA

- Dunwell JM and Sunderland N. 1973.** Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica* **22**: 317-323.
- Gandawidjaja D. 1992.** Petumbuhan dan Perkembangan Anter *Soalnum khasianum* Clarke dalam Kultur in-vitro. Disertasi S3, Program Pascasarjana-Institut Pertanian Bogor, III halaman.
- Gandawidjaja D. 1993.** Pembentukan kalus dan regenerasi tanaman dari anter *Solanum khasianum* Clarke dalam kultur in-vitro. *Makalah pada Seminar Nasional Biologi XI*, Ujungpandang, -20-21 Juli 1993.
- Gresshoff PM and Doy GH . 1972.** Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta (Bed)* **107**: 161 - 170.
- Hammerschlag F A. 1983.** Factors influencing the frequency of callus formation among cultured peach anthers. *HortSd.* 18:210 - 211.
- HincheeMAW and Fitch MM. 1984.** Culture of isolated microspores of *Saceharum spontaneum*. *Z. PflPhjsioL Bd.* **113 S.**: 305 - 314.
- Hu H and Zeng JZ . 1984.** Development of new varieties via anther culture. In: *Handbook of Plant Cell Culture* Vol 3 , pp. 65 - 90. Macmillan Co. New York.
- Keller WA, Rajhathy T and LacapraJ . 1975.** In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Can. J. Genet. Cytol.* **17**: 655 - 666.
- Martin MJC and Millo EP . 1981.** Anther and pollen grain culture of rice [*Oryza sativa* L.]. *Euphytica W*: 541 -546.
- Nitsch JP and Nitsch C. 1969.** Haploid plants from pollen grains. *Science* **163**: 85 - 87.
- Owen HR, Veilleux RE, Haynes FL and Haynes KG . 1988.** Variability of critical photoperiod of tuberization and tuber yield among monoploid anther-derived genotype of *Solanum phureja*. *J. Amer. Soc. Hort. Sd.* **113**: 755 - 759.
- PierikRLM. 1987.** In vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht etc. 344 pp.
- Powell W. 1988.** The influence of genotype and temperature treatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **12**:291 -297.
- Powell W and Uhrig H. 1987.** Anther culture of *Solanum* genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **11**: 13 - 24.
- Redenbaugh MK, Westfall RD and Karnosky DF. 1981.** Dihaploid callus production from *Ulmus atericana* anthers. *Bot. Ga%* **142**: 19 - 26.
- Reynolds TL. 1986.** Pollen embryogenesis in anther cultures of *Solanum carolinense* L. *Plant Cell Reports* **5**: 273 -275.
- Sudiarto. 1981.** Percobaan penanaman tanaman sumber diosgenin dan solasodin (Experiment on cultivation of diosgenin and solasodin yielding plants). *Makalah dalam Seminar Nasional Produksi Bahan Baku Kontraseptif Oral*, 23-25 Juni.
- Sudiarto dan Rosita MD . 1982.** Usaha penyediaan bahan baku kontraseptif oral. Suatu usaha swasembada dalam rangka mensukseskan Program Keluarga Berencana Nasional. *Jurnal PeneMan & Pengembangan Pertanian* **1 (I)** :41 - 44.
- Sunderland N and Roberts M . 1977.** Anther and pollen culture. *Nature* **270**: 236 - 238.
- Thurling N and Chay PM . 1984.** The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Ann. Bot.* **54**: 681 - 693.