

PROPORSI MIKROSPORA UNINUKLEAT PADA EMPAT KLON TEBU (*Saccharum* spp.)

Suaib*, Woerjono Mangoendidjojo**, Mirzawan, P.D.N***, dan Ari Indrianto****

*) Fakultas Pertanian Universitas Haluoleo, Kendari; e-mail : suaib_06@yahoo.co.id

***) Fakultas Pertanian/Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

****) Pusat Penelitian dan Perkebunan Gula Indonesia (P3GI), Pasuruan Jawa Timur.

*****) Fakultas Biologi/Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

ABSTRACT

An experiment to study the two different morphological characters of four clones of sugarcane (*Saccharum* spp.) panicles containing more than 50% of uninucleate microspore development was conducted in Tissue Culture Laboratory at Biology Faculty, Gadjah Mada University, Yogyakarta, since March until May 2006. Morphological characters of both kinds of panicles i.e. unsheated- and sheated-flowers from sheat flag leaf were observed. Mean, percentage, and standard deviation from the mean value of the six different stages of microspore development e.g. tetrad, early- and late-uninucleate, early- and late-binucleate, and multinucleate or pollen grains were statistically used in this calculation. All data percentages were analyzed by variance analysis through General Linier Model Procedure, and comparisons between means of the uninucleate microspore development based on the two different morphological characters of four clones was calculated by Least Significance Difference method. Comparisons between the two different panicles characteristics in accordance with the proportion of the uninucleate microspore development, however, were analyzed by T-student procedure. All calculations were done by using SAS program of computer statistics package. Result of the research showed that: (1) the unsheated panicles were contained less than 50% of uninucleate (early- and late-uninucleate) microspore development; (2) the sheated panicles tend to be in high proportion of early- and late-uninucleate microspore development, and multinucleate or pollen grains, and (3) the more away of spikelets or anthers positioned in the panicle or sub-panicle, the more number or percentage of uninucleate microspores development were tend to be gradually decreased.

Key words: panicle morphology, microspore, uninucleate, pollen grains, *Saccharum* spp.

PENGANTAR

Penemuan tanaman haploid pada tanaman *Datura stramonium* awal abad XX oleh Blakeslee dan koleganya (Blakeslee *et al.*, 1922), mengilhami penelitian dan pengaplikasian teknik pemuliaan haploid secara *in vitro* bagi banyak tanaman budidaya hingga saat ini. Sampai tahun 1983, telah berhasil diperoleh tanaman haploid dan haploid ganda melalui kultur antera (*anther culture*) dan kultur mikrospora (*microspore culture*) secara *in vitro* pada 247 spesies dari 88 genera dan 34 famili. Bahkan, tahun 2004 telah dilepas lebih dari 60 kultivar unggul berbagai spesies hasil kultur antera dan mikrospora.

Keberhasilan mendapatkan tanaman haploid dan atau haploid ganda melalui kultur antera atau melalui kultur mikrospora, ditentukan oleh beberapa faktor. Faktor-faktor dimak-sud adalah: (1) genotipe tanaman donor, (2) kondisi pertumbuhan tanaman donor, (3) tahap perkembangan mikrospora, (4) praperlakuan, dan (5) medium dan kondisi kultur (Kush dan Virmani, 1996; Palmer dan Keller, 1997; Bhojwani dan Bhatnagar, 1999).

Tahap perkembangan mikrospora sebagai salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kultur antera atau kultur mikrospora berkaitan erat dengan arah diferensiasi mikrospora, yakni terbentuknya embrio dan atau kalus. Terbentuknya embrio akan menghasilkan tanaman hijau dan lengkap, sedangkan terbentuknya kalus cenderung akan menghasilkan tanaman bulai dalam frekuensi yang tinggi.

Pada tanaman *barley* (Kasha *et al.*, 2001) dan *wheat* (Liu *et al.*, 2002) diperoleh mikrospora embriogenik dan tanaman haploid ganda dalam jumlah yang tinggi apabila mikro-spora dikulturkan pada tahap uninukleat tengah (*mid-uninucleate*) hingga uninukleat akhir (*late-uninucleate*). Sementara itu, peneliti lain melaporkan bahwa produksi tanaman haploid ganda (*doubled haploid*) yang sangat tinggi pada tanaman *barley* juga dapat dicapai apabila mikrospora dikulturkan ketika berada pada tahap uninukleat awal hingga uninukleat akhir (Li dan Devaux, 2003). Pada tanaman *Brassica napus* (Cordewener *et al.*, 1996), untuk menghasil-kan embrio yang banyak, mikrospora harus berada pada tahap akhir mikrospora berinti satu hingga pada tahap awal mikrospora berinti dua (*early-binucleate*).

Pada tanaman tebu (*Saccharum* spp.), tahap perkembangan mikrospora bagi kultur antera memberikan hasil terbaik ketika mikrospora berada pada tahap sesaat setelah stadium sel induk tepung sari (*PMC, pollen mother cell*) yaitu stadium dua sel (*diad*) hingga empat sel (*tetrad*) (Chen *et al.*, 1979). Sementara itu, Fitch dan Moore (1983) mengemukakan bahwa tahap *late-uninucleate* hingga *early-binucleate* merupakan tahap yang paling sesuai bagi embriogenesis mikrospora pada tanaman tebu liar, *S. spontaneum* L.

Tahap-tahap perkembangan mikrospora di atas mempunyai hubungan yang signifikan dengan morfologi dan panjang waktu setelah inisiasi bunga atau malai. Namun demikian, penggunaan rentang umur setelah inisiasi bunga atau malai, kurang diaplikasikan karena sulitnya menentukan saat mula-mula terjadinya inisiasi bunga atau malai. Akan tetapi, penggunaan kriteria morfologi bunga berupa ukuran panjang kemunculan *petal* di atas *sepal* atau kemunculan malai di atas daun bendera, merupakan kriteria yang umum dipakai berturut-turut pada banyak tanaman *non-gramineae* dan *gramineae*.

Pada tanaman rumput makanan ternak tahunan, *ryegrass* (*Lolium perenne* L.), pemunculan seperempat bagian malai di atas daun bendera menghasilkan populasi mikrospora terbanyak pada fase *uninucleate* (Suaib *et al.*, 1997). Sementara itu, untuk tanaman padi ladang beberapa varietas lokal asal Kendari menunjukkan bahwa malai yang muncul di atas gulungan kelopak daun bendera setinggi kurang dari 3 cm menghasilkan mikrospora *uninucleate* dalam jumlah > 60% (Suaib, 2000).

Indrianto (2003) menyatakan bahwa pada tanaman *wheat*, morfologi pertumbuhan malai yang mengandung mikrospora yang sesuai untuk kultur *in-vitro* adalah ketika cabang malai masih di dalam bungkus daun bendera atau belum ada bulir yang muncul di atas daun bendera. Khusus pada tanaman tebu liar *S. spontaneum* L., dilaporkan bahwa mikrospora yang sesuai bagi kultur antera adalah ketika cabang malai masih berada di dalam bungkus daun bendera (Fitch dan Moore, 1983; Moore *et al.*, 1989).

Belum ada informasi mengenai persentase mikrospora uninukleat di dalam malai yang masih terbungkus oleh kelopak daun bendera dan telah muncul di atas daun bendera bagi klon tebu *S. officinarum* dan klon hibrida kompleks yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Tulisan ini mendiskusikan proporsi mikrospora uninukleat lebih dari 50% pada malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya bagi dua klon tebu *S. officinarum* dan dua klon tebu hibrida kompleks.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penanaman Tanaman Donor

Potongan batang (bagal, *setts*) tebu klon: (1) 52-OC-2, (2) 52-OC-4, (3) PS-58, dan (4) POJ-3025 sepanjang dua buku yang digunakan dalam penelitian ini, ditanam pada 4 Juli 2005 di Rumah Kawat Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Kampus Bulak Sumur, Yogyakarta. Bagal ditanam dengan posisi horizontal di dalam juring pada kedalaman ± 25 cm. Panjang juring adalah 500 cm dan jarak antara juring adalah 100 cm. Setelah tumbuh, tanaman dipelihara hingga berbunga dengan pemupukan N, P, dan K, berturut-turut berupa Urea, SP36, dan KCl dengan dosis berturut-turut 200, 100, dan 100 kg per hektar atau berturut-turut 0,10; 0,05, dan 0,05 kg per 500 cm panjang juring. Aplikasi ketiga pupuk di atas seluruhnya dilakukan pada umur empat minggu setelah tanam (MST).

Selain pemupukan, juga dilakukan pengendalian gulma dan pengaturan pengairan atau penyiraman, serta pembumbunan tanah pada baris tanaman. Tanaman mulai berbunga pada umur 37, 38, 40, dan 39 MST berturut-turut bagi klon 52-OC-2, 52-OC-4, PS-58, dan POJ-3025. Sementara itu, isolasi mikrospora dimulai pada umur 39 MST atau bulan Maret 2006.

Pemanenan dan Pengukuran Panjang dan Diameter Malai

Tanaman tebu yang telah bermalai, baik yang belum maupun yang telah memunculkan cabangnya, dipotong pada 2–3 ruas di bawah pangkal malai. Pangkal malai tersebut dimasukkan ke dalam tabung gelas yang berisi air kran, lalu dibungkus dengan kertas koran yang lembap kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin pada suhu 5 °C. Pengukuran panjang malai dilakukan menggunakan meteran pita dengan mengukur panjang atau jarak antara bagian paling ujung malai yang belum memunculkan cabangnya, atau bagian paling ujung bulir yang muncul bagi malai yang telah memunculkan cabangnya, dengan ruas pangkal cabang malai.

Sementara itu, pengukuran diameter malai dilakukan menggunakan jangka sorong pada bagian tengah malai.

Isolasi dan Pemeriksaan Tahap Perkembangan Mikrospora

Mikrospora diisolasi dengan mengeluarkan antera dari dalam *lemma* dan *palea* bulir menggunakan sepasang pinset, kemudian diletakkan di atas *glass slide* yang sebelumnya telah ditetesi dengan larutan 3% sukrosa. Dengan ujung sepasang pinset, mikrospora dikeluarkan dari dalam

antara dengan membelah antera hingga mikrospora keluar seluruhnya. Kotoran berupa sisa-sisa jaringan dinding antera dibuang, kemudian ditutup dengan *cover slip* dan diamati di bawah mikroskop cahaya.

Populasi masing-masing tahap perkembangan mikrospora, diamati pada malai dengan: (1) cabang malai yang masih terbungkus di dalam kelopak daun bendera, dan (2) cabang malai yang telah muncul di atas daun bendera. Pengamatan dilakukan pada tiga bagian malai, yakni: bagian ujung, tengah dan pangkal. Penentuan tahap perkembangan mikrospora di atas menggunakan patokan letak inti mikrospora pada tanaman gandum (Lu dan Kuo, 1984), pada tanaman *Barley* (Kasha *et al.*, 2001), dan pada tanaman padi (Zhang *et al.*, 2005). Adapun tahap-tahap perkembangan mikrospora yang diamati adalah: (a) tetrad, (b) uninukleat awal, (c) uninukleat akhir, (d) binukleat awal, (e) binukleat akhir, dan (f) multinukleat atau polen.

Ciri morfologi keenam tahap perkembangan mikrospora adalah: *tetrad*, inti terletak pada bagian tengah dengan mikrospora yang masih kecil; uninukleat awal, inti terletak pada bagian tepi dekat dinding mikrospora dan dekat porus tumbuh (*germ pore*) yang membagi dua dari seperempat bagian lingkaran mikrospora; uninukleat akhir, inti terletak pada bagian tepi dekat dinding mikrospora dan berlawanan dengan porus tumbuh atau membagi dua bagian lingkaran mikrospora; binukleat awal, inti vegetatif dan inti generatif yang berdekatan, sedangkan inti generatif terletak dekat dengan dinding mikrospora atau *intine*; binukleat akhir, inti generatif telah bergeser ke bagian tengah mikrospora; dan multinukleat atau tepung sari, inti berjumlah lebih dari dua dan telah mengandung butir-butir pati di dalam sitoplasma.

Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah persentase enam tahap perkembangan mikrospora meliputi: (1) tetrad, (2) uninukleat awal, (3) uninukleat akhir, (4) binukleat awal, (5) binukleat akhir, dan (6) multinukleat atau tepung sari. Persentase mikrospora tetrad dihitung dengan formula:

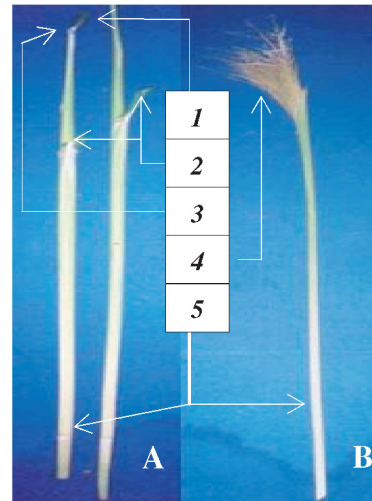
$$\text{Persen tetrad (\% TET)} = \frac{\text{S TET}}{\text{S TOT}} \times 100\%$$

dengan:

$\Sigma \text{ TET}$ = jumlah tetrad

$\Sigma \text{ TOT}$ = jumlah tetrad + jumlah uninukleat + jumlah multinukleat.

Sementara itu, perhitungan lima tahap perkembangan mikrospora lainnya, mengikuti cara yang sama dengan cara



Gambar 1. Malai tebu Klon POJ-3025 yang belum (A) dan telah (B) mengeluarkan cabangnya. **Keterangan:** 1 = daun bendera, 2 = satu daun di bawah daun bendera, 3 = lidah (*auricle*) daun bendera, 4 = bulir (*spikelets*) dan cabang malai yang telah keluar, dan 5 = letak relatif pangkal malai di dalam bungkus kelopak daun pertama di bawah daun bendera. Tiga klon lainnya, (52-OC-2, 52-OC-4, dan PS-58) mempunyai morfologi malai yang sama dengan klon POJ-3025.

perhitungan tetrad di atas dengan menyesuaikan jumlah pembilang yang dihitung. Selain itu, jarak antara lidah (*auricle*) daun bendera dengan lidah daun di bawahnya, juga diukur menggunakan meteran pita sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 1.

Analisis Data

Untuk mengetahui proporsi mikrospora, setiap bagian malai diamati tiga cabang malai dan masing-masing cabang malai diamati tiga bulir, di mana setiap bulir terdiri atas tiga antera yang mengandung mikrospora. Cabang malai adalah unit pengamatan dan setiap unit pengamatan diulang tiga kali dengan masing-masing diamati minimal 300 butir mikrospora. Setiap klon pengamatan diulang minimal tiga kali (tiga malai) dan pengamatan ulangan dilakukan pada waktu dan dengan malai yang berbeda.

Analisis varians hanya dilakukan bagi data populasi mikrospora uninukleat yang didahului pemeriksaan distribusinya dengan uji-*W* (Shapiro dan Wilk, 1965 dalam Zar, 1999), dan pemeriksaan homogenitas variansnya dengan uji-*Bartlett* (Bartlett, 1937 dalam Zar, 1999). Perbandingan rerata populasi mikrospora uninukleat antara keempat klon menurut malai yang belum dan telah muncul cabangnya, dilakukan dengan uji-*t* Fisher (LSD, *Least Significance Difference*), sedangkan perbandingan

Tabel 1. Jumlah, rerata panjang, dan diameter malai (cm), dan umur berbunga (MST) empat klon tebu tanaman donor sumber mikrospora

Klon	Jumlah malai	Panjang malai	Diameter malai	Umur berbunga (MST)
52-OC-2	4	95,88 ± 11,92	1,23 ± 0,19	37
52-OC-4	5	101,00 ± 13,27	1,58 ± 0,15	38
PS-58	3	74,67 ± 03,04	1,73 ± 0,05	40
POJ-3025	5	95,50 ± 08,53	1,60 ± 0,11	39

± Simpangan baku

Tabel 2. Berbagai ukuran rerata panjang (cm), dan diameter malai (cm), serta jarak (cm) antara lidah daun bendera dengan lidah daun di bawahnya empat klon tebu tanaman donor dengan cabang malai yang belum dan telah muncul

Klon	Panjang malai		Diameter malai		Jarak LDB – LDH	
	CMB	CMT	CMB	CMT	CMB	CMT
52-OC-2	81,00	100,83	1,10	1,27	8,00	14,17
52-OC-4	90,67	116,50	1,47	1,75	5,67	13,90
PS-58	72,00	76,00	1,80	1,70	4,00	7,75
POJ-3025	89,67	104,25	1,67	1,50	6,00	10,50
Rerata	83,33	101,39	1,51	1,55	5,92	11,58

Keterangan : LDB = lidah daun bendera;

LDH = lidah daun di bawah daun bendera

CMB = cabang malai belum muncul;

CMT = cabang malai telah muncul

antara malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya dilakukan dengan uji-t (*Student's T-test*) sesuai prosedur Steel dan Torrie (1995). Untuk mengetahui ada tidaknya dan erat tidaknya hubungan antara jarak lidah daun bendera dan lidah daun di bawahnya dengan persentase mikrospora uninukleat dan multinukleat, dilakukan penghitungan nilai koefisien korelasi Pearson. Semua perhitungan di atas menggunakan paket statistika SAS (SAS Institute Inc., 1989–1996).

HASIL

Paling sedikit, telah diamati 413.100 butir mikrospora dan tepung sari dari 1.377 antera, 459 bulir, 153 bagian cabang malai, 51 cabang malai, dan 17 malai empat klon tebu *Saccharum* spp., dalam menentukan persentase mikrospora uninukleat > 50% pada malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya. Malai-malai tersebut berasal dari dua klon *S. officinarum* masing-masing klon 52-OC-2 dan 52-OC-4, dan dua klon hibrida kompleks yakni PS-58 dan POJ-3025, sedangkan 51 cabang malai masing-masing berasal dari tiga bagian, yakni: (1) ujung, (2) tengah, dan (3) pangkal malai. Masing-masing cabang malai mengandung tiga bulir di mana setiap bulir mengandung tiga antera. Jumlah, rerata panjang dan diameter malai, serta umur berbunga keempat klon objek pengamatan disajikan pada Tabel 1.

Nilai-nilai simpangan baku di atas menggambarkan tingkat variabilitas yang berarti perbedaan nilai pengukuran antar-sampel pada klon yang sama, semakin besar nilai variabilitas, semakin besar perbedaan antara sampel. Keempat klon yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan nilai variabilitas yang kecil. Apabila panjang dan diameter malai diurai menurut malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya, terlihat bahwa kedua malai menunjukkan perbedaan nilai rerata antarpanjang dan antardiameter malai. Demikian juga, jarak antara lidah daun bendera dengan satu lidah daun di bawahnya memperlihatkan nilai rerata yang berbeda sebagaimana disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa malai yang belum memunculkan cabangnya mempunyai ukuran yang lebih pendek jika dibandingkan dengan malai yang telah memunculkan cabangnya. Demikian juga jarak antara lidah daun bendera dengan lidah daun di bawahnya menunjukkan jarak yang lebih panjang pada malai yang telah memunculkan cabangnya daripada malai yang belum memunculkan cabangnya. Sedangkan diameter malai keduanya menunjukkan ukuran yang relatif sama.

Hasil pengamatan persentase masing-masing tahap perkembangan mikrospora yang didasarkan kepada enam tahap, menunjukkan bahwa tidak ada konsistensi antara malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya khususnya dilihat dari aspek ada tidaknya mikrospora

Tabel 3. Rerata persentase (%) tahap perkembangan mikrospora pada empat klon tebu tanaman donor dengan malai yang belum dan telah muncul cabangnya

Mikrospora	52-OC-2		52-OC-4		PS-58		POJ-3025	
	CMB	CMT	CMB	CMT	CMB	CMT	CMB	CMT
Tetrad	73,56	0,00	48,18	0,00	58,06	4,30	64,22	0,00
Uninukleat Awal	20,14	44,21	23,12	39,11	21,79	35,64	13,25	6,38
Uninukleat Akhir	6,30	32,16	16,62	21,67	16,09	27,32	11,62	19,56
Binukleat Awal	0,00	11,33	7,81	19,44	4,06	9,90	8,06	18,74
Binukleat Akhir	0,00	9,08	4,22	11,22	0,00	8,48	2,85	34,73
Multinukleat	0,00	3,22	0,00	8,56	0,00	14,36	0,00	20,59

Keterangan: CMB = cabang malai belum muncul; CMT = cabang malai telah muncul

Tabel 4. Rerata persentase (%) tiga kelompok tahap perkembangan mikrospora dan dua ciri morfologi pertumbuhan malai pada empat klon tebu tanaman donor

Klon	Cabang malai belum muncul			Cabang malai telah muncul		
	Tetrad	Satu inti ^{*)}	Polen	Tetrad	Satu inti ^{*)}	Polen
52-OC-2	73,56	26,44	0,00	0,00	76,38	23,62
52-OC-4	48,18	39,79	12,03	0,00	60,78	39,22
PS-58	58,06	37,88	4,06	4,30	62,96	32,74
POJ-3025	64,22	24,87	10,91	0,00	25,94	74,06
Rerata	61,00	32,25	6,75	1,08	56,52	42,41

Keterangan: ^{*)} Satu inti = mikrospora uninukleat

multinukleat atau polen. Persentase komposisi enam tahap perkembangan mikrospora pada empat klon tebu berdasarkan malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya ditampilkan pada Tabel 3.

Berdasarkan pertimbangan pemanfaatan mikrospora untuk kultur *in-vitro* maka dari enam tahap perkembangan mikrospora, dikelompokkan menjadi tiga tahap yakni tahap: (1) tetrad, (2) uninukleat, dan (3) multinukleat atau polen. Tahap uninukleat adalah gabungan mikrospora uninukleat awal dan uninukleat akhir, sedangkan tahap multinukleat adalah gabungan mikrospora binukleat awal, binukleat akhir dan multinukleat atau polen. Hasil perhitungan persentase tiga kelompok tahap perkembangan mikrospora menurut klon, dan malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya, dicantumkan pada Tabel 4.

Tabel 4 menunjukkan bahwa malai dengan cabang yang belum muncul mengandung persentase rerata mikrospora uninukleat < 50%, sedangkan malai yang telah memunculkan cabangnya mengandung persentase rerata mikrospora uninukleat > 50% (56,52%).

Tidak satupun klon dari malai yang belum memunculkan cabangnya mencapai persentase rerata mikrospora uninukleat > 50%. Sedangkan klon 52-OC-2, 52-OC-4, dan PS-58 adalah klon-klon yang telah memunculkan cabang malainya dengan persentase rerata mikrospora uninukleat > 50%. Klon POJ-3025 merupakan satu-satunya klon yang

telah memunculkan cabang malainya dengan persentase rerata mikrospora uninukleat < 50%.

Uji homogenitas ragam rerata persentase mikrospora uninukleat antara klon dalam cabang malai yang belum atau telah muncul, dan rerata persentase mikrospora uninukleat antara malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya menunjukkan varian atau ragam yang homogen. Dengan demikian, memenuhi syarat untuk penerapan analisis varian pada rerata persentase mikrospora uninukleat.

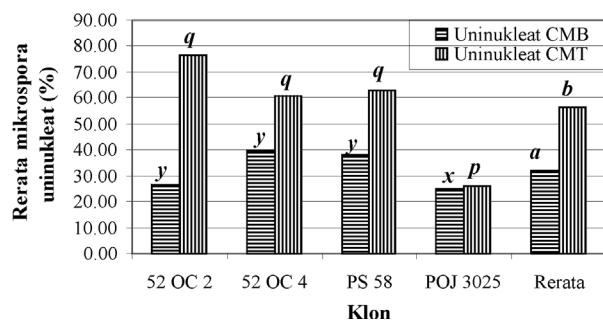
Analisis varian menurut pola rancangan acak lengkap (CRD, *completely randomized design*) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan rerata persentase mikrospora uninukleat antara klon dengan malai yang belum memunculkan cabangnya ($Pr > F = 0,1134$). Hasil uji LSD beda rerata persentase mikrospora uninukleat antara klon dengan malai yang belum memunculkan cabangnya menunjukkan bahwa klon 52-OC-4 berbeda signifikan dengan klon POJ-3025, akan tetapi berbeda tidak signifikan dengan klon 52-OC-2 dan PS-58 (Gambar 2).

Analisis varian rerata persentase mikrospora uninukleat antara klon dengan malai yang telah memunculkan cabangnya menunjukkan adanya perbedaan ($Pr > F = 0,0067$). Hasil uji LSD beda rerata persentase mikrospora uninukleat antara klon dengan malai yang telah memunculkan cabangnya menunjukkan bahwa klon 52-OC-2 berbeda sangat signifikan dengan klon POJ-3025,

Tabel 5. Koefisien korelasi Pearson antara persentase mikrospora uninukleat, persentase mikrospora multinukleat dengan jarak antara lidah daun bendera dan lidah daun di bawahnya bagi empat klon tebu dengan cabang malai yang belum muncul, telah muncul, dan gabungan cabang malai yang belum dan telah muncul

Morfologi malai	Nilai koefisien korelasi Pearson	
	Uninukleat	Multinukleat
Cabang malai belum dan telah muncul	0,46 (0,06)	0,36 (0,16)
Cabang malai belum muncul (CMB)	- 0,62 (0,10)	- 0,61 (0,11)
Cabang malai telah muncul (CMT)	0,18 (0,65)	- 0,13 (0,74)

Keterangan: Angka-angka dalam kurung menunjukkan nilai probabilitas (*P*)



Gambar 2. Perbandingan persentase rerata mikrospora uninukleat antara malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya pada empat klon tebu bahan penelitian (*a* dan *b*, adalah simbol beda rerata menurut uji-t, sementara itu *p* dan *q*, dan *x* dan *y*, adalah simbol beda rerata menurut uji LSD, pada taraf kepercayaan 95%; CMB = cabang malai belum muncul, CMT = cabang malai telah muncul).

akan tetapi berbeda tidak signifikan dengan klon 52-OC-4 dan PS-58 (Gambar 2).

Hasil uji-t rerata persentase mikrospora uninukleat antara malai yang belum memunculkan cabangnya mengindikasikan perbedaan yang signifikan dengan malai yang telah memunculkan cabangnya (Gambar 2).

Pemeriksaan distribusi data bagi keenam variabel penelitian menunjukkan persebaran data secara normal sehingga teknik analisis korelasi yang tepat adalah analisis korelasi Pearson. Analisis korelasi Pearson berturut-turut dilakukan antara rerata persentase mikrospora uninukleat dan rerata persentase multinukleat dengan jarak antara lidah daun bendera dengan lidah daun di bawahnya, baik secara gabungan maupun secara parsial bagi malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya (Tabel 5).

Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kurang erat antara persentase mikrospora uninukleat dengan jarak lidah daun bendera dan lidah daun di bawahnya, baik bagi malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya maupun gabungan keduanya. Hal yang sama juga terjadi pada persentase mikrospora multinukleat

(polen), dan bahkan koefisien korelasi Pearson mikrospora uninukleat dan multinukleat ada yang bernilai negatif.

PEMBAHASAN

Menurut Moore (1987) bunga tanaman tebu berbentuk malai (*panicle*) membuka setelah muncul dari bungkus daun bendera, terdiri atas cabang utama (*rachis*) dan anak-anak cabang (*rachilla*) yang merupakan tempat terbentuknya susunan cabang pertama, kedua, dan ketiga. Pada bagian bawah atau pangkal malai, ukurannya besar kemudian semakin ke atas semakin kecil sampai pada ujung malai yang hanya terdiri atas satu cabang. Bulir (*spikelets*) yang terdiri atas bulir bagian pangkal (*sessile florets*) dan bulir di atas bulir pangkal (*pedicellate florets*) terbentuk pada anak cabang lateral dan anak-anak cabang.

Hasil pengamatan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa kematangan tepung sari terjadi mulai dari ujung malai utama dan ujung cabang malai paling atas hingga cabang malai paling bawah. Hal ini karena persentase terbanyak mikrospora yang sudah memasuki tahap perkembangan lebih dari satu inti atau tepung sari adalah pada *sessile florets* malai utama dan bulir pada bagian ujung cabang malai. Pada pengamatan ini, tidak ditemukan mikrospora yang masih berada pada tahap *diad* sebagaimana dilaporkan oleh Raghavan (1988) pada tanaman padi, Summers *et al.* (1992) pada tanaman tomat, da Silva-Lauxen *et al.* (2003) pada tanaman kedelai, dan Indrianto *et al.* (2004) pada tanaman cabai besar. Ketiadaan mikrospora tahap *diad* pada penelitian ini disebabkan oleh umur malai yang mulai memasuki tahap perkembangan lebih lanjut yang ditandai oleh semakin panjangnya ukuran malai dan munculnya cabang malai di atas gulungan daun bendera sehingga semakin banyak mikrospora yang telah memasuki perkembangan lebih lanjut.

Berdasarkan ukuran panjang antera pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.), Raghavan (1988) melaporkan bahwa semakin panjang ukuran antera, semakin tinggi persentase mikrospora yang berada pada tahap perkembangan lebih

lanjut. Sementara itu, semakin lanjut pertumbuhan malai akan semakin panjang pula ukuran anteranya sehingga pada ukuran bulir sepanjang 7.000–9.142 μm , antera akan berukuran 1.125–1.750 μm , dan umumnya, mikrospora telah berada pada tahap uninukleat dan sebagian telah memasuki tahap binukleat.

Meskipun beragam ukuran panjang kuncup pada tiga kultivar tanaman tomat, masing-masing: *A. Craig*, *L-680A*, dan *Licato*, ukuran panjang antera ketiganya relatif sama yakni 2,8–3,5 mm. Ketiga kultivar dimaksud hanya mengandung mikrospora berinti satu (Summers *et al.*, 1992). Demikian pula pada tiga kultivar kedelai berturut-turut: *Decada*, *IAS5*, dan *RS7*, dilaporkan bahwa bunga yang berukuran 1,5–2,9 mm akan mengandung mikrospora mulai pada tahap sebelum *diad* hingga *tetrad*, sedangkan bunga yang telah berukuran 3,0–3,5 mm akan mengandung mikrospora pada tahap uninukleat awal hingga uninukleat akhir (da Silva-Lauren *et al.*, 2003).

Pada tanaman cabai besar, Indrianto *et al.* (2004) menguraikan bahwa mikrospora pada tahap *tetrad* hanya dijumpai pada kuncup bunga yang berukuran hingga 0,3–0,5 cm dan anteranya berwarna hijau muda, sebagian hijau dan sebagian ungu, akan mengandung mikrospora uninukleat. Setelah bunga berukuran 0,6–0,8 cm dan anteranya berwarna ungu muda, bunga hanya akan mengandung mikrospora binukleat. Dengan demikian, tahap perkembangan mikrospora di dalam antera sangat ditentukan oleh ukuran malai atau bunga dan antera, sehingga penggunaan ciri morfologi malai atau ukuran kuncup atau malai merupakan cara yang tepat dalam menentukan tahap perkembangan mikrospora yang sesuai bagi pelaksanaan kultur mikrospora dalam pemuliaan haploid secara *in-vitro*.

Dari pustaka yang dikemukakan di atas jelas menunjukkan kecenderungan bahwa semakin panjang ukuran bunga dan antera akan semakin besar populasi mikrospora yang memasuki tahap perkembangan multinukleat. Demikian juga, semakin panjang ukuran bunga atau antera semakin lanjut perkembangan bunga atau malai tanaman yang berbanding lurus dengan umur tanaman. Kondisi ini dapat juga diketahui dengan melihat morfologi bunga atau malai tanaman bersangkutan, seperti: panjang pemunculan cabang malai di atas daun bendera atau jarak antara lidah daun bendera dengan lidah daun di bawahnya, atau ukuran kuncup bunga. Ogawa *et al.* (1995) melaporkan bahwa cabang malai padi *Indica* (IR24) dan *Japonica* (*Nipponbare*) yang telah muncul di atas daun bendera sepanjang 5–10 cm menghasilkan mikrospora

dalam jumlah yang lebih banyak pada tahap uninukleat dan binukleat awal.

Rodrigues *et al.* (2006) melaporkan bahwa dari empat kultivar kedelai yang diteliti, yakni: *IAS-5*, *Bragg*, *Conquista*, dan *Uirapuru* menunjukkan bahwa keempat kultivar menunjukkan persentase mikrospora uninukleat yang beragam meskipun dengan menggunakan ukuran bunga (3,0–3,5 mm) yang sama. Hasil penelitian yang sama di atas juga dijumpai dalam penelitian sebelumnya (Suaib *et al.*, 2006), di mana dari tiga klon tebu yang diamati dan empat klon tebu yang diobservasi pada penelitian ini (Tabel 4) menunjukkan persentase mikrospora uninukleat yang berbeda.

Perbedaan proporsi mikrospora uninukleat pada penelitian ini membuktikan bahwa perbedaan genotipe dan morfologi malai akan menghasilkan tahap perkembangan mikrospora yang berbeda. Perbedaan tersebut bahkan juga teramati dalam klon yang sama. Hal ini karena adanya perbedaan status fisiologi pertumbuhan tanaman donor (*physiological state of the donor plant*) di mana di dalamnya termasuk waktu mengakhiri proses meiosis sel induk tanaman (*pollen mother cell*) dan memasuki fase pembelahan mitosis bagi mikrospora uninukleat akhir (*late-uninucleate*).

Berdasarkan pengamatan persentase mikrospora uninukleat lebih dari 50% pada malai yang belum dan telah memunculkan cabangnya bagi empat klon *Saccharum* spp., dapat disimpulkan sebagai berikut: (1) pada malai dengan cabang yang masih terbungkus di dalam kelopak daun bendera terdapat mikrospora kurang dari 50% pada tahap uninukleat; (2) malai dengan cabang yang telah muncul di atas daun bendera cenderung akan mengandung mikrospora yang sebagian besar pada tahap uninukleat dan binukleat atau tepung sari, dan (3) semakin ke ujung letak bulir atau antera pada malai atau cabang malai, jumlah mikrospora yang berada pada tahap uninukleat cenderung semakin berkurang.

Isolasi mikrospora paling tepat dilakukan pada saat cabang malai belum muncul di atas daun bendera meskipun persentase mikrospora berinti satu mencapai jumlah kurang dari 50%. Hal ini disebabkan oleh jumlah mikrospora multinukleat yang cukup tinggi jika isolasi dilakukan pada malai yang telah memunculkan cabangnya. Di samping itu, sebelum isolasi dan kultur mikrospora dilakukan, praperlakuan malai atau bulir atau antera pada suhu dingin selama lebih dari tujuh hari akan mendorong perkembangan mikrospora dari tahap *diad* dan *tetrad* menjadi mikrospora uninukleat sehingga akan menambah proporsi mikrospora uninukleat ketika isolasi dan induksi embriogenesis setelah praperlakuan inkubasi.

KEPUSTAKAAN

- Bhojwani SS dan Bhatnagar SP, 1999. *The embryology of angiosperms*. 4th Revised and enlarged edition. Vikas Publishing House PVT. LTD. 308–321.
- Blakeslee AJ, Belling ME, Farnham dan Berger AD., 1922. A haploid mutant in the jimson weed *Datura stramonium*. *Science*, 55: 646–647.
- Chen ZH, Qian C, Qin M, Wang C, Suo C, Chen F dan Dheng Z., 1979. The induction of pollen plants of sugarcane. *Annual Report Institute of Genetics Academia Sinica*, 91–93.
- Cordewener JHG, Custers JBM, Dons HJM, dan Van Lookeren Campagne MM, 1996. Molecular and biochemical events during the induction of microspore embryogenesis. *Dalam: Jain SM, Sopory SK, and Veilleux RE, (Eds.). In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Vol. 1, Fundamental Aspects and Methods*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 111–124.
- da Silva-Lauxen M, Kaltchuk-Santos E, Hu CY, Callegari-Jacques SM, dan Bodanese-Zanettini MH, 2003. Association between floral bud size and developmental stage in soybean microspores: implications for anther culture. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 515–520.
- Fitch MM dan Moore PH, 1983. Haploid production from anther culture of *Saccharum spontaneum* L. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 109: 197–206.
- Indrianto A, 2003. Cytological and ultrastructural features of initiation of wheat microspore embryogenesis. *Biologi*, 3(2): 65–79.
- Indrianto A, Semiarti E, dan Surifah, 2004. Produksi galur murni melalui induksi embrio-genik mikrospora cabai merah dengan stres. *Zuriat*, 15(2): 133–139.
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, dan Carlson AR, 2001. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*, 120: 379–385.
- Kush GS, dan Virmani SS., 1996. Haploids in plant breeding. *Dalam: Jain SM, Sopory SK, and Veilleux RE, (eds.) In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Vol.1. Fundamental Aspects and Methods*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 12–17.
- Li H dan Devaux P, 2003. High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Science*, 164: 379–386.
- Liu W, Zheng MY, Polle EA, dan Konzak CF, 2002. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Science*, 42: 686–692.
- Lu WL dan Kuo CS, 1984. Cytological observation of microsporogenesis and pollen development in wheat *in vivo*. *Acta Botanica Sinica*, 26: 26–33.
- Moore PH, 1987. Anatomy and morphology. *Dalam: Heins DJ, (ed.). Sugarcane Improvement Through Breeding*. Developments in Crop Science 11. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, Tokyo, 85–142.
- Moore PH, Nagai C, dan Fitch MM, 1989. Production and evaluation of sugarcane haploids. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology*, 20: 599–607.
- Ogawa T, Fukuoka H, dan Ohkawa Y, 1995. Plant regeneration through direct culture of isolated pollen grains in rice. *Breeding Science*, 45: 301–307.
- Palmer CE, dan Keller WA, 1997. Pollen embryos. *Dalam: Shrivanna KR, and Sawney VK, (eds.). Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. Cambridge University Press. U.K., 329–422.
- Raghavan V, 1988. Anther and pollen development in rice (*Oryza sativa* L.). *American Journal of Botany*. 75(2): 183–196.
- Rodrigues LR, de Camargo-Forte B, dan Bodanese-Zanettini MH, 2006. Isolation and culture of soybean (*Glycine max* L. Merrill) microspores and pollen grains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4): 537–545.
- SAS Institute Inc, 1989-1996. *SAS/STAT User's Guide Release 6.12*. SAS Institute, Inc., Cary N.C.
- Steel RGD dan Torrie JH, 1995. *Principles and procedures of statistics. A Biometrical Approach*. International Student Edition. McGraw-Hill Koga Kushi, Ltd. 137–167.
- Suaib, Madsen S, Olesen A, dan Andersen SB, 1997. Seleksi tanaman rumput makanan ternak tahunan Ryegrass (*Lolium perenne* L.) yang tanggap terhadap perlakuan prakultur anthera. *Zuriat*, 8(2): 90–98.
- Suaib, 2000. Determinasi enam kultivar lokal padi ladang asal Kendari yang mengandung tepung sari berinti satu (*uninucleate*) untuk pemuliaan *in vitro*. *Zuriat*, 10(2): 21–7.
- Suaib, Woerjono M, Mirzawan PDN, dan Indrianto A, 2006. Populasi mikrospora uninukleat berdasarkan letaknya pada malai tiga klon tebu (*Saccharum* spp.) sebagai informasi awal bagi pemuliaan haploid secara *in vitro*. *Agriplus*, 16: 80–88.
- Summers WL, Jaramillo J dan Bailey T, 1992. Microspore developmental stage and anther length influence in the induction of tomato anther callus. *HortScience*, 27(7): 838–840.
- Zar JH, 1999. *Biostatistical analysis*. Fourth edition. Prentice Hall International Inc., New Jersey, 663.
- Zhang Z, Lu Y, Liu X, dan Feng J, 2005. Nuclear and cell migration during pollen development in rice (*Oryza sativa* L.). *Sex Plant Reproduction*, 17: 297–302.

Reviewer: **Dr. Abinawanto**