

EMBRIOGENESIS SOMATIK PADA KULTUR *IN VITRO* KASTUBA (*Euphorbia pulcherrima*. Willd.)

Dewi Sukma dan Nurhajati A. Mattjik¹

DEPARTEMEN AGRONOMI DAN HORTIKULTURA, FAPERTA IPB

Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga Bogor. Telp. 0251-629353

Email : dsukma_@plasa.com

ABSTRAK

Kultur *in vitro* kastuba (*Euphorbia pulcherrima* L.) var. *Silver Red* dengan eksplan pucuk dari tanaman yang masih dalam fase pertumbuhan vegetatif dilakukan dalam media M1 (Murashige-Skoog (MS) yang ditambahkan Benzylaminopurine (BAP) 2 mg/l). Selama satu bulan dalam media M1, eksplan tidak menunjukkan respon pertumbuhan meskipun tetap berwarna hijau. Eksplan kemudian dipindahkan ke media M2 (MS + BAP 0.5 mg/l). Setelah 2 minggu dalam media M2, tunas membengkak dan membentuk kalus globular berwarna hijau atau putih keunguan. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa perkembangan eksplan pucuk di media M2 merupakan suatu proses embriogenesis somatik karena terdapat bagian-bagian yang menunjukkan fase perkembangan seperti prakotiledonari dan kotiledonari. Embrio pada fase perkembangan hati dan torpedo tidak dapat diperoleh hasil pengamatan mikroskopis. Terdapat juga embrio somatik yang abnormal dengan jumlah kotiledon yang lebih dari 2 buah. Sub kultur lanjut dari kalus embriogenik ke media. Pembentukan embrio somatik sekunder paling baik pada media M2, sedangkan pembentukan kecambah hijau atau tanaman hijau paling banyak pada media M2, M5 (MS + BA 0.4 ppm) dan M6 (MS + BA 0.5 ppm + NAA 0.1 ppm).

Kata kunci : *Euphorbia pulcherrima*, *in vitro*, embriogenesis somatik

PENDAHULUAN

Poinsettia atau di Indonesia dikenal dengan kastuba (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch) berasal dari daerah semitropik Meksiko. *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch termasuk ke dalam Genus *Euphorbia*, famili *Euphorbiaceae*. Genus *Euphorbia* merupakan genus yang memiliki jumlah spesies sangat banyak yaitu sekitar 700 hingga 1000 spesies (Hartley, 1992). *Euphorbia pulcherrima* menarik karena warna brakteanya yang menyolok seperti merah, kuning atau oranye dan menjadi bunga favorit untuk perayaan natal dan juga perayaan hari kemerdekaan. Poinsettia yang memiliki braktea merah misalnya pernah menjadi bunga andalan untuk parade perayaan kemerdekaan Indonesia untuk membentuk formasi rangkaian bunga merah putih.

Secara konvensional tanaman poinsettia diperbanyak dengan stek pucuk. Pengakaran stek pucuk tidak begitu sulit asalkan kondisi lingkungan bersih dengan kelembaban tinggi dan temperatur yang optimal. Masalah yang sering timbul dalam waktu pembibitan adalah penyakit yang biasanya bersumber dari media yang tidak steril atau lingkungan yang kotor. Kelembaban tinggi biasanya diberikan dengan *intermittent mist system* atau *fog system* (pengkabutan). Suhu hangat pada media (sekitar 72-74°F) biasanya diperlukan selama induksi pengakaran stek. Dalam kondisi lingkungan optimal stek dapat membentuk akar dalam waktu 14 – 21 hari (Hartley, 1992).

Permasalahan utama dalam perbanyakan konvensional dengan stek adalah terbatasnya jumlah stek yang dapat diambil dari pohon induk. Menurut Poinsettia Cultural Information (2006), dari tanaman induk berumur 22 minggu yang telah di *pinching* satu kali dihasilkan 3 tunas baru per minggu untuk di stek pada minggu ke 27, 28 dan 29. Untuk mendapatkan stek dalam jumlah besar diperlukan jumlah pohon induk yang banyak, dan ini memerlukan tempat atau lahan yang lebih luas. Biaya pemeliharaan pohon induk dapat menjadi komponen biaya tersendiri karena pohon induk harus terjaga sehat, bebas hama dan penyakit dan dalam kondisi juvenil/vegetatif tinggi untuk menghasilkan pertumbuhan stek yang banyak. Untuk mempertahankan pohon induk dalam kondisi pertumbuhan vegetatif, tanaman induk harus selalu diberi perlakuan hari panjang dengan penambahan cahaya lampu. Perlakuan hari panjang pada pohon induk akan meningkatkan biaya produksi melalui komponen biaya listrik.

Perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan atau mikropropagasi merupakan salah satu alternatif untuk dapat menjamin ketersediaan bibit tanaman dalam jumlah besar dan dalam waktu yang relatif singkat. Tanaman induk atau stok dapat dipelihara dalam kultur *in vitro* dalam jangka waktu tertentu untuk menjamin kestabilan genetiknya. Kondisi lingkungan mikropropagasi yang steril menjamin untuk dihasilkannya bahan tanaman yang sehat dan bebas hama penyakit.

Mikropropagasi tanaman dapat dilakukan melalui pendekatan proses organogenesis untuk pembentukan tunas aksilar maupun tunas adventif atau melalui proses embriogenesis somatik (Hartman *et al.* 1997). Potensi jumlah tanaman yang dapat dihasilkan dari proses embriogenesis somatik jauh lebih besar dibandingkan kultur tunas sehingga laju propagasi tanaman pada proses embriogenesis somatik lebih besar. Meskipun demikian, ada kelemahan dari cara mikropropagasi dengan proses embriogenesis somatik, karena potensi variasi somaklonal yang dihasilkan lebih besar dibanding kultur tunas.

Penelitian ini menyajikan hasil penelitian yang menunjukkan respon embriogenesis somatik kastuba kultivar "Silver Red" dalam media kultur jaringan yang mengandung zat pengatur tumbuh sitokinin Benzylaminopurine (BAP).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat-alat yang digunakan meliputi media dasar Murashige-Skoog (MS), (1962), zat pengatur tumbuh sitokinin yaitu BAP, bahan tanaman berupa tunas pucuk poinsettia kultivar "Silver Red", bahan-bahan untuk sterilisasi eksplan, gula, dan agar. Sedangkan alat-alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas untuk pembuatan media, alat-alat untuk sterilisasi media (autoklaf), alat-alat tanam (laminar air flow cabinet, gunting, pinset, pisau, scalpel), rak kultur dan alat-alat bantu lainnya.

Pada tahap awal semua eksplan ditanam dalam media MS tanpa zat pengatur tumbuh (M0). Eksplan yang steril kemudian dipindahkan ke media MS + BAP 2 mg/l (media M1, sub kultur 1). Setelah satu bulan di media M1 eksplan yang steril yang masih hijau dipindahkan ke media MS + BAP 0.5 mg/l (media M2, sub kultur 2). Embrio-embrio yang terbentuk pada media M2 selanjutnya disub kultur ke tiga macam media yaitu MS tanpa zat pengatur tumbuh (M0), M2 dan MS + BAP 1 mg/l (M3), yang merupakan tahap sub kultur 3. Pada tahap sub kultur 3 digunakan rancangan penelitian acak lengkap dengan ulangan sekurang-kurangnya 3 botol dan setiap botol terdiri dari 3-4 *clump* kalus embriogenik. Botol kultur ditempatkan di ruang kultur suhu sekitar 20°C dengan intensitas cahaya rendah (100 lux).

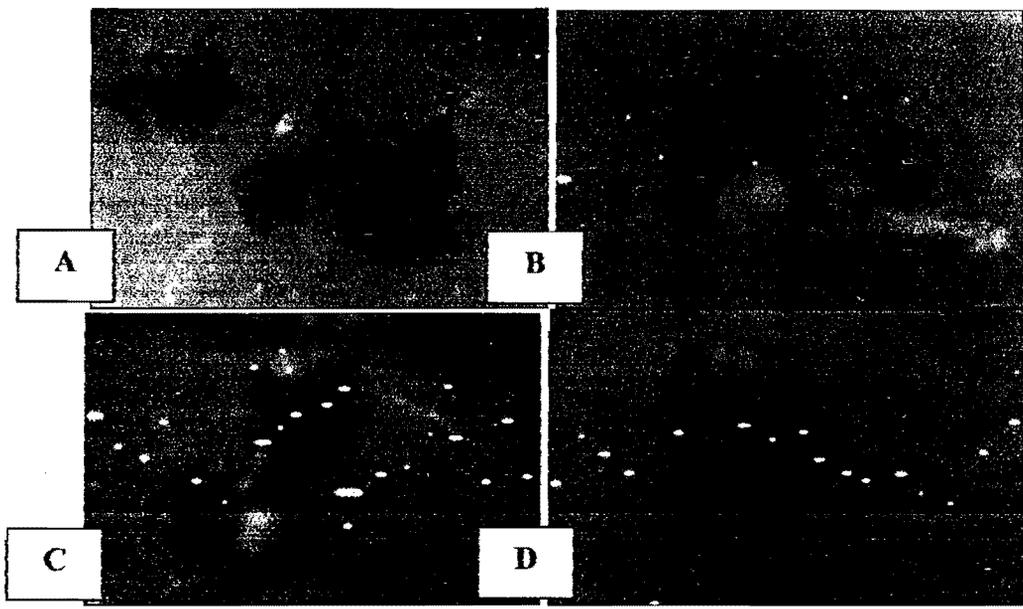
Pengamatan pada tahap sub kultur 2 berupa pengamatan morfologi kalus embriogenik dan pengamatan mikroskopis untuk mengamati tahapan perkembangan embrio. Sedangkan pada sub kultur 3 dan 4 diamati jumlah kecambah hijau yang dihasilkan pada masing-masing media perlakuan.

HASIL PENELITIAN

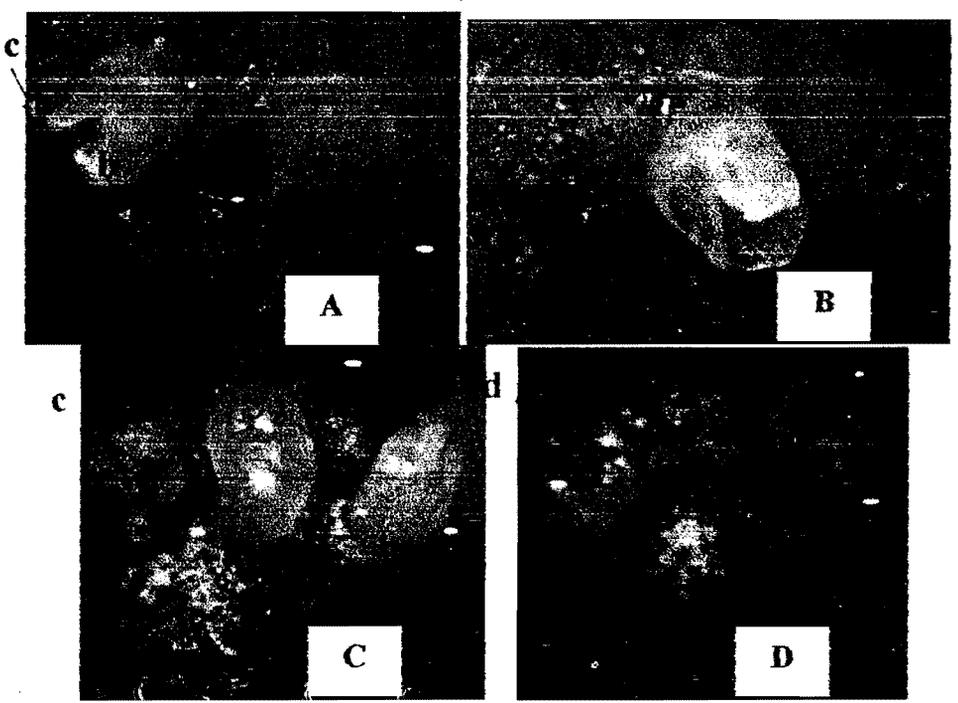
Sebanyak 9 eksplan tunas pucuk yang berhasil disterilisasi ditanam dalam media M1 (MS + BA 2 ppm). Setelah satu bulan di media M1, bagian pucuk eksplan masih terlihat hijau namun bagian pangkal eksplan cenderung menjadi kecoklatan seperti jaringan yang mati. Eksplan kemudian dipindahkan ke media M2 (MS + BA 0.5 ppm). Pada media tersebut eksplan menunjukkan respon pertumbuhan ke arah embriogenesis somatik. Beberapa bentuk respon dalam media M2 seperti terlihat pada Gambar 1.

Setelah satu bulan di media M2 eksplan dipindahkan ke beberapa jenis media seperti terlihat pada Tabel 1. Jumlah kecambah hijau yang dihasilkan dari media pada Tahap Sub Kultur 3 setelah satu bulan fase kultur seperti tercantum pada Tabel 2.

Hasil pengamatan mikroskopis pada kultur dalam tahap sub kultur ke-2 menunjukkan beberapa fase perkembangan embrio seperti torpedo, dikotiledonari dan kecambah seperti terlihat pada Gambar 2. Warna kalus embriogenik dalam regenerasi melalui embrio tersebut terlihat dari kemerah-merahan mengkilat menjadi kekuningan pada fase kotiledonari kemudian menjadi hijau setelah menjadi kecambah. Perkecambahan embrio terlihat belum sempurna karena embrio belum membentuk akar.



Gambar 1. Respon beberapa eksplan pucuk setelah dipindahkan dari media M1 (MS + BA 2 ppm) ke media /M2 (MS + BA 0.5 ppm) : (A) Terbentuk kalus globular yang mengkilat warna kemerahan; (B) terbentuk kalus globular putih kemerahan muncul akar; (C) dan (D). Bulatan-bulatan (nodul hijau) terbentuk pada titik tumbuh



Gambar 2. Pengamatan Mikroskopis pada Kalus Embriogenik Kastuba : (A- D) Sebagian tahap perkembangan embrio dari fase (a) ke fase pradikotiledonari (b) dan dikotiledonari (c); (d) embrio abnormal dengan jumlah calon kotiledon lebih dari 2.

Peningkatan pertumbuhan kalus embriogenik terlihat dari bertambahnya kalus globular yang memenuhi permukaan media. Kesulitan dialami dalam menghitung jumlah embrio yang dihasilkan. Penghitungan kecambah hijau lebih mudah dilakukan dibanding penghitungan jumlah embrio.

Pada tahap sub kultur 3, pembentukan embrio sekunder dapat terjadi pada media M0, M2 maupun M3, dan cenderung terlihat paling banyak pada media M2. Hal ini juga terlihat dari jumlah botol kultur hasil sub kultur 4 seperti yang tercantum pada Tabel 2. Kalus embriogenik yang

dikulturkan dalam media M2 berkembang cepat sehingga dari 1 botol kalus embriogenik pada sub kultur 3 dapat dihasilkan 6 botol kultur baru. Sementara dari 1 botol kultur pada media M0 dan M3 dapat dihasilkan 4 botol kultur baru. Setiap botol hasil sub kultur berisi sekitar 3 – 4 *clump* kalus embriogenik atau massa embrio.

Tabel 1. Tahapan Pelaksanaan Kultur yang Menghasilkan Respon Embriogenesis pada *Euphorbia pulcherrima* var. Silver Red.

Tanam Awal	Sub Kultur 1	Sub Kultur 2	Sub Kultur 3	Media pada Sub Kultur 4
M1	M2 (9 botol)	M2 (15 botol)	M0 (3 botol)	M2 (2 botol) M4 (1 botol) M5 (2 botol) M6 (2 botol) Total = 8 botol
			M2 (9 botol)	M2 (13 botol) M4 (11 botol) M5 (12 botol) M6 (15 botol) Total = 52 botol
			M3 (4 botol)	M2 (1 botol) M4 (1 botol) M5 (3 botol) M6 (4 botol) Total = 9 botol

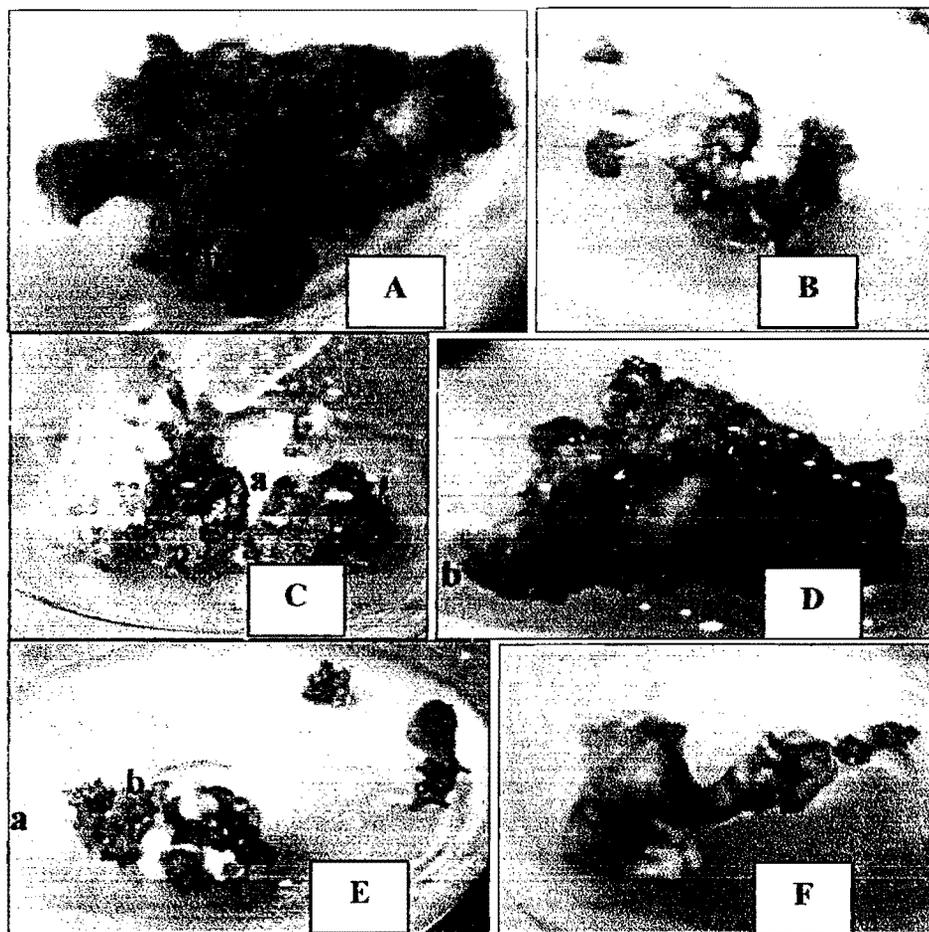
Ket. : M1 = (MS + BA 2 ppm), M2 = MS + BA 0.5 ppm, M3 = MS + BA 1 ppm, M4 = MS + BA 0.3 ppm, M5 = (MS + BA 0.4 ppm), M6 = (MS + BA 0.5 ppm + NAA 0.1 ppm)

Perkembangan embrio menjadi embrio dewasa dan berkecambah menjadi kecambah dan tanaman hijau dapat terjadi pada media M0, M2 dan M3. Tanaman hijau terbanyak dihasilkan pada media M2 yaitu sekitar 2.6% dari total *clump* kalus embriogenik (Tabel 2). Sebagian besar kecambah hijau yang terbentuk tidak membentuk akar, kecuali pada media M0 terdapat beberapa kecambah yang membentuk akar.

Tabel 2. Jumlah Kecambah Hijau yang Dihasilkan pada Beberapa Jenis Media pada Tahap Sub Kultur 3.

Jenis Media	Jumlah Botol Hasil Sub Kultur	Total Jumlah Kecambah Hijau	Persentase Kecambah Hijau/ <i>Clump</i> Kalus Embriogenik
M0	3 botol/10 <i>clump</i>	12	12/10 (1.2%)
M2	9 botol/23 <i>clump</i>	59	59/23 (2.6%)
M3	4 botol/7 <i>clump</i>	12	12/7 (1.7%)

Sub kultur 4 dilakukan dengan tujuan untuk mencari media yang dapat meningkatkan perkecambahan embrio menjadi tanaman lengkap. Karena itu pada sub konsentrasi BAP dalam media diturunkan dengan adanya media M4 (MS + BA 0.3 ppm), M5 (MS + BA 0.4 ppm) atau dengan penambahan auksin pada media dengan adanya media M6 (MS + BA 0.5 ppm + NAA 0.1 ppm). Jumlah kecambah hijau yang terbentuk pada tahap sub kultur 4 seperti tercantum pada Tabel 4. Jumlah kecambah hijau yang terbentuk paling banyak pada media M4 dan M6. Sebagian besar kecambah yang dihasilkan belum membentuk akar kecuali pada media M6, dimana ditemukan ada 3 kecambah yang berakar. Kemungkinan adanya NAA dalam media M6 dapat mendorong pertumbuhan akar kecambah asal embrio.



Gambar 3. Morfologi Kalus Embriogenik pada Tahap Sub Kultur 3 : (A) dan (B) pada media M0; (C) dan (D) pada media M2; (E) dan (F) pada media M3. Kalus/embrio ditunjukkan oleh kode a pada gambar sedangkan embrio yang sudah berkecambah menjadi tanaman ditunjukkan dengan kode b.

Tabel 3. Jumlah Kecambah/Tanaman Hijau yang Dihasilkan pada Beberapa Jenis Media pada Tahap Sub Kultur 4.

Jenis Media (Jumlah Botol yang diamati)	Total Jumlah Kecambah Hijau	Rata-rata kec hijau/botol	Jumlah kecambah albino
M2 (12)	27	2.3	8
M4 (9)	38	4.2	3
M5 (12)	32	2.7	9
M6 (16)	60	3.8	9

Ket. : M2 = MS + BA 0.5 ppm, M4 = MS + BA 0.3 ppm,
M5 = (MS + BA 0.4 ppm), M6 = (MS + BA 0.5 ppm + NAA 0.1 ppm)

Variasi warna kecambah ditemukan dimana ada kecambah yang berwarna hijau dan ada yang berwarna putih/albino. Kecambah albino paling banyak dihasilkan pada media M2, M5 dan M6 (Tabel 4). Pertumbuhan lanjut dari kecambah albino tersebut masih sedang diamati.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa embriogenesis somatik pada kastuba dapat diinisiasi dari eksplan yang bersifat meristematik yaitu pucuk tanaman. Menurut Trigiano dan Gray (2000), pada tanaman yang kompleks, embrio nonzigotik dapat diinisiasi dari jaringan yang lebih juvenil atau meristematik seperti embrio zigotik muda, kotiledon embrio zigotik, hipokotil, daun muda, ujung tunas, bahkan ujung akar. Embrio somatik/nonzigotik merupakan embrio yang berasal dari satu sel dan ini berbeda dengan tunas yang berasal dari kumpulan massa sel (Trigiano dan Gray, 2000). Tahapan awal perkembangan embrio somatik dari satu sel relatif sulit diamati karena memerlukan instrumen mikroskop yang dengan kekuatan tinggi. Dalam penelitian ini hanya dapat diamati tahapan perkembangan embrio pada fase pradikotiledonari dan dikotiledonari.



Gambar 4. Morfologi Kallus Embriogenik (a), Tanaman Hijau (b) dan Tanaman Albino (c) yang Dihasilkan pada Tahap Sub Kultur 3

Zat pengatur tumbuh merupakan faktor penting dalam induksi embriogenesis nonzigotik dalam kultur *in vitro*. Trigiano dan Gra (2000) menyatakan bahwa secara umum auksin dan sitokinin diperlukan dalam proses induksi embriogenesis somatik *in vitro*. Tetapi dalam beberapa kasus, hanya sitokinin yang diperlukan untuk menginduksi perkembangan kultur embriogenik. Sitokinin yang umum digunakan adalah BAP. Selain BAP, thidiazuron (TDZ), kinetin, dan zeatin juga dapat digunakan dalam induksi embriogenesis somatik tanaman *in vitro*.

KESIMPULAN

Embriogenesis somatik/nonzigotik pada kultur *in vitro* kastuba dapat terjadi dalam media MS yang hanya ditambahkan sitokinin. Pembentukan embrio somatik sekunder dapat terjadi dalam media M0, M2 dan M3, namun paling banyak pada media M2. Pertumbuhan embrio menjadi kecambah/tanaman hijau paling banyak terbentuk pada media M2, M5 dan M6. Optimasi media masih perlu dilakukan untuk mendorong perkembangan embrio somatik yang lengkap memiliki tajuk dan akar.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2006. Poinsettia Cultural Information. Fischer Breeding Success. Winchester. Email : Info@fecherusa.com
- Hartley, D.E. 1992. Poinsettias. In R.A. Larson. Introduction to Floriculture. Academic Press. pp 306-330.
- Hartman, H.T., Kester, D.E., Davies, Jr. F.T and Geneve, R.L. 1997. Plant Propagation. Prentice-Hall. Inc. New Jersey.
- Trigiano, R.N. and Gray, D.J. 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press. Washington.