

**PERAKITAN VARIETAS UNGGUL
ANGGREK TANAH (*Spathoglottis
Bintang Segunung*) DOUBLE
HAPLOID DENGAN KULTUR
OVARIUM**

**Agus Setiawan, Aminin, Jaova Layla,
Muhammad Nabil, Monika Bataona,
Endang Semiarti**

Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada
email: agussetiawanpone@gmail.com

Abstract

*A rapid and efficient micropropagation method was established for produced cloning of Orchid Hybrid *Spathoglottis Bintang Segunung* from Indonesia. The aim of this research was to optimize effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), cold shock, and 6-Benzylaminopurine (BAP) to plantlet regeneration from ovarium culture and analyse the ploidy using flow cytometry. Ovarium explants from shut flower stalk were cultured on Vacin and Went (VW) medium supplemented with 2,4-D at 5 concentrations (0.01-1 ppm) and cold shock treatment after cultured at 3 variations 10oC (0, 2, and 4 h) and then incubate the explants in room with 24 photoperiodization ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). After 10 days, while ovarium explants were subcultured on VW supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) (2.5 ppm) for 2 weeks. Further, ovarium explants were subcultured again on VW medium with filtered coconut water (150 ml/L). Regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) and subsequent plantlet development were observed from on VW+ 1 ppm 2,4-D (Sig= 2%)+ 4h cold shock 10oC (Sig= 2%) dan 2,5 ppm BAP. The optimized procedure required about 2 months from cultured of the ovarium explant to plantlet formation. The peak from the histogram of flow cytometry showed that ovarium cultured of *S. Bintang Segunung* (CV= 4,35%) and leave of *S. Bintang Segunung* (CV= 5,19%) were the same triploid. The protocol of this experiment could produce the uniform plantlets and expected to initiate the regeneration of ovul cell which need more studying for the medium optimization.*

Keywords: *Spathoglottis Bintang Segunung, flow cytometry, ovarium cultured*

1. PENDAHULUAN

Anggrek merupakan tanaman hias florikultura bernilai ekonomis tinggi dengan ragam bentuk, warna dan aroma (Semiarti dkk., 2010). Dari 20.000 spesies anggrek di dunia, Indonesia memiliki 5.000 spesies anggrek alam (Irawati, 2002) yang sangat potensial untuk dikembangkan. Berdasarkan persilangan intragenerik yang dilakukan oleh Kartikaningrum dkk. (2004) diperoleh anggrek *Spathoglottis* unggul yang diberi nama *Spathoglottis Bintang Segunung* dengan SK Mentan 506Kpts /PD.210/10/2003. Namun anggrek ini bersifat inkompatibelitas karena tidak dapat disilangkan (steril) (Setiawan dkk., 2013), sehingga proses perbanyakan hanya dapat dilakukan dengan split pseudobulb. Oleh karenanya varietas ini belum dapat diproduksi secara massal hingga perlu dilakukan inovasi perbanyakan tanaman anggrek secara klon dan atau perakitan varietas anggrek homozigot double haploid.

Kultur ovarium tanaman dapat dilakukan secara in-vitro menggunakan medium Vacin and Went (VW) dengan perlakuan *cold shock* dan kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid serta 6-Benzylaminopurine (Svirshevskaya and Dolezel, 2000; Shalaby, 2007; Bouatrous et al., 2010). Kultur ovarium dapat menginduksi tanaman haploid (n) yang steril apabila sel yang berkembang menjadi plantlet adalah sel sel ovul, sehingga harus dihaploidisasi menggunakan kolkisin untuk mendapatkan tanaman fertil double haploid. Namun sel somatik juga mampu beregenerasi menjadi plantlet yang diploid (2n). Ploidi plantlet yang berkembang dari hasil kultur ovarium dievaluasi menggunakan metode Flow Cytometry. Dari penelitian ini, diharapkan dapat diperoleh varietas baru Anggrek Tanah hibrid (*Spathoglottis Bintang Segunung*). Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui konsentrasi optimal senyawa 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) serta pengaruh stressing cold shock dalam menginduksi plantlet pada kultur ovarium Anggrek Tanah hibrida (*Spathoglottis Bintang Segunung*), mengetahui konsentrasi optimal 6-Benzylaminopurine (BAP) dalam

menginduksi embriogenesis Protocorm like-bodies (PLB) Anggrek Tanah hibrida (Spathoglottis Bintang Segunung) hasil kultur ovarium, dan mengetahui tingkat ploidi sel tanaman hasil *kultur* ovarium Anggrek Tanah hibrid (Spathoglottis Bintang Segunung) menggunakan Flow Cytometry.

2. METODE

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Desember 2013 sampai Maret 2014 di Laboratorium Genetika, Laboratorium Bioteknologi, dan Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan (SPT) Fakultas Biologi UGM, serta Laboratorium Genetika Tumbuhan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor. Tahapan awal yang dilakukan yaitu koleksi anggrek Spathoglottis Bintang Segunung, dan karakterisasi bunga Spathoglottis Bintang Segunung dari Balai Penelitian Tanaman Hias (BALITHI) Cianjur.

Kultur Spathoglottis Bintang Segunung dilakukan menggunakan ovarium bunga anggrek Spathoglottis dari green house lalu disterilisasi menggunakan akuades nonsteril 30 ml dan 3 tetes larutan Tween 20 (10 menit) dengan penggojokan secara perlahan, proses ini dilakukan di Laminar Air Flow (LAF). Larutan kemudian dibuang pada wadah limbah yang telah diletakkan di dalam LAF, dan eksplan dibilas menggunakan akuades steril sambil digojok perlahan selama 3 menit dengan 3 kali pengulangan. Setelah sisa larutan dibuang kemudian eksplan disterilisasi secara kimiawi menggunakan larutan HgCl (0,2%) selama 10 menit sambil digojok secara perlahan, dan selanjutnya larutan HgCl dibuang pada wadah limbah dan eksplan dibilas kembali menggunakan akuades steril selama 3 menit sambil digojok dengan 3 kali pengulangan. Eksplan yang telah disterilisasi kemudian dipindah ke dalam petri dish yang telah dilapisi dengan kertas saring steril. Bagian apikal dan basal ovarium dipotong kemudian ovarium dibagi menjadi 4 bagian lalu dijadikan sebagai ulangan dan ditanam pada medium VW (pH= 5,7-5,8, gellan gum= 2 gr/L, sukrosa= 20 gr/L) dengan kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4-D yang digunakan yaitu 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, dan 1 (ppm) pada medium VW. Setelah itu tiap petri yang telah ditanami diberi perlakuan

cold shock pada suhu 10°C dengan variasi penyimpanan 0, 2, dan 4 (jam), kemudian petri disimpan di ruang inkubator dengan pencahayaan 24 jam (suhu \pm 25°C). Pengamatan dilakukan setiap hari meliputi jumlah eksplan yang merakah, membentuk kalus, dan browning.

Proses preparasi kultur ovarium bunga Spathoglottis Bintang Segunung mengacu pada (Soeradikoesoemo, 2008) menggunakan metode Parafin yang telah dimodifikasi dengan pewarnaan tunggal di awal dengan safranin 1% (dilarutkan dalam alkohol 70%) 24 jam setelah eksplan difiksasi dengan FAA.

Induksi Embriogenesis Kalus anggrek Spathoglottis Bintang Segunung dilakukan pada hari ke 10 yaitu dengan melakukan subkultur eksplan ovarium ke medium VW dengan kombinasi hormon 6-Benzylaminopurine (BAP) 2½ (ppm) selama 2 minggu, apabila medium mengalami browning maka eksplan disubkultur pada medium baru. Lalu eksplan disubkultur kembali pada medium VW+150 ml/L air kelapa tua yang telah disaring dengan kertas saring sebanyak dua kali. Kemudian eksplan diamati tiap minggu hingga membentuk Protocorm-like bodies (PLB) lalu beregenerasi kembali menjadi plantlet. Plantlet yang telah mempunyai 3 daun dapat dipotong lalu disubkultur untuk regenerasi tanaman utuh.

Ploidi plantlet anggrek hasil dari kultur ovarium secara in-vitro dan tanaman kontrol dievaluasi menggunakan analisis flow cytometry yang dilaksanakan di Laboratorium Genetika Tanaman LIPI, Cibinong, Bogor. Prosedur pelaksanaan ini yaitu sampel invitroplant anggrek Spathoglottis Bintang Segunung di preservasi mengacu pada penelitian Kolar dan Lucanova (2010) yaitu sampel disuspensi menggunakan larutan Buffer Otto (Doležel et al., 2007). Siapkan petri dish diameter 3 cm lalu tambahkan larutan buffer Otto I (4.2 gr 0.1 M Citric acid monohydrate dan 1 ml 0.5% (v/v dalam 200 ml akuades) Tween 20) sebanyak 1 mL dalam kondisi dingin, masukkan sampel daun sebanyak 20 mg ke dalam petri dish lalu dipotong-potong (maksimal 1 menit) menggunakan scalpel hingga berukuran \pm 1 mm. Saring suspensi ke dalam tube 1,5 mL menggunakan filter nilon berukuran 30 μ m.

Sentrifuse suspensi pada kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit (4°C). Supernatan dibuang namun sisakan sekitar 100 µl larutan di atas pelet. Homogenasi inti dengan cara menyentil bagian bawah tube. Tambah larutan beffer Otto I (dingin) baru sebanyak 100 µl ke dalam tube. Selanjutnya tambah 1 ml larutan buffer Otto II (28.65 gr 0.4 M Na₂HPO₄.12H₂O dalam 200 ml akuades). Suspensi inti sel kemudian dipindah ke tabung yang akan digunakan untuk running pada alat flow cytometry. Larutan pewarna yang berisi Propidium Iodide (50 µg/ml)+RNase (50 µg/ml) sebanyak 1 ml (CyStain PI Absolut P, PARTEC), sampel diinkubasi pada kondisi gelap selama 5-15 menit, kemudian sampel di-running pada alat SyFlow (PARTEC). Apabila sampel mengalami browning maka sampel tidak bagus untuk dianalisis menggunakan flow cytometry.

Data induksi ginogenesis dari kultur ovarium dan induksi embriogenesis PLB dianalisis menggunakan software SPSS 2.0 untuk menentukan tabel ANAVA dan uji DMRT pada taraf kepercayaan 5%. Analisis ANAVA dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan perlakuan yang signifikan serta uji DMRT untuk menentukan perlakuan yang paling efektif.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

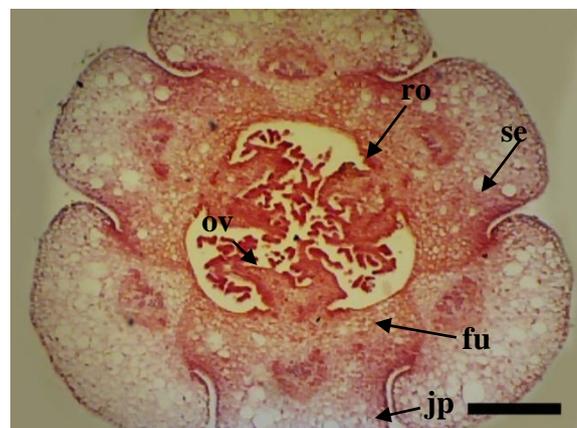
3.1 Kultur Ovarium Bunga *Spathoglottis Bintang Segunung*

Kultur ovarium anggrek dilakukan menggunakan medium *Vacin and Went* (VW) dengan penambahan variasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yaitu 2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D). Senyawa 2,4-D merupakan auksin sintetik yang mampu memacu pemanjangan dan pembelahan sel. Dengan penggunaan ZPT 2,4-D mampu mengubah takdir sel menjadi sel yang aktif membelah terus menerus tanpa diikuti proses diferensiasi sel seperti sel-sel penyusun funikulus, dinding dalam ovarium, dan sel telur. Perlakuan *cold shock* pada 10°C setelah dilakukan penanaman eksplan pada medium bertujuan untuk menghambat kinerja enzim fenolase yang dapat mensintesis senyawa fenolik yang menyebabkan *browning* pada eksplan. Eksplan yang mengalami *browning* akan terhambat perkembangannya lalu menyebabkan

kematian sel secara sistemik. Apabila sel telah mengalami kematian maka tidak akan diperoleh sel yang aktif membelah.

Eksplan ovarium anggrek yang dikultur apabila diamati struktur anatomisnya (Gambar 1) dikeathui bahwa terdapat banyak jaringan sekretoris pada bagian ovarium. Keuntungan lain dalam penggunaan *cold shock* adalah mampu menghambat ekskresi metabolit sekunder yang mungkin bersifat toksik pada kultur. Hal ini didasari dari tingginya laju kematian eksplan akibat *browning* (Tabel 1).

Parameter yang diamati dalam kultur ini yaitu jumlah eksplan ovarium yang mampu bertahan tanpa mengalami *browning*. Hasil analisis struktur anatomis ovarium bunga hari ke-4 eksplan ovarium mengalami pemanjangan sel yang ditandai dengan struktur menonjol yang keluar dari bagian ujung eksplan seperti pada Gambar 2 bagian A pada medium.



Gambar 1. Struktur anatomis melintang ovarium bunga anggrek *Spathoglottis Bintang Segunung*. (se) sel sekret, (ro) ruang ovarium, (fu) funikulus, (ov) ovulum, (jp) jaringan pengangkut. Bar: 400 µm.

VW+*cold shock*. Struktur ini oleh Kartikaningrum (2012) disebut sebagai eksplan yang sedang mekar. Data jumlah eksplan dengan pengulangan 4 kali yaitu jumlah eksplan yang mekar dan tidak mengalami *browning* dianalisis menggunakan software SPSS. Eksplan yang tidak mekar namun tidak mengalami *browning* tidak dihitung atau 0 begitu pula dengan eksplan yang mekar namun *browning*. Pada perlakuan ini diketahui bahwa penambahan 2,4-D dan

cold shock memberikan hasil yang signifikan berbeda dengan nilai signifikansi 2%, serta terdapat interaksi diantara keduanya dengan signifikansi 1.9%. Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa perlakuan terbaik dalam

menghasilkan jumlah eksplan yang mekar dan tidak mengalami *browning* adalah medium VW+2,4-D (1ppm)+2 jam *Cold Shock* (Tabel 1).

Tabel 1. Laju ketahanan eksplan ovarium *Spathoglottis* Bintang Segunung pada medium VW dengan perlakuan hormon 2,4-D dan Cold Shock

| Cold Shock (10° C) | 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) | | | | |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 0.01 ppm | 0.05 ppm | 0.1 ppm | 0.5 ppm | 1 ppm |
| 0 Jam | 0.00±0.00 ^a | 0.00±0.00 ^a | 0.00±0.00 ^a | 0.25±0.50 ^a | 0.50±0.57 ^a |
| 2 Jam | 1.00±0.00 ^b | 0.25±0.50 ^b | 0.50±0.57 ^b | 0.25±0.50 ^b | 0.75±0.50 ^b |
| 4 Jam | 0.25±0.50 ^b | 0.25±0.50 ^{*b} | 0.75±0.50 ^b | 0.5±0.57 ^{*b} | 1.00±0.00 ^{*b} |

Ket: ^a. Eksplan tidak merekah dan mengalami *browning*
^b. Eksplan merekah dan mengalami *browning*
^{*b}. Eksplan merekah dan tidak mengalami *browning*

Teng *et al.* (1997) melaporkan bahwa dengan induksi kalus melalui eksplan *seedling* dapat dilakukan dengan menggunakan *α-naphthalenic acid* (NAA) dan *6-benzylaminopurine* (BAP) dengan rasio perbandingan 12,2 dan 0,3-1,2. Berdasarkan penelitian tersebut *plantlet* anggrek baru dapat diperoleh pada bulan ke 3. Berbeda hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, dengan menggunakan eksplan ovarium bunga maka regenerasi eksplan membentuk *plantlet* dapat diperoleh pada akhir bulan pertama.

Hal ini berbeda dengan pada proses mikropropagasi yang dilakukan melalui *seedling* (daun, akar, dan batang) yang harus menginisiasi pembentukan sel meristematis dari sel yang telah mengalami diferensiasi terlebih dahulu yang membutuhkan waktu relatif lama, berbeda dengan eksplan yang bersumber dari ovarium bunga. Pada bagian ini terdapat banyak sel-sel yang meristematis, selain itu sel-sel pada bagian ovarium bunga anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung terdapat sel yang bersifat embrionik sehingga dapat langsung diinisiasi menjadi *plantlet* tanpa pembentukan kalus terlebih dahulu atau dalam waktu yang bersamaan.

Karakteristik sel meristematis dalam kultur ovarium dapat diamati melalui struktur anatomisnya yaitu pada bagian tengah ovarium (Gambar 1), sel yang bersifat meristematis terwarnai lebih gelap dengan menggunakan pewarnaan safranin. Sel meristematis

mempunyai ukuran sel yang lebih kecil dengan inti yang lebih besar. Pewarnaan safranin akan dapat berikatan pada inti lebih baik dibanding pada bagian dinding sel, sehingga sel dengan ukuran yang lebih kecil namun inti lebih besar (sel meristem) akan tervisualisasi lebih gelap dengan menggunakan mikroskop cahaya.

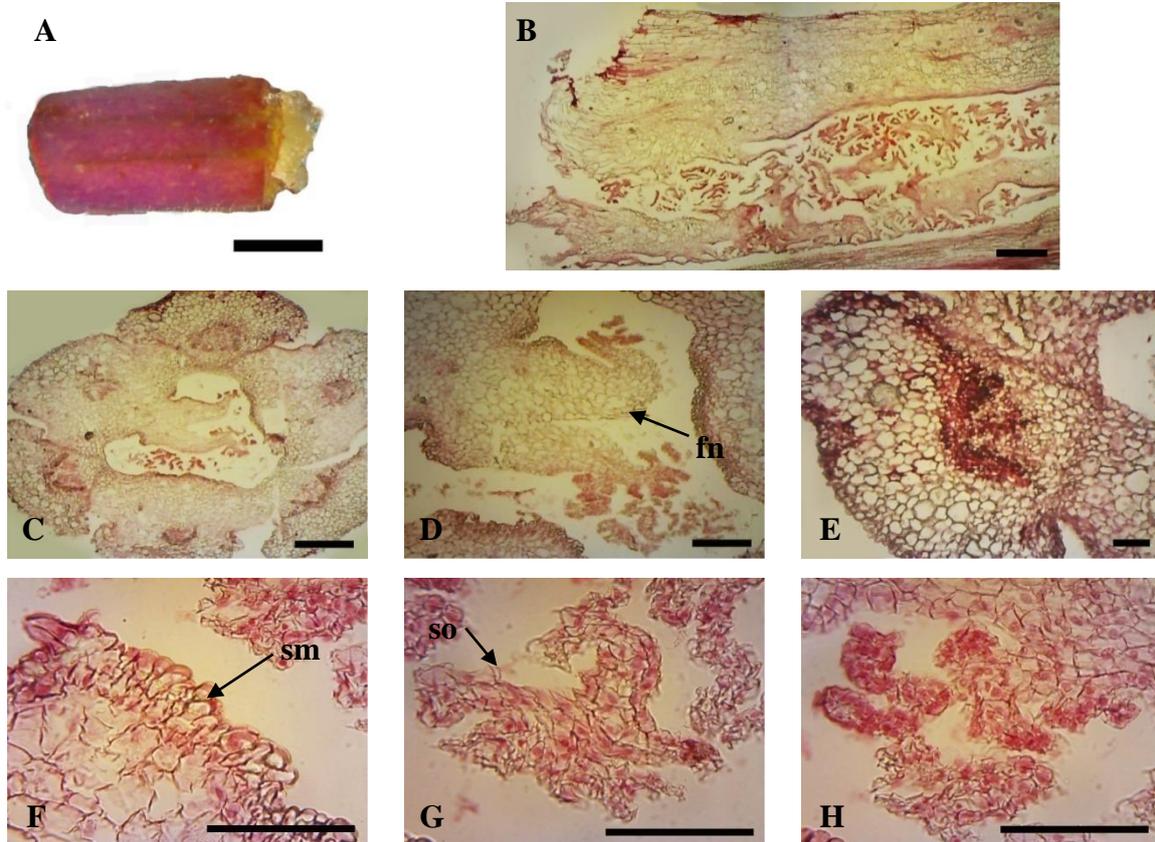
3.2 Struktur Anatomis Kultur Ovarium Bunga *Spathoglottis* Bintang Segunung

Eksplan kultur ovarium anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung dipreparasi selama 4 hari secara mikroteknik untuk mengamati struktur anatomisnya (Gambar 2). Pada bagian B (Gambar 2) merupakan struktur anatomis ovarium bunga secara membujur dan pada bagian C-H (Gambar 2) merupakan struktur melintang. Struktur sel-sel yang mengalami pemanjangan dan penambahan volume apabila diamati secara kualitatif dapat diamati pada bagian B dan F (Gambar 2) dan pada bagian G dan H (Gambar 2) menunjukkan penambahan volume dan struktur yang tidak beraturan pada sel ovulum.

Kultur *in-vitro* bagian ovarium anggrek dapat dilakukan tanpa menyebabkan kematian organ, hal ini dikarenakan pada medium *in-vitro* mengandung komposisi persenyawaan berupa nutrisi lengkap yang mampu diserap oleh sel tanpa melalui proses penyerapan menggunakan akar tanaman. Selain itu dalam medium juga telah terdapat sumber karbon yang dapat dimanfaatkan langsung oleh

tanaman, dalam kondisi ini tanaman bersifat heterotrof. Namun tidak semua organ tanaman mempunyai respon adaptasi terhadap kondisi *in-vitro* oleh karenanya banyak eksplan yang

mengalami kematian. Dalam penelitian ini kemungkinan tersebut mampu dicegah dengan perlakuan *cold shock*.



Gambar 2. Karakter struktur morfologis (A) dan (B-H) anatomis eksplan kultur ovarium anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung. (fn) funikulus, (sm) sel somatik, (so) sel ovul. (Bar: (A) 2 mm, (B-H) 100 μ m).

3.3 Induksi Embriogenesis Kalus *Spathoglottis* Bintang Segunung

Eksplan ovarium yang mampu bertahan pada medium VW+2,4-D akan menghasilkan kalus anggrek. Karakteristik kalus anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung adalah kompak dan berbentuk granula. Eksplan yang telah mampu beradaptasi kemudian dilakukan subkultur ke medium VW+BAP (2,5 ppm) selama 2 minggu. Senyawa BAP merupakan senyawa sitokinin sintetik yang berfungsi dalam proses perkembangan sel dan mempunyai efek yang endogen. Penyerapan hormon ke dalam sel sangat cepat, namun efek dalam metabolisme sel terhadap sitokinin dapat memacu eksresi

metabolit sekunder. Oleh karena pada saat eksplan di kultur pada medium VW+BAP harus selalu disubkultur ke medium baru saat eksplan mengalami *browning*. Eksplan yang mengalami *browning* tidak akan beregenerasi dan mati. Subkultur eksplan pada medium VW+air kelapa dilakukan hingga eksplan membentuk *plantlet*.

Kombinasi penanaman eksplan pada medium VW dengan penambahan senyawa auksi, sitokinin, dan air kelapa tua pada waktu tertentu secara berurutan ternyata mampu mempercepat induksi *plantlet* pada tanaman anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung. Total waktu yang dibutuhkan hingga tanaman mampu menghasilkan *plantlet* yaitu minggu ke 6 telah mulai mampu terinisiasi fase globular (Gambar 3).

Berbeda halnya yang dilakukan oleh Teng *et al.* (1997) yang membutuhkan waktu 12 bulan untuk mampu membentuk *plantlet* dari induksi kalus tanaman *Spathoglottis plicata*.

Pada Gambar 3 merupakan fase-fase pertumbuhan dari eksplan kultur ovarium bunga *S. Bintang Segunung*. Fase pertama yaitu eksplan yang berumur 2-4 hari setelah kultur (hsk) yaitu seperti pada bagian A dan F (Gambar 3). Karakteristik yang ditunjukkan yaitu terjadinya penambahan volume eksplan yang semakin membesar. Pada bagian B dan G (Gambar 3) merupakan eksplan kultur yang berumur 10 hsk yang sudah siap untuk di subkultur pada medium VW+BAP. Karakteristik kalus yang terbentuk yaitu berwarna kuning kecoklatan. Namun setelah eksplan dikultur pada medium VW+BAP (Gambar 3. C dan H), kalus akan berubah warna menjadi hijau serta terjadi penambahan massa namun warna sel akan semakin hijau. Apabila sel telah hijau (Gambar 3. C dan H) maka dilakukan subkultur pada medium VW+air kelapa.

3.4 Induksi Embriogenesis Kalus *Spathoglottis* Bintang Segunung

Eksplan ovarium yang mampu bertahan pada medium VW+2,4-D akan menghasilkan kalus anggrek. Karakteristik kalus anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung adalah kompak dan berbentuk granula. Eksplan yang telah mampu beradaptasi kemudian dilakukan subkultur ke medium VW+BAP (2,5 ppm) selama 2 minggu. Senyawa BAP merupakan senyawa sitokinin sintetik yang berfungsi dalam proses perkembangan sel dan mempunyai efek yang endogen. Penyerapan hormon ke dalam sel sangat cepat, namun efek dalam metabolisme sel terhadap sitokinin dapat memacu eksresi metabolit sekunder. Oleh karena pada saat eksplan di kultur pada medium VW+BAP harus selalu disubkultur ke medium baru saat eksplan mengalami *browning*. Eksplan yang mengalami *browning* tidak akan beregenerasi dan mati.

Eksplan yang telah di kultur selama 2 minggu kemudian di subkultur pada medium VW+air kelapa (150 ml/L) yang telah disaring sebanyak dua kali terlebih dahulu. Air kelapa yang digunakan berasal dari buah kelapa yang telah tua. George *et al.* (2008) mengidentifikasi bahwa air kelapa mempunyai kandungan yang kompleks dikarenakan mengandung banyak jenis asam amino, asam organik gula (sukrosa, glukosa, dan fruktosa), gula alkohol, vitamin, serta senyawa

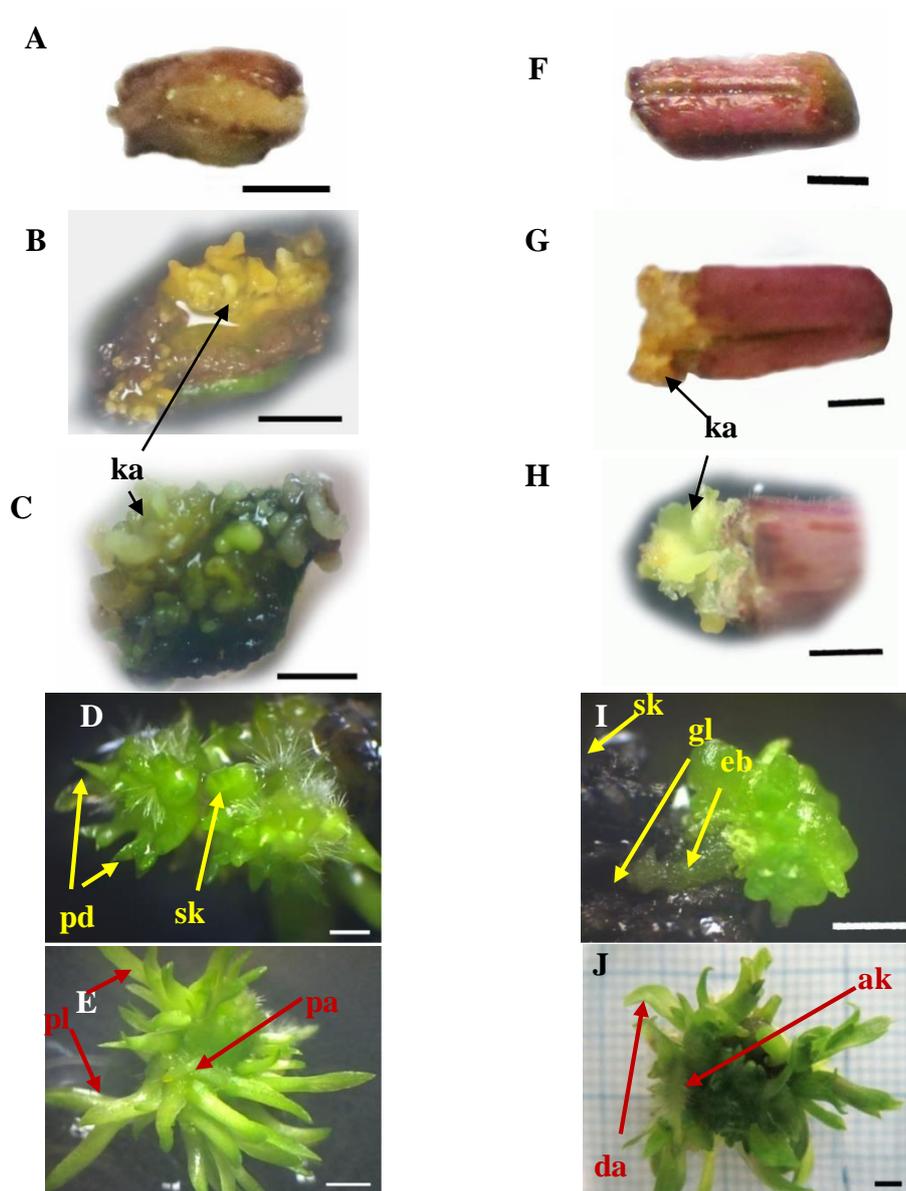
pertumbuhan (hormon) yang terdiri dari hormon auksin, giberilin, zeatin, dan sitokinin.

Subkultur eksplan pada medium VW+air kelapa dilakukan hingga eksplan membentuk *plantlet*. Kombinasi penanaman eksplan pada medium VW dengan penambahan senyawa auksi, sitokinin, dan air kelapa tua pada waktu tertentu secara berurutan ternyata mampu mempercepat induksi *plantlet* pada tanaman anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung. Total waktu yang dibutuhkan hingga tanaman mampu menghasilkan *plantlet* yaitu minggu ke 6 telah mulai mampu terinisiasi fase globular (Gambar 3). Berbeda halnya yang dilakukan oleh Teng *et al.* (1997) yang membutuhkan waktu 12 bulan untuk mampu membentuk *plantlet* dari induksi kalus tanaman *Spathoglottis plicata*.

Pada Gambar 3 merupakan fase-fase pertumbuhan dari eksplan kultur ovarium bunga *S. Bintang Segunung*. Fase pertama yaitu eksplan yang berumur 2-4 hari setelah kultur (hsk) yaitu seperti pada bagian A dan F (Gambar 3). Karakteristik yang ditunjukkan yaitu terjadinya penambahan volume eksplan yang semakin membesar. Pada bagian B dan G (Gambar 3) merupakan eksplan kultur yang berumur 10 hsk yang sudah siap untuk di subkultur pada medium VW+BAP. Karakteristik kalus yang terbentuk yaitu berwarna kuning kecoklatan. Namun setelah eksplan dikultur pada medium VW+BAP (Gambar 3. C dan H), kalus akan berubah warna menjadi hijau serta terjadi penambahan massa namun warna sel akan semakin hijau. Apabila sel telah hijau (Gambar 3. C dan H) maka dilakukan subkultur pada medium VW+air kelapa.

Umur kultur dalam medium VW+BAP yaitu sekitar 2 minggu. Kalus yang terlalu lama tidak disubkultur akan mengalami *browning* serta kalus yang berwarna hijau tua akan menurunkan keberhasilan induksi embriogenesis kalus. Pada bagian D dan I merupakan eksplan kultur yang telah Fase skutelar merupakan fase yang paling mudah dalam mengidentifikasi dan memastikan struktur globular merupakan PLB atau bukan. embrio berkecambah yaitu terbentuknya primordial daun dari fase skutelar.

Karakteristik struktur skutelar yaitu pada bagian apikal globular akan terbentuk struktur yang menyerupai daun yang menonjol ke arah bawah sehingga bentuknya menyerupai permukaan atas buah apel. Sedangkan fase membentuk *Protocorm-like bodies* (PLB).



Gambar 3. Perkembangan kalus anggrek *Spathoglottis Bintang Segunung* membentuk *plantlet*. (ka) kalus, (gl) globuler, (sk) skutelar, (eb) embrio berkecambah, (pd) primordial daun, (pa) primordial akar, (da) daun, (ak) akar, (pl) *plantlet*. Bar: 2 mm.

Bentuk PLB yaitu bentuk yang umumnya juga dikenal sebagai fase globular, skutelar, dan embrio berkecambah. Bagian I (Gambar I) menampilkan pembentukan fase pertama yang dalam induksi *plantlet* yaitu fase globular. Fase globular ditandai dengan terbentuknya struktur membulat dengan arsitektur sel yang seragam tanpa terdapat sel dapat mengubah konformasi struktur membulat tersebut.

3.4 Analisis Ploidi Plantlet Hasil Kultur Ovarium Bunga *Spathoglottis Bintang Segunung*

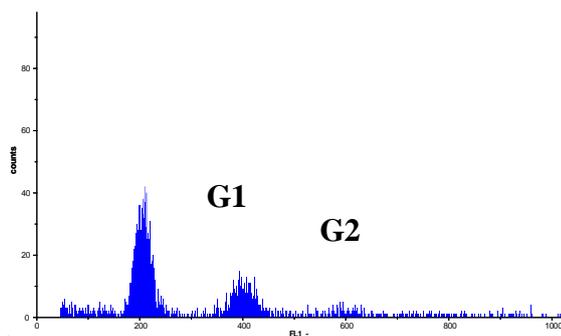
Pengecekan ploidi tanaman dapat dilakukan secara cepat menggunakan flow cytometry (Aliyu, 2012). Plantlet anggrek *Spathoglottis*

Bintang Segunung hasil kultur ovarium dianalisis menggunakan Flow Cytometry di Laboratorium Genetika Tumbuhan Puslit. Biologi LIPI Cibinong. Proses analisis flow cytometry menggunakan anggrek *Spathoglottis plicata* sebagai kontrol positif (diploid= 2n) ploidi anggrek wild type serta merupakan spesies induk jantan dari *Spathoglottis Bintang Segunung* dan anggrek *S. Bintang Segunung* yang merupakan tanaman asli yang bagian ovariumnya telah dikultur secara in-vitro. Berdasarkan hasil analisis flow cytometry diperoleh tipikal histogram seperti pada Gambar 4 dan 5.

Analisis flow cytometry menggunakan bagian daun tanaman. Anggrek *Spathoglottis*

Spathoglottis plicata digunakan sebagai kontrol ploidi yang berfungsi untuk memposisikan letak peak pada sumbu x histogram (FL-1). Peak pertama pada hasil analisis ploidi *Spathoglottis plicata* digeser tepat ditengah skala 200 pada FL-1 (Gambar 4). Hal ini diartikan bahwa peak yang muncul pada skala 200 merupakan diploid (*Spathoglottis plicata* = 2n) dan pada kelipatannya apabila muncul peak yaitu skala 400 merupakan tetraploid (4n) dan seterusnya. Pada Gambar 4 menunjukkan bahwa terdapat dua peak yang terbentuk yang artinya terdapat 2 jenis sel dengan ploidi yang berbeda. Peak pertama berarti sel pada fase G₀G₁ (2C) dengan jumlah sel yang terdeteksi 1282 (CV 6.6%) dan peak kedua yaitu fase G₂M (4C) dengan jumlah sel 552 (CV 5.24%). Kondisi ini sesuai dengan pembacaan histogram yang dilakukan oleh Schepper et al. (2001) pada tanaman *Rhododendron*.

Hasil analisis flow cytometry menunjukkan bahwa ploidi *Spathoglottis* Bintang Segunung dan plantlet yang berkembang dari eksplan kultur ovarium adalah sama (Gambar 5). Jumlah sel yang terdeteksi pada bagian A (Gambar 5) adalah 1796 (CV 5.19%) dan bagian B (Gambar 5) adalah 1155 (CV 4.35%). Berdasarkan Gambar 2 telah diketahui bahwa terdapat dua sel yang diindikasikan dapat berkembang menjadi plantlet yaitu dari sel telur atau dari sel somatik, namun berdasarkan analisis flow cytometri maka dapat dipastikan bahwa sel yang berkembang menjadi plantlet adalah sel somatik.

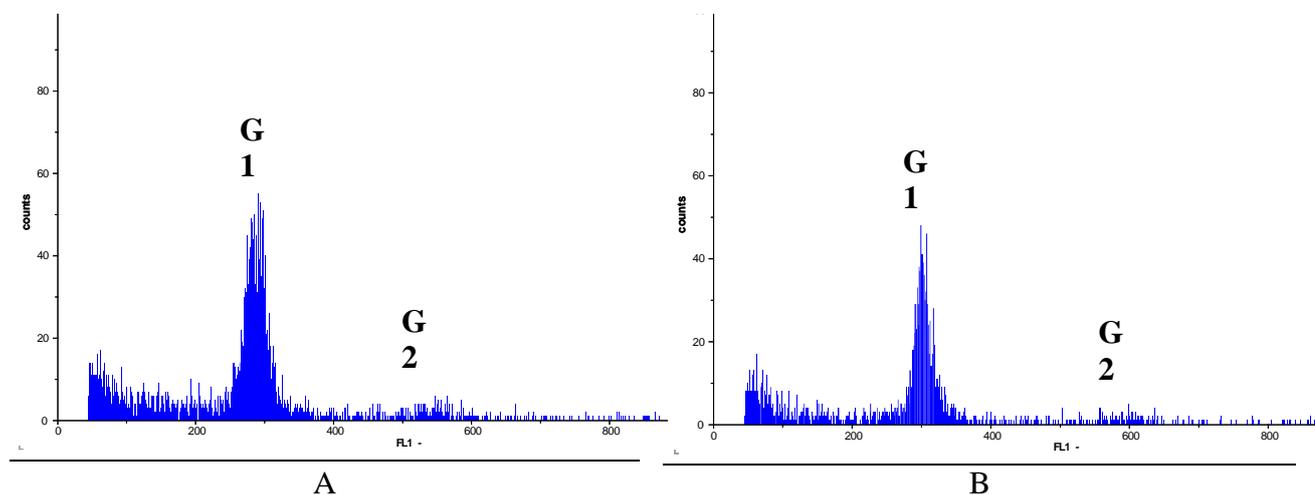


Gambar 4. Tipikal histogram *flow cytometry* inti sel anggrek *Spathoglottis plicata* yang diisolasi dari daun *invitroplant*

Analisis *flow cytometry* walaupun banyak digunakan untuk mendeteksi ploidi

suatu tanaman, namun metode ini mempunyai batasan dalam pembacaan kromosom. Menurut Cires et al. (2011) salah satu faktor mempengaruhi hasil adalah kandungan metabolit sekunder khususnya pada tanaman. Histogram (Gambar 4 dan 5) yang diperoleh menunjukkan bahwa masih terdapatnya gangguan berupa *peak* yang tersebar selain pada *range* G₀G₁-G₂M. Senyawa yang dapat digunakan untuk mengurangi kandungan metabolit sekunder khususnya fenolik pada tanaman adalah menambahkan β -*mercaptoethanol* atau *polyvinyl pirollidon* (PVP). Kedua senyawa tersebut mempunyai ikatan hidrogen yang mampu berikatan dengan senyawa fenolik. Tanaman dengan metabolit yang tinggi harus diperhatikan sebelum dilakukan preprasi, seperti yang dilakukan oleh Cires et al. (2011) pada tanaman *Violoceae*, namun ternyata histogram yang dihasilkan masih kurang baik karena mempunyai nilai CV yang masih tinggi (10%) walaupun telah dilakukan preparasi menggunakan buffer Otto, LB01, dan Tri.MgCl tetap tidak menghasilkan histogram yang presisi (CV>5%). Penambahan senyawa β -*mercaptoethanol*, *polyvinyl pirollidon* (PVP), sodium metabisulphite (SMB), dan dithiothreitol (DTT) juga mampu menekan tingkat oksidasi fenol pada suspensi inti sel namun histogram yang dihasilkan juga kurang bagus, selain itu percobaan perbandingan yang dilakukan adalah membandingkan sampel yang diisolasi pada beberapa variasi organ (daun, akar, dan bunga) ternyata hasilnya tidak signifikan berbeda dan menghasilkan histogram yang kurang baik antar ulangan.

Hasil yang dilaporkan oleh Kaewpoo dan Te-chato (2010) juga menunjukkan hasil yang sama bahwa *plantlet* yang berkembang dari sel somatik akan menghasilkan histogram yang identik. Namun Yang dan Loh (2004) menginterpretasikan bahwa histogram pada Gambar 5 merupakan suatu peristiwa endopoliploid. Namun hasil tersebut kurang akurat karena jumlah sel yang terbaca sangat rendah dan tidak konsisten. Hal lain yang tidak dipaparkan oleh Yang dan Loh (2004) adalah CV *peak* tidak ditampilkan sedangkan ini adalah salah satu parameter pembacaan hasil yang sangat penting serta tidak adanya *gating* histogram sehingga kemungkinan peristiwa pembacaan hasil oleh *flow cytometry* dapat terjadi seperti yang paparkan oleh (Wulff, 2006; Cires et al., 2011).



Gambar 5. Tipikal histogram *flow cytometry* inti sel anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung dan *plantlet* dari eksplan kultur ovarium dengan menggunakan daun tanaman

Dalam melakukan analisis *flow cytometry* banyak hal yang perlu diperhatikan. Untuk melakukan analisis *flow cytometry* maka pastikan bahwa alat *flow cytometry* yang akan digunakan dalam kondisi baik dengan pemrograman yang sesuai dengan metode yang digunakan. Analisis *flow cytometry* pada tanaman pada umumnya menggunakan sampel daun, namun bukan berarti seluruh bagian daun dapat digunakan dengan baik. Pastikan bahwa daun yang akan anda gunakan dalam kondisi sehat (tidak terserang penyakit) dan merupakan daun segar. Daun yang paling banyak digunakan adalah bagian pucuk atau yang masih muda, hindari menggunakan daun yang telah layu karena akan memberikan hasil yang kurang baik dengan kandungan metabolit sekunder yang tinggi. Pada tanaman sel anggrek, mempunyai aktivitas DNase yang sangat tinggi, oleh karena sampel yang digunakan harus segera dipreparasi untuk menghindari gejala *postmortem*. Walaupun beberapa peneliti seperti Suda & Trávníček (2006a; 2006b) dan Suda *et al.* (2007) yang melakukan preparasi dengan cara mengeringkan daun tanaman terlebih dahulu. Namun hal tersebut tidak memberikan hasil yang sama apabila melakukan preparasi antara sampel segar dengan sampel yang telah dikeringkan.

Dalam melakukan analisis *flow cytometry* banyak hal yang perlu diperhatikan. Untuk melakukan analisis *flow cytometry* maka pastikan bahwa alat *flow cytometry* yang akan digunakan dalam

kondisi baik dengan pemrograman yang sesuai dengan metode yang digunakan. Analisis *flow cytometry* pada tanaman pada umumnya menggunakan sampel daun, namun bukan berarti seluruh bagian daun dapat digunakan dengan baik. Pastikan bahwa daun yang akan anda gunakan dalam kondisi sehat (tidak terserang penyakit) dan merupakan daun segar. Daun yang paling banyak digunakan adalah bagian pucuk atau yang masih muda, hindari menggunakan daun yang telah layu karena akan memberikan hasil yang kurang baik dengan kandungan metabolit sekunder yang tinggi. Pada tanaman sel anggrek, mempunyai aktivitas DNase yang sangat tinggi, oleh karena sampel yang digunakan harus segera dipreparasi untuk menghindari gejala *postmortem*. Walaupun beberapa peneliti seperti Suda & Trávníček (2006a; 2006b) dan Suda *et al.* (2007) yang melakukan preparasi dengan cara mengeringkan daun tanaman terlebih dahulu. Namun hal tersebut tidak memberikan hasil yang sama apabila melakukan preparasi antara sampel segar dengan sampel yang telah dikeringkan.

Buffer yang digunakan adalah buffer Otto dengan *DNA stain* PI. Penggunaan buffer dalam melakukan preparasi sebelum analisis *flow cytometry* memberikan hasil yang cukup signifikan pada *peak* yang dihasilkan (Loureiro *et al.*, 2010). Analisis *flow cytometry* yang baik adalah *peak* yang mempunyai *Coefficient of Variants* (CVs) yang rendah ($x < 5,5\%$) serta pengulangan yang cukup menggunakan beberapa

flourosence (Greilhuber *et al.*, 2007). Konsentrasi pH buffer mungkin sangat mempengaruhi hasil, umumnya pH buffer yang digunakan adalah 7-8. Penggunaan buffer isolasi lain yang lebih baik menghasilkan *peak* (CV<5%) adalah LB01 dibandingkan buffer Otto (Schepper *et al.*, 2001).

Proses pemotongan sampel menjadi salah satu faktor dalam pembacaan hasil. Pemotongan sampel yang terlalu banyak dapat menurunkan pH buffer, menyebabkan warna suspensi menjadi kehitaman, dan jumlah presipitat yang tinggi terkadang memberikan hasil yang jelek. Untuk menghindari hal tersebut sampel tidak dipotong terlalu banyak atau mengurangi jumlah sampel. Waktu pewarnaan DNA juga sangat penting, lama inkubasi tiap spesies tanaman dapat berbeda-beda. Umumnya 20-60 menit, tergantung dari laju kemampuan degradasi dari tanaman, pada tanaman anggrek, laju aktivitas endonuklease cukup tinggi sehingga waktu perwarnaan yang dibutuhkan hanya 15-30 menit.

Kudo dan Kimura (2001) menyatakan bahwa variasi level ploidi selular yang disebut endopoliploid atau poliploidi somatik adalah suatu peristiwa yang dapat terjadi pada banyak eukariot. Sampai tahun 2001 diketahui bahwa 90% tanaman angiospermae mengalami endopoliploid dengan frekuensi tertinggi yang merupakan bagian dari endopoliploidisasi disebut endoreduplikasi. Endoreduplikasi adalah peristiwa penggandaan DNA selular tanpa melibatkan pembelahan sel secara mitosis (Kolano *et al.*, 2008). Menurut Valeria dan Martonfi (2011) persebaran sel yang mengalami endopoliploid adalah spesifik pada tiap organ, terutama terjadi pada *Trifolium pretence* yaitu pada bagian karpel, daun bunga, percabangan bunga dan pada batang, namun tidak ditemukan pada eksplan daun, akar, dan stamen. Kudo dan Kimura (2001) melaporkan bahwa ploidi pada tanaman *Raphanus sativus* dapat mencapai 32C. Endopoliploid tidak ditemukan pada embrio biji. Peristiwa endopoliploid meningkat cepat dan ekstensif seiring perkembangan pembentukan radikula dan hipokotil, namun peristiwa ini tidak ditemukan pada bagian ujung tunas. Pada tanaman *Chenopodium quinoa* berdasarkan penelitian Kalano *et al.*, (2008) menyatakan bahwa pola endoreduplikasi berkorespondensi dengan fase perkembangan dan jenis organ. Peristiwa polisomatik sudah mulai terbentuk pada bagian radikula dari embrio biji yang telah berimbibisi. Seiring perkembangan seedling, maka peristiwa endopoliploidisasi sudah terjadi pada pada banyak organ seperti akar, hipokotil dan kotiledon. Selain itu hasil Kalano *et al.*, (2008) sesuai dengan penelitian Kuda dan Kimura (2001) dan Valeria dan Martoni

(2011) bahwa tidak ditemukan peristiwa endopoliploidisasi pada bagian daun dan ujung tunas. Hal yang sesuai dengan histogram hasil flow cytometry pada tanaman anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Konsentrasi optimal senyawa 2,4-*Dichloro-phenoxyacetic acid* (2,4-D) dan *cold shock* 10°C yang mampu menginduksi perkembangan eksplan kultur ovarium dengan signifikansi 2% adalah 1 ppm 2,4-D dan 4 jam perlakuan, serta interaksi keduanya mempunyai signifikansi 1,9%.
2. Konsentrasi optimal senyawa 6-*Benzylaminopurine* (BAP) yang mampu menginduksi embriogenesis eksplan kalus anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung dengan signifikansi 0,62% yaitu 2,5 ppm BAP.
3. Ploidi *plantlet* yang beregenerasi dari kultur ovarium adalah sama dengan tanaman sumber eksplan yang berarti sel yang beregenerasi berasal dari sel somatik. Tingkat ploidi anggrek *Spathoglottis* Bintang Segunung adalah triploid apabila dibandingkan dengan tingkat ploidi *Spathoglottis plicata* sebagai kontrol diploid.

5. REFERENSI

- Aliyu, O.M. 2012. Development of the flow cytometric for ploidy analysis and determination of relatif nuclear DNA content in Cashew (*Anacardium occidentale* Linn.). *American Journal of Biotechnology and Molekular Biology*, 2(4):200-215.
- Bouatrous, Y., E.A.A.A. Elhady, A. Djekoun, and N. Yekhlef. 2010. Production of Haploid Green Plants by Intergeneric Crossing of *Triticum durum* Desf x *Zea mays* L. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 7 (5): 512-517.
- George, E.F., M.A. Hall, and G.J.D. Klerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd Ed. Springer, UK. p: 117.
- Cires, E., C. Cuesta, M.A.F. Casado, H.S. Nava, V.M. Vazquez, and J.A.F. Prieto. 2011. Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from species with extremely mucilaginous compounds: an example in the genus *Viola* L. (Violaceae). *Anales del Jardin*

- Botanico de Madrid*, 68(2):139-154.
- Doležel, J., J. Greilhuber, and J. Suda. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc*, 2:2233–2244.
- Greilhuber, J., E.M. Tensch, and J.C.M. Loureiro. 2007. *Nuclear DNA content measurement*. Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 4:67–101.
- Irawati. 2002. The *Conservation of Orchid Species in Indonesia*. Proceeding of Indonesian Orchid Seminar, at Yogyakarta, October 20. 2002, p. 46-56.
- Kaewpoo, M. and S. Te-chato. 2010. Studi on ploidi level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. *Journal of Agricultural Technology*, 6(2):391-400.
- Kartikaningrum, S. 2012. *Pengembangan Teknologi Haploid pada Anyelir (*Dianthus* sp.)*. Desertasi IPB. Hal. 15.
- Kartikaningrum, S., T.S. Nur, Q. Hayati, dan Suryanah. 2004. *Hibridisasi anggrek *Spathoglottis* secara konvensional*. Laporan Akhir Tahun Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cianjur. hlm:74-82.
- Kolano, B., D. Siwinska, and J. Maluszynska. 2008. Endopoliploidy patterns during development of *Chenopodium quinoa*. *Acta Biologica Cracoviensia*, 51(2):85-92.
- Kolar, F. and M. Lucanova. 2010. Glycerol-treated nuclear suspensions-an efficient preservation method fol flow cytometric analysis of plant samples. *J. Crhomosome Res* 18(3): 1-15.
- Kudo, N. and Y. Kimura. 2001. Flow cytometry analysis for systemic endopolyploidy in development of Radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Biotechnology*, 19(1):45-52.
- Loureiro, J., P. Trávníček, T. Urfus, P. Vít, M. Štech, S. Castro, and J. Suda. 2010. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* 82:3–21.
- Schepper, S.D., L. Leus, M. Mertens, E.V. Bockstaele, and M.D. Loose. 2001. Flow cytometry analysis of ploidy in *Rhododendron* (subgenus *Tsutsusi*). *Hort. Science*, 36(1):125-127.
- Semiarti, E., A. Indrianto, dan A.B. Sasongko. 2010. *Identifikasi Genotip Hibrida Hasil Persilangan Anggrek Lokal *Vanda tricolor* Lindl. Var *suavis* Asal Merapi dan *Vanda limbata* Blume. dengan PCR-RFLP pada daerah Intergenik *trnL-F* DNA kloroplas*. Seminar Nasional Biologin Fakultas Biologi.Hlm. 754-757.
- Setiawan, A., A.N. Shochicha, A.A.C. Pramana, dan Restiyanti. 2013. *Pengembangan marka molekular untuk karakterisasi anggrek tanah unggul (*Spathoglottis*) hasil poliploidisasi dengan kolkisin*. Laporan Akhir Program Kreativitas Mahasiswa 2013. Hal: 7.
- Shalaby, T.A. 2007. Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia Horticulturae*, 115: 1-6.
- Soeradikoesoemo, 2008. Buku Petunjuk Praktikum Mikroteknik Tumbuhan. Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta.
- Suda, J. and P. Trávníček. 2006a. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry: new prospects for plant research. *Cytometry*, 69A:273–80
- Suda, J. and P. Trávníček. 2006b. *Estimation of relatif nuclear DNA content in dehydrated plant tissues by flow cytometry*. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, New York, pp. 7.30.1–7.30.14
- Suda, J., P. Kron, B.C. Husband, and P. Trávníček. 2007. *Flow cytometry and ploidy: applications in plant systematics, ecology and evolutionary biology*. Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 5:103–30.
- Svirshevskaya, A.M. and J. Dolezel. 2000. Production and Performance of Gynogenetic Sugarbeet Lines. *Journal of Sugar Beet Research*, 37(4): 117-133.
- Teng, W.L., Nicholson, and M.C. Teng. 1997. Micropropagation og *Spathoglottis plicata*. *Plant Cell Reports*, 16:831-835.
- Valeria, K. and P. Martonfi. 2011. Endopoliploidi in *Trifolium pretense* L. *Caryologia*, 64(4):419-426.
- Wulff, S. 2006. *Flow Cytometry. 2nd Ed.* Dako, California. USA.
- Yang, M. and C.S. Loh. 2004. Systemic endopolyploid in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. *BMC Cell Biology*, 5:33.

