

Optimasi Produksi Embrio Somatik *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese Menggunakan Teknik Kultur Cair***Optimization of Pinus merkusii Jungh. et de Vriese Somatic Embryos in Suspension Culture*****Nurchahyo Widyodaru Saputro^{1*)}**^{1*)}Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Singaperbangsa Karawang
Jl. HS Ronggowaluyo, Teluk Jambe Timur, Kab. Karawang 41361*Penulis untuk korespondensi: nurchahyo.widyodaru@staff.unsika.ac.id

Diterima 21 Desember 2016/Disetujui 25 Januari 2017

ABSTRACT

Somatic embryogenesis are known as an artificial process in-vitro techniques that can accelerated provision of seeds and genotype propagation on coniferous plants. In somatic embryogenesis, somatic embryos formed from single cell or group of somatic cell. Previous studies shows that somatic embryos were successfully induced through cooling techniques in in-vitro propagation, but the number of somatic embryos produced are not optimal. The aim of this research is to obtain the optimum conditions of somatic embryos Pinus merkusii Jungh. et de Vriese growth using tissue culture techniques in a liquid medium (Suspension culture). Liquid medium used is a modification of the DCR medium without agar and by addition of plant growth regulator (PGR) 4,5µM 2,4-D and 2µM BAP. Explants used is clone Pinus merkusii Jungh. et de Vriese callus (PMC): PMC 1, PMC 2, PMC 4, PMC 6 and PMC 11 because it has shown a good response in previous studies. This process is repeated 5 times in the dark and on a shaker with the speed 125RPM. After 15 days, explants of callus Pinus merkusii Jungh. et de Vriese reveals the response to increased volume of sediment somatic embryo. This study shows that the use of a liquid medium in the tissue culture technique can accelerate and multiply the results of the somatic embryo.

Keyword: Somatic embryogenesis, Pinus merkusii Jungh. et de Vriese, somatic embryos, tissue culture techniques, PGR, 2,4-D, BAP

ABSTRAK

Embriogenesis somatik dikenal sebagai salah satu proses buatan dalam teknik in-vitro yang dapat mempercepat penyediaan benih dan propagasi genotipe pada tanaman konifer. Pada embriogenesis somatik, embrio somatik terbentuk dari satu sel atau sekelompok sel somatik. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa embrio somatik berhasil diinduksi melalui teknik pendinginan dalam propagasi in-vitro, namun jumlah embrio somatik yang dihasilkan tidak optimal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi optimum pertumbuhan klon embrio somatik Pinus merkusii Jungh. et de Vriese dengan menggunakan teknik kultur jaringan pada media cair (Teknik Kultur Cair). Media cair yang digunakan merupakan modifikasi dari media DCR tanpa agar dan diberi penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa 4,5µM 2,4-D dan 2µM BAP. Eksplan yang digunakan adalah klon kalus dari Pinus merkusii Jungh. et de Vriese (PMC): PMC 1, PMC 2, PMC 4, PMC 6 dan PMC 11 karena telah menunjukkan respon yang baik pada penelitian sebelumnya. Proses ini diulang sebanyak 5 kali dalam kondisi gelap dan diatas shaker dgn kecepatan 125RPM. Setelah 15 hari eksplan kalus Pinus merkusii Jungh. et de Vriese menunjukkan respon dengan bertambahnya volume endapan embrio somatik. Penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan medium cair pada teknik kultur jaringan dapat mempercepat dan memperbanyak hasil embrio somatik.

Kata kunci: Pinus merkusii Jungh. et de Vriese, embrio somatik, teknik kultur jaringan, ZPT, 2,4-D, BAP

PENDAHULUAN

Pinus merupakan tumbuhan konifer yang menjadi komoditas utama bagi bahan baku industri pulp dan kertas, selain itu pinus juga merupakan penghasil gondorukem dan terpentin (Hidayat & Hansen, 2001). Pinus dengan berbagai macam jenisnya dapat tumbuh di berbagai belahan bumi. Salah satu species Pinus yang tumbuh di Indonesia adalah *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese. Menurut

data statistik Perum Perhutani tahun 1999-2015, *Pinus merkusii* merupakan pohon penghasil kayu terbesar di pulau Jawa, pendapatan tahunan yang didapatkan oleh perhutani berasal dari gondorukem yaitu produk olahan getah pinus (Perum Perhutani, 2015). Namun hasil tersebut masih belum mencukupi kebutuhan gondorukem dunia.

Indonesia menduduki peringkat kedua setelah China dalam memproduksi gondorukem (Sukmananto, 2012). Saat ini perbanyak Pinus masih

menggunakan teknik perbanyakan menggunakan biji (Hidayat & Hansen, 2001). Teknik ini membutuhkan waktu yang relatif lama, baik untuk pengadaan bibit pinus dalam jumlah besar maupun untuk memperoleh bibit yang berkualitas. Proses pembentukan biji pada Pinus, mulai dari penyerbukan hingga biji matang dengan keadaan embrio siap berkecambah membutuhkan waktu sekitar 2 tahun (Gupta, 1988). Dalam usaha pemercepatan waktu produksi pohon Pinus, penerapan teknik *in vitro* dengan mikro propagasi dalam budidaya conifer termasuk Pinus telah banyak dilakukan. Namun keberhasilannya masih dianggap belum optimal.

Teknik *in vitro* (Mikropropagasi) yang digunakan pada penelitian ini adalah teknik kultur cair menggunakan media cair DCR untuk melihat kecepatan proliferasi pada klon kalus *Pinus merkusii* (PMC). Media *Douglas Cotyledon Reserve* (DCR) dikembangkan oleh Gupta dan Durzan (Gupta & Durzan, 1985). Media DCR terbukti lebih efektif dalam menginduksi embrio somatik dibandingkan *Murashige & Skoog* (MS) (Gupta, 1988). Media ini telah berhasil digunakan dalam menginduksi embrio somatik pada *Pinus nigra* (Salajova *et al.*, 1995), *Pinus ellottii* (Newton *et al.*, 1995), *Pinus lambertiana* (Gupta, 1995), *Pinus pinaster* (Bercetche & Paques, 1995) dan *Pinus strobus* (Kaul, 1995).

Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, embrio somadalam biji Pinus telah berhasil diinduksi dan berproliferasi menghasilkan 14 klon kalus *Pinus merkusii* (PMC). 14 klon tersebut dikembangkan dalam media DCR dengan komposisi ZPT 9 μM 2,4-D dengan 2 μM BAP dan 9 μM 2,4-D dengan 4 μM BAP (Rusfiandi, 2007; Dinar, 2007; Rahmadani, 2007), namun embrio somatik yang terinduksi tersebut hasilnya belum optimal. Embrio somatik merupakan hasil dari perkembangan embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik didefinisikan sebagai bagian dari perkembangan tanaman yang terjadi pada kantung embrio pada ovulum atau biji yang masih muda (Taiz & Zeiger, 1998)

Teknik perbanyakan klon embrio somatik dengan menggunakan media cair telah diterapkan pada *Pinus pinaster* (Ramarosandratana *et al.*, 2001). Penggunaan teknik ini dapat menghasilkan sekumpulan massa embrio dari satu genotip dengan cepat dan juga dapat menghasilkan sekumpulan massa embrio yang banyak. Penelitian ini dilakukan untuk memperbanyak dan mempercepat hasil klon embrio somatik *Pinus merkusii* sehingga didapatkan klon yang potensial untuk dilakukan proses pematangan sel embrio, sehingga nantinya dapat di lanjutkan pada proses pembentukan plantlet untuk nantinya di perbanyak dilapangan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Ruang Kultur Jaringan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Universitas Pendidikan Indonesia.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan klon kalus *Pinus merkusii*, media DCR, akuades, hormon 2,4-D, hormon BAP, spirtus, etanol 96%, NaOH 10%, Agar, NaOH 0,1 M, tisu gulung, aluminium foil dan karet gelang. Alat yang digunakan *laminar air flow cabinet* (LAFC), autoklaf, *Hot plate with magnetic stirrer*, *Shaker*, *refrigerator*, timbangan analitik, pH meter, botol kultur, gunting, *Erlenmeyer*, gelas ukur, sendok kimia, kaca arloji, cawan petri, pinset, pisau bedah, lampu spiritus, hand sprayer, pipet, serta rak kultur yang dilengkapi dengan lampu fluoresen sebagai sumber cahaya.

Penelitian menggunakan 5 klon PMC yang menunjukkan hasil terbaik dari 14 klon PMC pada penelitian sebelumnya. Masing-masing perbanyakan klon di ulang 5 kali.

Tahap Persiapan

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan melakukan sterilisasi basah dengan autoklaf pada suhu 121⁰C dan tekanan 1,5 atm untuk seluruh alat penanaman, seperti : pisau, cawan petri, kertas saring, pinset, *Erlenmeyer* dan botol kultur, serta akuades steril untuk pencucian dan pembilasan eksplan. Eksplan diperbanyak dalam media padat DCR dengan kombinasi ZPT 9 μM 2,4-D dengan 2 μM BAP dan 9 μM 2,4-D dengan 4 μM BAP, sehingga stok untuk melakukan penelitian tercukupi. *Laminar air flow cabinet* (LAFC) yang akan digunakan untuk inokulasi eksplan disemprot dan dibersihkan menggunakan alkohol 95%.

Selama masa perbanyakan eksplan, hanya 5 klon saja yang di perbanyak (PMC 1, PMC 2, PMC 4, PMS 6 dan PMC 11), karena 9 klon lainnya selama masa pra-penelitian menunjukan hasil yang kurang optimal pada saat diperbanyak dalam media padat DCR.

Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media DCR . dalam pembuatan media tersebut, terlebih dahulu dibuat larutan stok untuk macronutrien, mikronutrien, NaFe EDTA, vitamin, larutan N-organik, dan larutan stok untuk ZPT. Masing-masing larutan stok dibuat dengan kepekatan 10x , sementara larutan stok ZPT dibuat dengan konsentrasi 10⁻³M. Seluruh larutan stok disimpan dalam *refrigerator*. Media DCR terdiri dari: KNO₃ 340mg/l, NH₄NO₃ 400mg/l, Ca(NO₃)₂.4H₂O 556mg/l, CaCl₂.2H₂O 85mg/l, MgSO₄.7H₂O 370mg/l, KH₂PO₄170mg/l, MnSO₄.4H₂O 22,3mg/l, ZnSO₄.7H₂O 8,6mg/l, H₃BO₃ 6,2mg/l, KI 0,83mg/l, CoCl₂.6H₂O 0,025mg/l, CuSO₄.5H₂O 0,25mg/l, NaMoO₄.2H₂O 0,25mg/l, NiCl₂ 0,025mg/l, FeSO₄.7H₂O 27,8mg/l, Na₂EDTA 37,8mg/l, Myo-Inositol 200mg/l, Asam nikotin 0,5mg/l, Pyridoxsin-HCl 0,5mg/l, Thiamin-HCl 1,0mg/l, L-Glisin 2,0mg/l dan L-Glutamin 730mg/l (Gupta & Durzan, 1985). Setelah seluruh media DCR larut, ditambahkan

sukrosa 20g/l kemudian ditambahkan ZPT dengan kombinasi 9 μM 2,4-D dengan 2 μM BAP dan 9 μM dan 2,4-D dengan 4 μM BAP dan agar 8g/l untuk medium padat DCR, penambahan agar dilakukan setelah kadar pH $5,8 \pm 0,1$, lalu larutan digenapkan hingga 1 liter. Media dipanaskan hingga agar larut. Sebanyak 10 ml media dituang kedalam masing-masing botol kultur, diikat dengan karet gelang, disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1,5atm selama 15 menit. Botol lalu ditutup dengan aluminium foil. Lalu untuk medium cair DCR komposisi ZPT yang digunakan adalah 4,5 μM 2,4-D dan 2 μM BAP tanpa menambahkan agar. Seluruh larutan media digenapkan menggunakan akuades steril hingga 1 liter. Kemudian dituang dalam Erlenmeyer sebanyak masing-masing 10 ml.

Pemindahan eksplan

Proses pemindahan eksplan dilakukan dalam laminar air flow cabinet (LAFC). Kalus embrio somatik yang telah berproliferasi dalam medium padat DCR diambil sebanyak 200mg, lalu dipindahkan dalam medium cair DCR. Kalus dalam medium cair kemudian dihomogenkan agar embrio somatik tersebar secara merata. Embrio somatik diinkubasi di atas shaker dengan kecepatan rotasi 125 RPM dalam keadaan gelap.

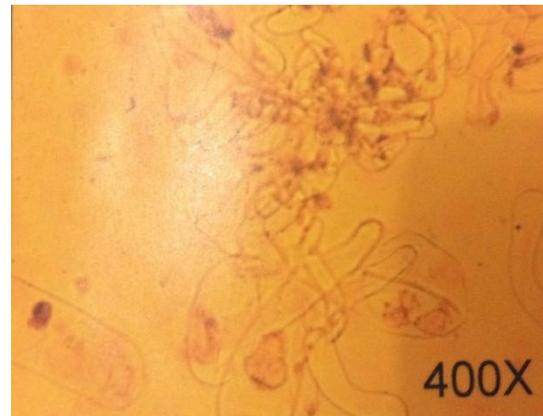
Analisis hasil penelitian dilakukan dengan cara mengamati penambahan volume dalam medium cair DCR dengan waktu yang diperlukan untuk volume medium cair DCR bertambah. Pengamatan dilakukan dengan memasukan kultur dalam gelas ukur, diamkan selama ± 15 hingga embrio somatik mengendap. Endapan embrio somatik ini yang nanti di ukur pertambahan volumenya. Pengamatan dilakukan setiap 3 hari sekali dalam kurun waktu 15 hari. Hasil dari pengamatan tersebut nantinya di buat kurva tumbuh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

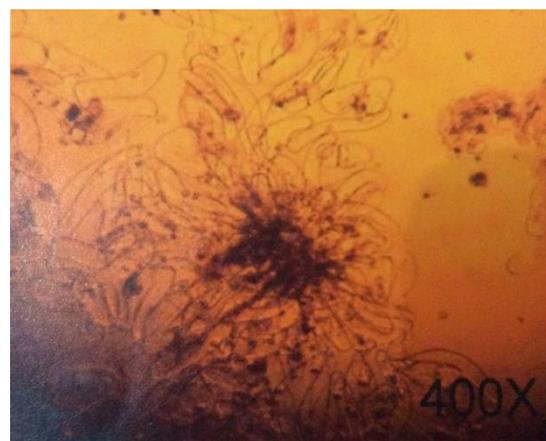
Ditemukan bahwa komposisi ZPT menunjukan respon yang baik dalam tahap prapenelitian adalah 9 μM 2,4-D dengan 4 μM BAP. Dari komposisi tersebut tingkatnya di turunkan $\frac{1}{2}$ menjadi 4,5 μM 2,4-D and 2 μM BAP. Hal ini dikarenakan penggunaan hormon yang terlalu banyak pada medium cair dapat menyebabkan pertumbuhan eksplan yang kurang baik (Taryono, 2003). Pada hari ke 0 embrio somatik *Pinus merkusii* masih berbentuk sekumpulan sel yang memiliki vakuola besar dan belum memiliki kepala embrio serta suspensor (Gambar 1). embrio somatik pada tahap ini masih melakukan adaptasi dengan media tumbuhnya, karena adanya perpindahan dari media padat DCR ke media cair DCR (Zoglauger dan Reuther, 1996).

Embrio somatik sudah terbentuk menjadi sekumpulan *polyembryony* (Gambar 2) pada hari ke 3. *Polyembryony* merupakan sesuatu kejadian yang terjadi pada species konifer selama masa

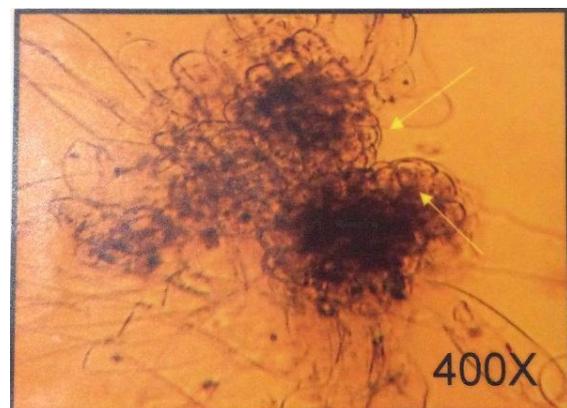
embryogenesis *invitro* dan *in vivo* (Singh, 1978). Pada hari ke 10 penanaman, embrio somatik mulai berpisah ditandai dengan terjadinya *clavage embryony* (Gambar 3). *clavage embryony* terjadi dikarenakan adanya pertumbuhan pada sel embrio potensial, sel embrio potensial memiliki kemampuan untuk melakukan pembelahan, pertumbuhan dan diferensiasi sel menuju pematangan (Vashista, 1983).



Gambar 1. Embrio Somatik *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese pada hari ke 0



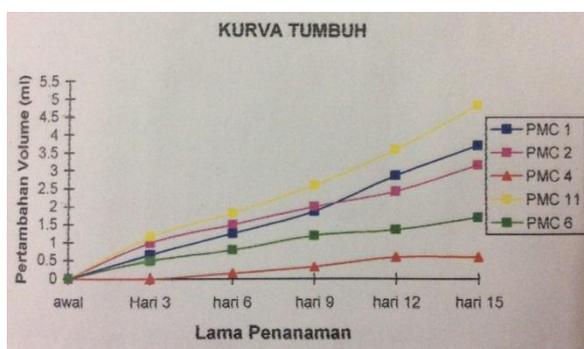
Gambar 2. Embrio Somatik *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese pada hari ke 3



Gambar 3. Embrio Somatik *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese pada hari ke 10

Diketahui bahwa PMC 11 memiliki tingkat pertumbuhan paling baik diantara keempat PMC lainnya dari hasil kurva tumbuh (Gambar 4). PMC 4 memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih rendah dibandingkan dengan PMC lainnya. Pada PMC 4 fase lag dimulai dari hari ke 3 sampai dengan hari ke 9, selanjutnya fase log dimulai dari ke 10 sampai dengan hari ke 11. PMC 4 mengalami penurunan pertumbuhan pada hari ke 12 sampai dengan masa pengamatan berakhir.

Penyebab penurunan pertumbuhan pada PMC 4 karena genotip yang dimiliki tidak cocok untuk diperbanyak pada medium cair. Pada media padat DCR PMC 4 juga menunjukkan pertumbuhan yang rendah saat fase perbanyakan. Pola tumbuh PMC 1, PMC 2, PMC 11 dari awal pertumbuhan sampai dengan hari ke 15 menunjukkan kurva tumbuh yang berbentuk sigmoid. PMC 1 dan PMC 2 menunjukkan perkembangan yang hampir serupa.



Gambar 4. Kurva tumbuh dari ke 5 PMC

Pada hari ke 10 rata-rata volume pertumbuhan embrio somatik dari PMC1 dan PMC 2 mencapai titik yang sama, dikarenakan kenaikan jumlah rata-rata volume embrio somatik pada PMC 1 dan PMC 2. PMC 6 menunjukkan fase lag sampai dengan hari ke 12, hal ini dikarenakan lambatnya kemampuan embrio somatik pada PMC 6 untuk menyesuaikan diri dengan media tumbuhnya. Pertumbuhan PMC 1, PMC 2 dan PMC 11 pada media cair DCR tidak dapat dibedakan antara fase eksponensial dan stationer setelah masa inkubasi 15 hari

KESIMPULAN

Klon kalus *Pinus merkusii* yang paling baik pertumbuhannya dalam media cair DCR adalah PMC 11 dengan lama pertumbuhan lebih 15 hari, hal ini dikarenakan klon ini memiliki tingkat adaptasi yang tinggi terhadap media tumbuhnya. Sedangkan pada klon lain terjadi penurunan tingkat produksi embrio somatik setelah 15 hari. Klon-klon PMC yang berbeda memiliki laju pertumbuhan yang berbeda pula dan tidak menunjukkan bentuk kurva yang sigmoid

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada bapak Dr.rer.nat.Adi rahmat, M.Si dan ibu Dr.Sariwulan Diana, M.Si selaku pembimbing yang telah membimbing dan memberikan arahan untuk penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada kepala laboratorium Biologi Universitas Pendidikan Indonesia untuk kerjasama dan bantuannya dalam memfasilitasi kegiatan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bercetche, J and Paques, M. 1995. Somatic Embryogenesis in Maritime Pine (*Pinus pinaster*). Dalam S. Jain, P.K. Gupta & Newton (eds). Somatic Embryogenesis in Woody Plant vol. 3. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Dinar. L. 2007. Optimasi Induksi Embriogenesis Somatik *Pinus Merkusii* Jungh. et de Vriese. Melalui Teknik Pemotongan Ujung Kalaza Eksplan. Skripsi Sarjana Biologi UPI. Tidak diterbitkan
- Gupta, P. K and Durzan, D. J. 1985. Shoot Multiplication From Tree of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugar Pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Report 4:177-179
- Gupta, P. K. 1988. Advances in Biotechnology of Conifers. Current Science 57(12): 629-637
- Gupta, P. K. 1995. Somatic Embryogenesis in Sugar Pine (*Pinus lambertiana*) dalam S. Jain, P.K. Gupta, R. Newton (eds). Somatic Embryogenesis in Woody Plant vol.3.Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands
- Hidayat, J dan Hasen, C. P. 2001. Informasi Singkat Benih *Pinus merkusii*Jungh. et de Vriese. Bandung : IFSP
- Kaul, K. 1995. Somatic Embryogenesis in Eastern White Pine (*Pinus strobus*L)dalam S. Jain, P.K. Gupta, R. Newton (eds). Somatic Embryogenesis in Woody Plant vol.3.Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands
- Newton, R. J., Marek-Swize, K. A., Magallanes-Cedeno, M. E., Dong, N., Sen, S. & Jain, S. M. 1995. Somatic Embryogenesis in Slash Pine (*Pinus elliottii*)dalam S. Jain, P.K. Gupta, R. Newton (eds). Somatic Embryogenesis in Woody Plant vol.4.Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands

- Perum Perhutani. 2015. Menata Proses Bisnis dan Meningkatkan Akuntabilitas. Annual Report Perhutani.
- Ramarosandratana, A., Harvengt, L., Bouvet, A., Calvayrac, R. and Pâques, M. 2001. Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos, In *Vitro Cellular and Development Biology-Plant.*, 37, 29-34
- Rahmadani, E. 2007. Optimasi Induksi Embriogenesis Somatik *Pinus Merkusii* Jungh. et de Vriese. Melalui Teknik Pendinginan Eksplan. Skripsi Sarjana Biologi UPI. Tidak diterbitkan
- Rusfiandi, H. 2007. Optimasi Induksi Embriogenesis Somatik *Pinus Merkusii* Jungh. et de Vriese. Melalui Kombinasi Teknik Pendinginan dan Pematangan Ujung Kalaza Eksplan. Skripsi Sarjana Biologi UPI. Tidak diterbitkan.
- Salajova, T., Salaj, J., Jasic, J., and Kormutak, A. 1995. Somatic Embryogenesis in *Pinus nigra* Arndalam S. Jain, P.K. Gupta, R. Newton (eds). Somatic Embryogenesis in Woody Plant vol.3. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Signh, H. 1978. Embryology of Gymnosperms. Somatic Embryogenesis in Woody Plants vol 4. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Sukmananto, B. 2012. KBM INK Unit I Brumbung Ekspor Gondorukem Ke China. BINA. Edisi 13- Maret 2012/th.XXXIX.
- Taryono. 2000. Somatische Embryogenese und Transformation bei der europaischen (*Larix deciduas*). Dissertation, Humboldt Universitat zu Berlin.
- Taiz, L and Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, inc. USA.
- Vashista, P. C. 1983. Gymnosperm. S. New Delhi: Chand & Company.Ltd.
- Zoglauger, K and Reuther, G.1996. Somatische Embryogenese bei der Weibitane (*Abies alba*) Mitteilungen der Landesanstalt fur Wald- Und Forstwirtschaft. Somatic Embryogenesis in Woody Plant vol.4. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.