

KULTUR ANTERA ANTHURIUM: PENGARUH SUKROSA DAN GLUKOSA TERHADAP KEBERHASILAN INDUKSI PEMBENTUKAN KALUS DAN REGENERASINYA

Budi Winarto*, N.A. Mattjik**, A. Purwito** dan B. Marwoto*

* Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang, Pacet-Cianjur. 43253. Jawa Barat

** Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jl. Meranti. Kampus Dramaga, Bogor. 16680 Jawa Barat

* Korespondensi: ya_nuriwinarto@yahoo.com

ABSTRACT

Effect of sucrose and glucose on callus induction and formation, growth and its regeneration was studied in tissue culture laboratory of Indonesian Ornamental Crops Research Institution from January to November 2009. Objective of this study was to know different combination-concentration of sucrose and glucose on callus induction and formation, growth and its regeneration in anther culture of anthurium. Anthers harvested from spadix with 50% of their pistil in optimal receptive, callus derived from them, Winarto and Rachmawati medium containing 1.5 mg/l TDZ, 0.75 mg/l BAP and 0.02 mg/l NAA were used in the study. Sucrose concentrations were (1) 20 g/l, (2) 40 g/l, (3) 60 g/l dan (4) 80 g/l. While glucose concentrations were (1) 0 g/l, (2) 10 g/l, (3) 30 g/l dan (4) 60 g/l. Variation of the concentrations was applied in callus induction, growth and its regeneration studies. Factorial experiment was arranged by completely randomized design with four replications. Results of this research indicate that existence of sucrose in Winarto and Rachmawati medium gave high effect on successful in anther culture of anthurium and its callus regeneration compared to glucose. Increasing sucrose concentration from 30 g/l to 60 g/l had high impact in callus formation, growth and its regeneration. Sucrose of 60 g/l in combination with 30 g/l glucose was the most suitable combination treatment for callus induction and formation with potential growth of anthera up to 92%, 67% anthera regeneration and 4.0 calluses formed per replication. The sucrose concentration was also to be the best concentration callus growth and its regeneration with 332 mm³ per callus and 3.2 shoots per explant.

Key words: sucrose, glucose, callus, regeneration, anthera culture, anthurium

PENGANTAR

Pada kultur *in-vitro* baik terhadap sel, jaringan dan organ, pemberian gula dalam medium merupakan faktor penting penunjang keberhasilannya. Pada kenyataannya hanya sejumlah kecil tanaman yang dikultur *in-vitro* mampu menyediakan karbohidratnya sendiri melalui aktivitas fotosintesis (bersifat autotropik) (George, 1993). Banyak tanaman autotropik ini umumnya memiliki respons pertumbuhan yang lambat, khususnya disebabkan oleh keterbatasan jumlah CO₂ dalam botol kultur. Sedangkan sebagian besar tanaman pada perbanyakan *in-vitro* umumnya memerlukan pemberian gula sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan perkembangannya.

Gula atau sakarida pada umumnya diketahui berperan sebagai sumber energi, agen osmotikum, pelindung stres dan molekul sinyal pada tanaman (Lipavska dan Konradova, 2004). Ramage dan Williams (2002) menyatakan hal yang lebih spesifik, khususnya pada spesies tanaman yang sulit diperbanyak secara *in-vitro*, bahwa variasi rasio hormon pertumbuhan tidak dapat mengendalikan proses perkembangan tanaman secara *in-vitro* tanpa pemberian komponen lain seperti karbohidrat. Sumber karbohidrat ini

memiliki peran yang mendasar pada proliferasi tunas dan memengaruhi pertumbuhan tunas dan ketahanan hidupnya (Priyakumari *et al.*, 2002).

Sukrosa merupakan salah satu jenis sumber karbon dan energi yang telah banyak diaplikasikan dan digunakan dalam perbanyakan *in-vitro* untuk berbagai tujuan (Priyakumari *et al.*, 2002; Ramage dan Williams, 2002; Lipavska dan Konradova, 2004). Dua hingga lima persen (2–5%) merupakan konsentrasi yang paling lazim digunakan dalam kultur jaringan pada berbagai jenis tanaman (Bridgen, 1994). Kemudian pada kultur anthera, bahan ini digunakan pada kisaran antara 2–13% tergantung respons anthera yang dikultur di atasnya (Sopory dan Munshi, 1996; Maluszynski *et al.*, 2003) baik untuk tujuan induksi pembentukan kalus, embriogenesis maupun regenerasinya. Pada kultur anthera lili digunakan 6% sukrosa (Han *et al.*, 1997) sementara Arzeta-Fernandez *et al.* (1997) dengan 1,5% pada tanaman yang sama, 3% glukosa dan 3% maltosa pada kultur anthera bunga matahari (Saji dan Sujatha, 1998), tetapi Thangene *et al.* (1994) dengan 4% sukrosa dan Coumans dan Zhong (1995) menggunakan 12% sukrosa untuk tanaman yang sama, 3% sukrosa pada kultur anthera *Cyclamen* (Ishizaka,

1998). Sementara pada anthurium digunakan sukrosa pada konsentrasi 3% (Rachmawati, 2005; Winarto dan Rachmawati, 2007).

Selain sukrosa, glukosa juga merupakan salah satu jenis sumber karbon dan energi yang digunakan untuk menunjang keberhasilan kultur antera tanaman. Jenis gula ini telah diaplikasikan pada kultur antera kubis (Arora dan Bhojwani, 1988) dan asparagus (Wolyn dan Nichols, 2003) yang dikombinasikan dengan sukrosa. Meski aplikasinya dalam kultur antera masih terbatas, aplikasinya di anthurium juga memberikan hasil yang positif dalam induksi pembentukan kalus (Winarto *et al.*, 2005). Pada studi awal tersebut kombinasi 20 g/l sukrosa yang dikombinasikan dengan 10 g/l glukosa pada medium terseleksi memberikan hasil yang lebih baik dibanding medium tanpa glukosa. Pada kultur antera gandum, selain potensi osmotikum medium, glukosa dicatat menjadi faktor penting penunjang keberhasilannya (Last dan Brettell, 1990). Sedangkan peran kedua jenis gula tersebut dalam regenerasi tanaman dilaporkan oleh Gürel dan Gülsen (1998) pada almond, Kumar *et al.* (1999) pada gladiol, Younas *et al.* (2008) pada peach, Chen dan Debnenki (2004) kultur antera *Linum usitatissimum*.

Optimalisasi medium terseleksi melalui perbaikan konsentrasi dan kombinasi sukrosa dan glukosa dalam kultur antera anthurium belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, optimalisasi konsentrasi dan aplikasi kedua bahan tersebut menjadi poin penting dalam penelitian ini. Tujuan utama penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi-kombinasi sukrosa dan glukosa terhadap keberhasilan induksi pembentukan kalus pada kultur antera anthurium dan regenerasinya. Hipotesis penelitian ini adalah minimal terdapat satu perlakuan dan kombinasi sukrosa dan glukosa yang sesuai untuk induksi pembentukan kalus dan regenerasinya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan penelitian ini adalah antera yang diisolasi dari spadik *Anthurium andreanum* kultivar Tropical yang 50% stigmanya berada dalam kondisi reseptifnya. Antera yang diisolasi adalah dari daerah transisi spadik. Sedangkan medium Winarto dan Rachmawati yang mengandung 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA merupakan medium kultur antera terseleksi yang digunakan dalam penelitian ini. Medium ini dipadatkan menggunakan 2% Gelrite. pH medium diatur pada 5,8 dan disterilisasi pada suhu 121° C selama 20 menit pada tekanan 15 kPsi. Kalus hasil regenerasi pada percobaan 1 digunakan sebagai ekspan untuk percobaan 2.

Cara Kerja

Sterilisasi spadik

Setelah dipanen, spadik diletakkan di bawah air mengalir selama 0,5–1,0 jam, dipindahkan dalam larutan 1% *benomil* + *bactomicyn* selama 30 menit, kemudian dibilas dengan air distilasi beberapa kali hingga bersih. Setelah itu spadik dibawa dalam laminar, direndam sambil digojok dalam larutan 2% Natrium hipoklorida (NaOCl) + 5 tetes Tween 20 selama 5 menit, dalam larutan 1% NaOCl + 5 tetes Tween 20 selama 10 menit, selanjutnya dibilas dengan air destilasi steril hingga bersih (5–6×, @ 5 menit). Setelah sterilisasi, spadik diletakkan dalam cawan petri steril yang berisi kertas tisu basah untuk menjaga kelembapan dan kesegaran spadik.

Isolasi antera

Spadik steril dipotong sepanjang 2 cm pada daerah transisinya (ditandai dengan perubahan warna bunga dari putih ke kuning). Setelah itu potongan spadik diletakkan di bawah mikroskop binokuler untuk diisolasi anteranya. Dengan hati-hati korola bunga yang seperti sisik dibuka menggunakan pisau kultur. Antera kemudian dipotong dengan pisau kultur dan langsung dikultur di atas media perlakuan.

Penyiapan kalus

Penyiapan kalus untuk percobaan 2 dilakukan dengan menanam antera pada medium Winarto dan Rachmawati yang mengandung 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, 3% sukrosa, 2% Gelrite. Botol kultur plus antera selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap dengan suhu 24 ± 1° C selama 2 bulan. Setelah itu botol kultur diinkubasi terang dengan 12 jam fotoperiode pada suhu yang sama di bawah lampu fluorescens dengan intensitas cahaya ± 13 μmol.m⁻².s⁻¹ untuk pertumbuhan dan perkembangan kalus lebih lanjut. Kalus hasil regenerasi selanjutnya dipotong ± 3 mm panjang, lebar dan tingginya. Potongan ini selanjutnya dikultur pada medium uji.

Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Keberhasilan Induksi Pembentukan Kalus

Pada percobaan ini perbedaan konsentrasi dan kombinasi sukrosa dan glukosa diuji pengaruhnya terhadap keberhasilan induksi pembentukan kalus. Konsentrasi sukrosa yang diuji adalah (1) 20 g/l, (2) 40 g/l, (3) 60 g/l dan (4) 80 g/l. Sementara konsentrasi glukosa yang dites adalah 1) 0 g/l, 2) 10 g/l, 3) 30 g/l dan 4) 60 g/l.

Rancangan acak lengkap pola faktorial dengan 4 ulangan digunakan dalam percobaan ini. Tiap ulangan terdapat 3 botol kultur. Tiap botol kultur terdapat 6 antera yang

dikultur. Botol-botol kultur selanjutnya diinkubasi dengan cara yang sama seperti yang diuraikan sebelumnya.

Parameter yang diamati adalah: (1) potensi tumbuh antera (PTA, %) (diamati 1 bulan setelah kultur inisiasi), (2) persentase antera membentuk kalus (PAMK, %) (diamati 2,0 bulan setelah kultur inisiasi), dan (3) jumlah rata-rata antera yang membentuk kalus (JK), (diamati 3,0 bulan setelah kultur inisiasi).

Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Keberhasilan Regenerasi Kalus

Pada percobaan ini perbedaan konsentrasi dan kombinasi sukrosa dan glukosa diuji pengaruhnya terhadap keberhasilan induksi pembentukan kalus. Konsentrasi sukrosa yang diuji adalah (1) 20 g/l, (2) 40 g/l, (3) 60 g/l dan (4) 80 g/l. Sementara konsentrasi glukosa yang dites adalah 1) 0 g/l, 2) 10 g/l, 3) 30 g/l dan 4) 60 g/l.

Rancangan acak lengkap pola faktorial dengan 4 ulangan digunakan dalam percobaan ini. Tiap ulangan terdapat 3 botol. Tiap botol terdiri dari 4 eksplan dengan ukuran $\pm 3 \times 3 \times 3$ mm. Botol kultur yang berisi potongan kalus diinkubasi terang dengan 12 jam fotoperiode pada suhu yang sama di bawah lampu fluorescens dengan intensitas cahaya $\pm 13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ hingga regenerasi bakal tunas dan tunas terlihat jelas.

Parameter yang diamati dalam percobaan ini adalah: (1) persentase tumbuh kalus (PTK, %), (2) volume kalus (VK, mm^3), (3) skor bakal tunas (SBT) adalah – s/d +++++, keterangan: – tidak ada bakal tunas yang teramati, + terdapat 1–5 bakal tunas, ++ terdapat 6–10 bakal tunas, +++ terdapat 11–20 bakal tunas, dan +++++ terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan yang diamati, dan (4) jumlah tunas (JT). Pengamatan dilakukan $\pm 3,0$ bulan setelah kultur awal untuk skoring bakal tunas, sedangkan jumlah tunas dihitung dan diamati 4,0–4,5 bulan setelah kultur inisiasi.

Pengolahan Data

Data yang berhasil dikumpulkan baik pada percobaan 1 maupun 2 dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) menggunakan program SAS Release window 6.12. Jika terdapat perbedaan nilai rata-rata perlakuan, maka akan diuji lanjut menggunakan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

HASIL

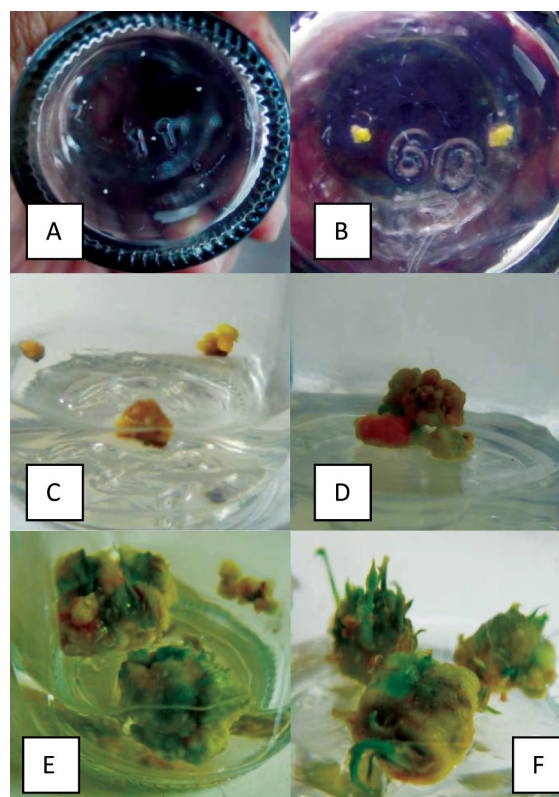
Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Keberhasilan Induksi Pembentukan Kalus

Proses induksi kalus pada kultur antera anthurium hingga regenerasinya membentuk tunas diuraikan pada

Gambar 1. Satu bulan setelah kultur inisiasi antera terinisiasi untuk membentuk kalus. Tidak semua antera mampu membentuk kalus, tetapi sebagian mati karena pencoklatan eksplan. Kalus hasil regenerasi akan membentuk bakal tunas 3,5–4,0 bulan dan tunas terlihat jelas 4,5 bulan setelah subkulturunya (Gambar 1).

Pada penelitian ini, kombinasi konsentrasi sukrosa dan glukosa berpengaruh nyata hingga sangat nyata dalam menunjang keberhasilan induksi pembentukan kalus. Perlakuan ini juga memiliki pengaruh interaksi nyata hingga sangat nyata pada semua peubah dan konsentrasi sukrosa memiliki pengaruh yang lebih besar dibanding dengan perlakuan glukosa.

Konsentrasi sukrosa pada 60 g/l (Suk-3) merupakan konsentrasi terbaik dan berbeda nyata dibanding konsentrasi yang lain. Perlakuan ini mampu menginduksi potensi tumbuh antera (PTA) hingga 58% dengan 31% antera membentuk kalus (PAMK) dan 1.9 jumlah rata-rata antera membentuk kalus per perlakuan (JK).



Gambar 1. Proses induksi kalus pada kultur antera anthurium hingga regenerasi kalusnya. A. Kultur inisiasi. B. Kalus hasil inisiasi (3 bulan setelah kultur inisiasi). C-D Pertumbuhan kalus. E. Inisiasi bakal tunas (3,5–4,0 bulan setelah subkultur). F. Tunas yang teregenerasi (4,0–4,5 bulan setelah subkultur).

Suk-4 merupakan konsentrasi terbaik kedua dengan 51% PTA, 17% PAMK dan 1.0 kalus per perlakuan (Data

tidak ditunjukkan). Glukosa pada konsentrasi 30 g/l (Gluk-3) menunjukkan hasil yang terbaik dan berbeda nyata dengan konsentrasi yang lain. Perlakuan ini mampu menstimulasi PTA hingga 55% dengan 30% PAMK dan 1.8 kalus per perlakuan (Data tidak ditunjukkan).

Suk-3 yang dikombinasikan dengan Gluk-3 merupakan kombinasi perlakuan yang paling sesuai untuk menginduksi kalus pada kultur antera anthurium dan berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan yang lain. Kombinasi ini mampu menginduksi PTA hingga 92% dengan 67% PAMK dan 4.0 kalus per perlakuan (Tabel 1; Data PTA dan PRA tidak ditunjukkan). Kombinasi terbaik kedua adalah perlakuan Suk-3 yang dikombinasikan dengan Gluk-4, yang mampu menginduksi PTA hingga 67%, 33% PAMK dan 2.0 kalus per perlakuan.

Tabel 1. Pengaruh interaksi sukrosa dan glukosa terhadap jumlah rata-rata antera membentuk kalus per perlakuan (JK)

Konsentrasi glukosa (Gluk)	Konsentrasi sukrosa (Suk)			
	Suk-1	Suk-2	Suk-3	Suk-4
Gluk-1	0,8 a	1,0 a	1,5 b	0,8 a
Gluk-2	1,3 a	0,0 a	0,0 c	1,5 a
Gluk-3	1,0 a	1,0 a	4,0 a	1,3 a
Gluk-4	0,3 a	0,3 a	2,0 b	0,5 a
Koef. var (CV, %)	23,82	23,18	13,42	26,26

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Keberhasilan Regenerasi Kalus

Kombinasi konsentrasi sukrosa dan glukosa berpengaruh nyata hingga sangat nyata terhadap pertumbuhan kalus dan regenerasinya. Kombinasi perlakuan ini juga memberikan interaksi yang nyata hingga sangat nyata dan glukosa memberikan pengaruh yang lebih tinggi dibanding pemberian sukrosanya. Hasil ini sekaligus membuktikan bahwa pemberian glukosa memberikan pengaruh yang signifikan pada pertumbuhan dan regenerasi kalus.

Meski tidak sebesar pengaruh glukosa, konsentrasi sukrosa pada 20 g/l (Suk-1) merupakan konsentrasi yang paling baik dan berbeda nyata dengan konsentrasi yang lain. Perlakuan ini menstimulasi persentase tumbuh kalus hingga 94% dengan 275 mm³ per kalus, tetapi sayang perlakuan ini tidak mampu menginduksi pembentukan tunas yang lebih baik. Suk-2 (40 g/l sukrosa) meskipun memiliki 85% PTK, 185 mm³, tetapi mampu meregenerasi tunas hingga 1.4 tunas per eksplan (Data tidak ditunjukkan). Sedangkan

Gluk-1 (0 g/l) ternyata memberikan hasil tertinggi dengan 85% PTK, 292 mm³ per kalus dan 1.7 tunas per eksplan. Selanjutnya Gluk-2 merupakan perlakuan terbaik kedua dengan 85% PTK, 149 mm³ per kalus dan 0,5 tunas per eksplan (Data tidak ditunjukkan).

Tabel 2. Skor jumlah bakal tunas per eksplan

Sukrosa (Suk)	Glukosa (Gluk)			
	Gluk-1	Gluk-2	Gluk-3	Gluk-4
Suk-1	+	-/+	-	-/+
Suk-2	+ /++	+	+	-/+
Suk-3	++	-	-	-/+
Suk-4	-	-	-	-

Keterangan:

- tidak ada bakal tunas yang teramati
- + terdapat 1–5 bakal tunas
- ++ terdapat 6–10 bakal tunas
- +++ terdapat 11–20 bakal tunas, dan
- ++++ terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan yang diamati.

Berdasarkan jumlah bakal tunas yang diamati, terlihat bahwa kombinasi Suk-3 dan Gluk-1 merupakan konsentrasi yang paling sesuai untuk menginduksi pembentukan bakal tunas. Perlakuan ini menginduksi bakal tunas antara 6–10 (++) bakal tunas (Tabel 2). Kombinasi Suk-2 dan Gluk-1 merupakan hasil terbaik kedua untuk menginduksi bakal tunas.

Kombinasi perlakuan sukrosa dan glukosa memberikan hasil yang bervariasi. Berdasarkan parameter PTK, terdapat banyak kombinasi perlakuan dengan nilai yang tinggi (100%, Data tidak ditunjukkan), tetapi nilai ini tidak berkorelasi positif terhadap parameter yang lain. Selanjutnya berdasarkan pertumbuhan kalus Gluk-1 yang dikombinasikan dengan Suk-1 merupakan kombinasi konsentrasi yang paling sesuai dibanding kombinasi yang lain. Kombinasi ini mampu menginduksi pertumbuhan kalus hingga 570 mm³ per kalus (Tabel 3).

Tabel 3. Pengaruh interaksi sukrosa dan glukosa terhadap VK (mm³)

Konsentrasi Sukrosa (Suk)	Konsentrasi Glukosa (Gluk)			
	Suk-1	Suk-2	Suk-3	Suk-4
Suk-1	570 a	157 b	294 a	80 a
Suk-2	220 b	301 a	196 ab	26 b
Suk-3	332 b	94 b	67 b	24 b
Suk-4	46 b	44 b	52 b	29 b
Koef. var (CV, %)	22,74	20,12	19,77	11,61

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

Kemudian berdasarkan jumlah tunas yang diregenerasi, maka kombinasi perlakuan Gluk-1 dengan Suk-3 merupakan kombinasi yang paling baik dibanding kombinasi yang lain dengan 3.2 tunas per eksplan (Tabel 4). Hasil penelitian ini juga mengungkapkan bahwa perlakuan sukrosa-lah yang sesungguhnya berpengaruh terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus, sementara pemberian glukosa justru menekan pertumbuhan kalus dan regenerasi tunasnya.

Tabel 4. Pengaruh interaksi sukrosa dan glukosa terhadap jumlah tunas (JT)

Konsentrasi Sukrosa (Suk)	Konsentrasi Glukosa (Gluk)			
	Suk-1	Suk-2	Suk-3	Suk-4
Suk-1	1,0 ab	0,5 ab	0,0 b	0,0
Suk-2	2,6 a	1,6 a	1,4 a	0,0
Suk-3	3,2 a	0,0 b	0,0 b	0,0
Suk-4	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0
Koef. var (CV, %)	25,37	19,28	20,07	-

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

PEMBAHASAN

Akumulasi pati dalam plastida sel-sel eksplan tanaman yang dikultur secara *in-vitro* merupakan prasarat bagi terjadinya morfogenesis, baik pada pembentukan maupun regenerasi kalus membentuk tunas (George, 1993; Saji dan Sujatha, 1998), dan segera menghilang saat meristimoid dan bakal tunas mulai terbentuk. Pati tersebut dibentuk dari sukrosa dan gula lain yang ditambahkan dalam medium kultur *in-vitro* (Thorpe *et al.*, 1986). Bahan tersebut berperan sebagai sumber karbon (penyedia kerangka karbon) dan energi, agen osmotik, pelindung stres dan pemberi sinyal pada tanaman (Lipavska dan Konradova, 2004). Pada penelitian lain didapatkan bahwa sel/jaringan/organ yang membentuk kalus umumnya didahului dengan akumulasi pati sebelum pembentukan tunas dan akar dan kondisi ini tidak ditemukan pada kalus yang kemampuan morfogenesisnya rendah atau tidak ada (George, 1993).

Pada kultur antera anthurium, pemberian sukrosa sebagai sumber energi dalam induksi pembentukan kalus terlihat memiliki peran yang lebih penting dibanding glukosa. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Saji dan Sujatha (1998) pada kultur antera bunga matahari. Pada penelitian ini 60 g/l sukrosa yang dikombinasikan

dengan 30 g/l glukosa merupakan kombinasi konsentrasi terbaiknya. Hasil ini sekaligus memberi bukti bahwa peningkatan konsentrasi sukrosa dari 30 ke 60 g/l dengan menambahkan 30 g/l glukosa pada medium Winarto dan Rachmawati mampu meningkatkan kualitas medium terseleksi dalam menunjang keberhasilan kultur antera pada anthurium. Peningkatan keberhasilan induksi kalus dalam kultur antera ini juga dilaporkan oleh Han *et al.* (1998) pada kultur antera lili; Tai dan Xiong (2003) pada kultur antera kentang. Mereka meningkatkan konsentrasi sukrosa dari 30 g/l menjadi 60 g/l pada lili, sementara 20 g/l menjadi 60 g/l pada kentang. Sukrosa pada konsentrasi tersebut juga optimal untuk induksi kalus pada kultur antera *Linum usitatissimum* (Burbulis *et al.*, 2005). Saji dan Sujatha (1998) mendapatkan respons yang berbeda, peningkatan konsentrasi sukrosa dari 30 g/l menjadi 40 g/l justru menurunkan respons antera dalam membentuk kalus. Peningkatan dan hasil yang hampir sama ditemukan pada konsentrasi 80 g/l. Sedangkan Thangene *et al.* (1994) menemukan bahwa 40 g/l sukrosa merupakan konsentrasi terbaik dalam kultur antera bunga matahari.

Keberhasilan kultur antera anthurium melalui pengkombinasian sukrosa dengan glukosa yang memberikan pengaruh yang nyata dalam induksi kalus pada kultur antera anthurium juga dilaporkan oleh Wolyn dan Nichols (2003) pada kultur antera asparagus, 20 g/l sukrosa dengan 20 g/l glukosa menjadi konsentrasi terbaiknya. Pada kultur antera *Linum usitatissimum* dilaporkan bahwa 25 g/l sukrosa yang dikombinasikan dengan 25 g/l glukosa merupakan kombinasi konsentrasi yang paling efektif untuk induksi kalusnya (Rutkowska-Krause *et al.*, 2003). Dampak positif kombinasi perlakuan ini juga dilaporkan oleh Last dan Brettell (1988) pada kultur antera *Brassica carinata*. Tetapi kombinasi ini tidak memberikan hasil yang baik pada kultur antera bunga matahari seperti yang dilaporkan oleh Saji dan Sujatha (1998). Meski aplikasi kombinasi konsentrasi sukrosa dan glukosa ini belum banyak diaplikasikan dalam kultur antera, tetapi hasil penelitian ini memberikan bukti yang positif peran kedua bahan tersebut dalam menunjang keberhasilan kultur antera anthurium.

Pada kultur antera anthurium, pertumbuhan kalus, regenerasi kalus hingga membentuk bakal tunas dan tunas pada penelitian ini ternyata juga sangat dipengaruhi oleh sukrosa dengan 60 g/l merupakan konsentrasi terbaiknya. Seperti pada studi induksi pembentukan kalus, peningkatan konsentrasi sukrosa dari 30 g/l menjadi 60 g/l juga berpengaruh besar terhadap keberhasilan regenerasi kalus menjadi tunas. Sedangkan kombinasi perlakuan ini dengan glukosa justru menurunkan kemampuan medium terseleksi

dalam menstimulasi pertumbuhan dan regenerasi kalus hasil kultur antera. Konsentrasi yang sama (60 g/l) juga dicatat menjadi konsentrasi yang optimal untuk induksi dan regenerasi kalus pada kultur *in-vitro* almond (Gürel dan Gülsen, 1998) dan *Oncidium* (Hong *et al.*, 2008), Peningkatan konsentrasi sukrosa dari 20 g/l menjadi 30 g/l dicatat menjadi konsentrasi yang optimum untuk regenerasi tunas pada kultur antera asparagus (Wolyn dan Nichols, 2003). Tetapi pada kultur antera lain ditemukan bahwa justru penurunan konsentrasi sukrosa yang meningkatkan keberhasilan regenerasi kalus, seperti yang dilaporkan oleh Tai dan Xiong (2003) pada kultur antera kentang atau bahkan substitusi sukrosa dengan jenis gula lainlah yang berpengaruh nyata terhadap regenerasi kalusnya hingga membentuk tunas seperti yang dilaporkan oleh Nichterlein (2003) pada kultur antera *Linum usitatissimum*.

Secara simultan peran sukrosa dan glukosa dalam pembentukan dan regenerasi kalus hingga pembentukan tunas dapat dijelaskan sebagai berikut. Pelukaan antera anthurium menginduksi terjadinya (1) sintesis protein yang didahului dengan meningkatnya mRNA yang mengkode enzim 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-fosfat sintase (DAHPS) dan (2) sintesis metabolit sekunder dengan adanya mRNA yang mengkode enzim *fenilalanine ammonia lyase* (Dyer *et al.*, 1989). Aktivitas enzim DAHPS menyebabkan beberapa jalur metabolisme, seperti jalur sikimat, biosintesis asam amino aromatik menjadi aktif (Beaudoin-Eagan dan Thorpe, 1983). Sukrosa dan glukosa dalam media diserap oleh eksplan melalui sel-sel jaringan penghubung atau sel-sel mesofil pada daerah terluka melalui fenomena "apoplastic loading" (Maynard dan Lucas, 1982). Bahan tersebut diubah menjadi piruvat dan malat melalui 2 jalur utama, yaitu: jalur glikolisis dan oksidasi pentose fosfat (Anonim, 2009). Glikolisis menghasilkan energi dalam bentuk ATP dan kerangka karbon penting pembentuk asam amino (fosfoglisarat (3C), piruvat (2C), α -ketoglutarat (5C) dan oxaloacetat (4C)) dan fosfoenolpiruvat (PEP, 3C), prekursor penting jalur sikimat untuk membentuk asam-asam amino aromatik (Leustek *et al.*, 2000; Kopriva *et al.*, 2002). Jalur pentose fosfat memiliki peran utama menyediakan NADPH sebagai sumber energi pada reaksi-reaksi biosintesis, ribose 5-fosfat untuk sintesis nukleotida dan eritrose 4-fosfat untuk sintesis turunan-turunan asam sikimat (Anonymous, 2009).

Aktivitas enzim DAHPS yang tinggi akibat pelukaan eksplan akan mengubah fosfoenolpiruvat dan eritrose-4-fosfat menjadi 3-deoksi- D-arabino- heptulosonate-7-fosfat (DAHP) dan masuk dalam jalur sikimat (Leustek *et al.*, 2000; Kopriva *et al.*, 2002). DAHP melalui beberapa

tahap sintesis yang melibatkan beberapa enzim akan menghasilkan korismat. Korismat merupakan prekursor utama sintesis asam amino dan hormon melalui jalur antranilate dan prepenate. Pada jalur antranilate, korismat membentuk triptofan, kemudian menghasilkan asam asetat indol (IAA). Peningkatan konsentrasi IAA endogen inilah yang selanjutnya menstimulasi pembelahan dan pembesaran sel menjadi lebih aktif (Davies, 2004). Dari jalur prepenate, korismat akan diubah menjadi tyrosin, bahan penting dalam pembentukan tunas (Beaudoin-Eagan dan Thorpe, 1983) dan fenilalanin menjadi prekursor penting pembentuk lignin, flavonoid dan antosianin (Winkel-Shirley, 2002).

Pada jalur biosintesis yang berbeda, fosfoglisarat akan diubah menjadi serine, cystein dan glysin. Piruvat akan diubah menjadi alanin, leusin dan valin. α -ketoglutarat menjadi salah satu kerangka karbon penting dalam siklus sintesis glutamate dan bersama dengan ion NH_3 , N_2 , asparagin, urea, asam-asam keton membentuk glutamine, glutamate, dan asam-asam amino (Leustek *et al.*, 2000; Kopriva *et al.*, 2002). Glutamin menjadi prekursor utama pembentukan histidin, asparagin, arginin, ureides, dan asam-asam nukleat. Dari glutamate akan terbentuk prolin, arginin, dan aminolevulinat (bahan penting pembentuk klorofil). Kerangka 4C oksaloasetat diubah menjadi aspartat oleh enzim aspartat aminotransferase. Aspartat tersebut menjadi prekursor utama pembentukan asparagin, lysine, treonin, methionin, dan isoleusin.

Jadi pemberian sukrosa, glukosa atau karbohidrat jenis yang lain sesungguhnya memacu pembentukan, regenerasi kalus, pembentukan tunas dan akar dalam kultur *in-vitro* melalui energi dan beberapa kerangka karbon yang dihasilkan. Kedua bahan tersebut menjadi bahan dasar penting dalam pembentukan berbagai jenis asam amino, asam nukleat, zat pengatur tumbuh, protein dan bahan lain yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in-vitro*.

Berdasarkan dua percobaan di atas dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian sukrosa dalam medium Winarto dan Rachmawati berpengaruh besar terhadap keberhasilan kultur antera anthurium dan regenerasi kalusnya dibanding glukosa. Peningkatan konsentrasinya dari 30 g/l menjadi 60 g/l memberikan dampak yang nyata terhadap pembentukan kalus, pertumbuhan dan regenerasinya. Sukrosa pada 60 g/l yang dikombinasikan dengan 30 g/l glukosa merupakan kombinasi paling sesuai untuk induksi pembentukan kalus dengan potensi antera tumbuh mencapai 92% dengan 67% antera membentuk kalus dan 4,0 kalus per perlakuan dihasilkan. Konsentrasi sukrosa ini juga

menjadi konsentrasi terbaik untuk pertumbuhan kalus dan regenerasinya dengan 332 mm³ per kalus dengan 3,2 tunas per eksplan.

KEPUSTAKAAN

- Anonim, 2009. Primary Carbohydrate Metabolism in Plants <http://people.ok.ubc.ca/negggers/Chem422A/Plant%20Carbohydrate%20Metabolism.pdf>. Access date 16 September 2009.
- Arora R, dan Bojwani SS, 1988. Production of Androgenic Plants through Pollen Embryogenesis in Anther Cultures of *Brassica carinata* A. BRAUN. *Biologia Plantarum* 30(1): 25–9.
- Arzate-Fernandez AM, Nakzaki T, Yamagata H, Tanisaka T, 1997. Production of double haploid plants from *Lilium longiflorum* Thunb. Anther culture. *Plant Sci.* 123: 179–87.
- Beaudoin-Eagan LD, and Thorpe TA, 1983. Shikimate Pathway Activity during Shoot Initiation in Tobacco Callus Cultures. *Plant Physiol.* 73: 228–32.
- Burbulis N, Blinstrubiene A, Sliesaravicius A, and Venskutoniene E, 2005. Influence of genotype, growth regulators, sucrose level and preconditioning of donor plants on flax (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *Acta Biol Hung.* 56(3–4): 323–31.
- Chen Y, dan Dribnenki P, 2004. Effect of medium osmotic potential on callus induction and shoot regeneration in flax anther culture. *Plant Cell Reps.* 23(5): 272–6.
- Davies PJ, 2004. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. pp: 1–15. **In:** Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Davies, PJ. (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London.
- Dyer WE, Henstrandt JM, Handat AK, dan Herrmann KM, 1989. Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in Solanaceae (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7370–3.
- George EF, 1993. Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology. 2nd Exegetics Limited. Edington, England. 574 pages.
- Coumans MP, dan Zhong D, 1995. Doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant production by androgenesis: fact or artifact? 1. *In vitro* isolated microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 41: 203–9.
- Gürel S dan Gülsen Y, 1998. The Effects of Different Sucrose, Agar and pH Levels on In Vitro Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.) *Tr. J. of Botany* 22 (1998) 363–73
- Han DS, Niimi Y dan Nakano M, 1997. Regeneration of haploid plants from anther cultures of the Asiatic Irbid lily ‘Connecticut King’. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 47: 153–8.
- Hong PI, Chen JT, dan Chang WC, 2008. Promotion of direct somatic embryogenesis of *Oncidium* by adjusting carbon sources *Biologia Plantarum* 52(3): 597–600.
- Ishizaka H, 1998. Production of microspore-derived plants by anther culture of an interspecific F1 hybrid between *Cyclamen persicum* and *C. purpurascens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 54: 21–8.
- Kopriva S, Suter M, von Ballmoos P, Hesse H, Krahenbuhl U, Rennenberg H, dan Brunold C, 2002. Interaction of Sulfate Assimilation with Carbon and Nitrogen Metabolism in *Lemna minor*. *Plant Physiol.* 130: 1406–13.
- Kumar A, Sood A, Palni LMS dan Gupta AK, 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 105–12.
- Last DI, dan Brettell RIS, 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Reports* 9: 14–6.
- Leustek T, Martin MN, Bick JA dan Davies JP, 2000. Pathways and Regulation of Sulfur Metabolism Revealed through Molecular and Genetic Studies. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51: 141–65.
- Lipavska H, dan Konradova H, 2004. Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Biol.-Plant.*, 40: 23–30.
- Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, dan Szarejsko I, 2003. Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. 428p.
- Maynard JW, dan Lucas WJ, 1982. Sucrose and Glucose Uptake into *Beta vulgaris* Leaf Tissues. A Case for General (Apoplastic) Retrieval Systems. *Plant Physiol.* 70: 1436–43.
- Nichterlein K, 2003. Anther culture of linseed (*Linum usitatissimum* L.) pp: 249–54. **In:** Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, and Szarejsko I (Eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London.
- Priyakumari I, Sheela VL, George S, dan Mirsa RL, 2002. Effect of carbon sources on In vitro shoot proliferation and rooting of gladiolus. *Floriculture Research Trend In India. Proceedings of the National Symposium on Indian Floriculture in new millennium, Lal-Bagh, Bangalore, Feb, 2002.*
- Rachmawati F, 2005. Kultur Antera pada Anthurium (*Anthurium andreanum* Linden ex André). Thesis. Departemen Agronomi and Hortikultura. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. 146 Halaman.
- Ramage CM, dan Williams RR, 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Biol.-Plant.*, 38: 116–24.
- Rutkowska-Krause I, Mankowska G, Lukaszewicz M, dan Szopa J. 2003. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell Rep.* 22(2): 110–6.
- Saji KV, dan Sujatha M, 1998. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Euphytica* 103: 1–7.

- Tai GCC, dan Xiong XY, 2003. Haploid production of potatoes by anther culture. pp: 229–234. **In:** Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster and I Szarejsko (Eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London.
- Thangene SR, Joshi MS, Khuspe SS, dan Mascarenhas AE, 1994. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. *Plant Cell Reports* 13: 222–6.
- Thorpe TA, Joy IV RW, dan Leung WM, 1986. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Physiol. Plant.* 66: 58–62.
- Winarto B, Rachmawati F, Pramanik D, dan Nuryani W, 2005. Analisa tingkat ploidi regeneran, perbaikan teknik kultur antera dan perbanyak regeneran hasil kultur antera. Laporan Hasil Penelitian. Balai Penelitian Tanaman Hias. Cianjur. 8 Halaman (Tidak dipublikasikan).
- Winarto B, dan Rachmawati F, 2007. Teknik kultur antera pada pemuliaan anthurium. *J. Hort.* 17(2): 127–37.
- Winkel-Shirley B, 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion Plant Biol.* 5: 218–23.
- Wolyn DJ, dan Nichols B, 2003. Asparagus microspore culture and anther culture. pp: 265–74. **In:** Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP and Szarejsko I (Eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London.
- Younas M, Rahman HU, Siddiqui SU dan Chaudhary MF, 2008. Effect of different carbon sources on in vitro shoot proliferation and rooting of peach rootstock GF 677. *Pak. J. Bot.*, 40(3): 1129–34.

Reviewer: **Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, M.Si.**