

KORELASI METODE PENGECAMBAHAN *IN VITRO* DAN PEWARNAAN DALAM PENGUJIAN VIABILITAS POLEN

Correlation of *in vitro* germination and staining method in pollen viability testing

Warid¹, Endah Retno Palupi²

¹Mahasiswa Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB

²Staf Pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB

Abstract

Pollen viability of four families were investigated based on *in vitro* germination and staining method and then data were correlated. The aim was to study if the two methods gave similar estimation of pollen viabilities. Pollen germination medium consisted of Brewbaker & Kwack solution (BK), BK without Sucrose, Sucrose 10%, and modified pollen germination medium formulated by Schreiber and Dresselhaus (2003) (PGM). Staining method consists of aniline blue, acetocarmine, IKI, and TTC. Pollen morphology varies among the four families but very similar between species within a family. Euphorbiaceae pollen ($d= 81,2\mu\text{m}/J. pandurifolia$) and Poaceae ($d= 48,9\mu\text{m}/S. bicolor$) was round with one pore (uniporate). Solanaceae have an oval shape with three colpates pores (tricolpate). In the other hand, Myrtaceae pollen varies either triangle with tricolpate or square with four colpates. The best germination medium for almost all species except in Myrtaceae was PGM, and the best stain was acetocarmine. However, corellation between PGM and acetocarmine was not significantly correlated, but PGM was correlated with aniline blue ($r=0.624$) meaning that aniline blue could be used to estimate pollen viability as good as *in vitro* germination using PGM..

Keyword : correlation, pollen morphology, pollen viability, germination, staining method

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Polen dapat digunakan dalam konservasi plasma nutfah karena polen merupakan materi genetik yang paling sedikit mengandung penyakit (news.bioversityinternational.org; Bajaj, 1979; dan Card, 2007). Disamping itu polen juga pembawa materi genetik jantan kepada gametofit betina ketika terjadi fertilisasi (Malik, 1979). Fertilisasi dapat terjadi bila viabilitas polen tinggi. Periode viabilitas polen secara alami bervariasi, berkisar antara beberapa hari bahkan sampai beberapa menit setelah bunga mekar (antesis) (Wang *et al.*, 2004; Song, 2001). Oleh karena itu pengelolaan polen, yang mencakup pemanenan, penyimpanan, dan pengujian viabilitas, bertujuan untuk mempertahankan kemurnian dan viabilitas tetap tinggi, sehingga menjamin ketersediaannya sewaktu-waktu diperlukan.

Beberapa penelitian telah dilakukan dalam rangka memperpanjang viabilitas polen dengan cara menyimpan dalam suhu dan kelembaban rendah, setelah kadar air polen diturunkan (news.bioversityinternational.org). Pengetahuan mengenai viabilitas polen sangat berguna bagi pemulia tanaman, ahli genetika, penanam buah, (Bolat and Pirlak, 1999), dan teknolog benih/seed technologist (Malik, 1979), karena viabilitas merupakan indikator kualitas polen (Kelly, 2002). Penggunaan metode pengujian viabilitas polen yang cepat, mudah, dan murah sangat diperlukan untuk meningkatkan efisiensi program pemuliaan dan seleksi tanaman (Bolat and Pirlak, 1999).

Metode yang telah dikembangkan untuk menduga viabilitas polen antara lain metode pengecambahan secara *in vitro*, metode pewarnaan, pengujian *in vivo* melalui pengamatan tabung polen pada jaringan stilos (tangkai putik), dan pengamatan terhadap proporsi benih yang terbentuk (*seed set*) dari hasil penyebukan pada pohon contoh (Galleta, 1983). Diantara metode pengujian tersebut, pengecambahan polen secara *in vitro* merupakan metode uji viabilitas polen yang dianggap paling baik. Metode ini biasanya menggunakan formula Brewbaker & Kwack sebagai media dasar (Owens *et al.*, 1991). Akan tetapi metode ini tidak dapat digunakan secara umum karena setiap tanaman memerlukan media perkecambahan polen yang berbeda, sehingga diperlukan pengujian awal untuk mendapatkan komposisi dan konsentrasi bahan kimia yang tepat. Penelitian Bolat and Pirlak (1999) menunjukkan bahwa perkecambahan polen beberapa spesies dan kultivar tanaman buah bervariasi tergantung pada medium atau konsentrasi bahan kimianya

Metode pewarnaan juga banyak digunakan untuk menduga viabilitas polen. Pewarna yang banyak digunakan antara lain acetocarmine, propione carmine, anilin blue, Alexander's stain, IKI (Iodine + Potassium Iodide), FDA (Flourescein diacetate), NBT (*p*-nitro blue tetrazolium), MTT (2,5-diphenyl tetrazolium bromide) dan TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) (Bolat and Pirlak, 1999). Metode pewarnaan ini lebih mudah, murah, dan cepat, sedangkan metode pengecambahan secara *in vitro* relatif lebih mahal, sulit, dan lama. Metode standar dalam pengujian viabilitas polen ini belum ditetapkan sehingga pengetahuan mengenai metode

pengujian viabilitas pada berbagai famili sangat dibutuhkan untuk meningkatkan efisiensi dalam program perbaikan tanaman. Selain itu perlu dipelajari korelasi antara berbagai metode pengujian viabilitas polen agar dapat digunakan untuk menentukan metode yang cepat, mudah dan murah. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari media pengecambahan dan pewarna polen yang tepat untuk masing-masing spesies dan mempelajari korelasi antara metode pengecambahan polen secara *in vitro* dengan pewarnaan dalam menduga viabilitas polen.

Hipotesis

1. Masing-masing spesies memiliki media pengecambahan dan pewarna polen yang spesifik.
2. Ada korelasi antara metode pengecambahan dan pewarnaan dalam pengujian viabilitas polen.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi Benih Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor dan Laboratorium Biologi Bidang Zoologi, LIPI Cibinong. Penelitian dilakukan pada bulan Januari-September 2008.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah sejumlah polen dari empat famili yaitu Poaceae (*O. sativa*, *Z. mays*, dan *Sorghum bicolor*), Euphorbiaceae (*J. curcas*, *J. pandurifolia*, dan *Codiaeum variegatum*), Solanaceae (*Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum*, dan *Solanum torvum*), dan Myrtaceae (*Psidium guajava*, *Syzygium aquae*, dan *Eugenia jambolana*). Bahan yang digunakan untuk metode pewarnaan adalah asetocarmine 0,75%, TTC 1%, IKI 1%, dan aniline blue 0,2%, sedangkan untuk metode perkecambahan digunakan formula Brewbaker & Kwack (10% sukrosa, 100 ppm H_3BO_4 , 300 ppm $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$, 200 ppm $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 100 ppm KNO_3 dalam 1000 mL aquades), Brewbaker & Kwack tanpa sukrosa, larutan PGM yang dimodifikasi (10% sukrosa, 0.005% H_3BO_4 , 10 mM CaCl_2 , 0.05% mM KH_2PO_4 , 4% PEG 6000), dan larutan sukrosa 10%. Peralatan yang dibutuhkan adalah deck glass, pinset, vial, jarum ose, hit counter, pipet, box taperware, tisu, termometer, mikroskop cahaya Olympus BX51, mikroskop cahaya Nikon SMZ1000, dan mikroskop pemindai elektron JSM-5310LV (Scanning Electron Microscope/ SEM).

Metode Percobaan

Penelitian meliputi pengamatan morfologi polen dan pelaksanaan dua percobaan, yaitu percobaan I dan percobaan II. Percobaan I bertujuan untuk menentukan media pengecambahan polen yang terbaik bagi masing-masing famili. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor. Faktor yang diuji adalah media pengecambahan polen (G) yang terdiri atas empat macam, yaitu (G1) media Brewbaker & Kwack, (G2) media Brewbaker & Kwack tanpa sukrosa , (G3) larutan PGM, dan (G4) larutan sukrosa 10% pada spesies dalam satu famili, sehingga analisis data dilakukan tiap famili.

Model linier untuk mengujinya adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + \beta_j + (G\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \text{ dimana :}$$

Y_{ijk} : nilai pengamatan pada perlakuan media ke-i, spesies ke-j, dan ulangan ke-k

μ : nilai tengah populasi

G_i : pengaruh perlakuan media ke-i

β_j : pengaruh spesies ke-j

$(G\beta)_{ij}$: pengaruh interaksi antara media ke-i dengan spesies ke-j

ε_{ijk} : pengaruh galat percobaan media ke-i, spesies ke-j, dan ulangan ke-j

Percobaan II bertujuan untuk menentukan pewarna polen yang terbaik bagi masing-masing famili. Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor. Faktor yang diuji adalah pewarna polen (S) yang terdiri atas empat taraf, yaitu (S1) aniline blue 0,2%, (S2) asetocarmine 0,75%, (S3) Iodine-Potassium Iodide (IKI) 1%, dan (S3) tetrazolium 1%

Model linier untuk mengujinya adalah :

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \alpha_j + (S\alpha)_{ij} + \varepsilon_{ij} \text{ dimana :}$$

Y_{ij} : nilai pengamatan pada pewarna ke-i, spesies ke-j, dan ulangan ke-k

μ : nilai tengah populasi

S_i : pengaruh perlakuan pewarna ke-i

α_j : pengaruh spesies ke-j

$(S\alpha)_{ij}$: pengaruh interaksi antara pewarna ke-i dengan spesies ke-j

ε_{ij} : pengaruh galat percobaan pewarna ke-i, spesies ke-j, dan ulangan ke-k

Apabila media dan pewarna berpengaruh nyata terhadap viabilitas polen, maka dilakukan uji lanjut dengan DMRT pada taraf 5%. Uji korelasi antara kedua percobaan tersebut dilakukan untuk mempelajari keeratan hubungan keduanya sehingga dapat ditentukan kemungkinan penggunaan metode pewarnaan untuk menduga viabilitas polen dengan lebih akurat dan efisien.

Pelaksanaan Penelitian

Percobaan ini dilakukan dengan memasukkan sejumlah polen ke dalam masing-masing media, baik pengecambahan maupun pewarna yang diujikan secara bersamaan. Tahapan dalam percobaan ini adalah :

1. Pengambilan polen dilakukan langsung dari lapangan pada pagi hari sebelum bunga mekar (antesis).
2. Bunga dibawa ke laboratorium dan dibiarkan antesis. Pada Poaceae, sebelum antesis sekamnya digunting pada bagian atasnya sehingga anteranya keluar untuk mempercepat pecahnya antera.
3. Setelah antesis, polen dikecambahkan pada media yang telah disiapkan pada *deck glass* dengan menggunakan jarum ose (diameter kurang lebih 0,5 mm). Untuk famili Poaceae, sebelum dilakukan pengecambahan, anter yang sudah mekar dilakukan rehidrasi di atas cawan petri yang dialasi tisu basah dan disimpan dalam box taperware yang tertutup rapat selama ± 3 jam. Jarum ose sebelumnya dicelupkan ke dalam media perkecambahan yang digunakan sehingga serbuk sari dapat menempel. Pengecambahan harus dilakukan dengan cepat karena keberhasilan perkecambahan tergantung pada kelembaban sekitar butir polen (Wahyudin, 1999). Satu *deck glass* merupakan satu ulangan perlakuan.
4. Setelah pengecambahan selesai, masing-masing *deck glass* dimasukkan ke dalam box taperware besar yang bagian bawahnya telah dialasi tisu lembab, kemudian ditutup dan diinkubasi dalam ruangan dengan suhu $\pm 24^\circ\text{C}$. Untuk pewarna tetrazolium, *deck glass* diinkubasi pada ruangan yang lebih panas dengan suhu $35 \pm 4^\circ\text{C}$.
5. Pengamatan dilakukan pada 2, 4, 6, 8, 24, 48 dan 72 jam setelah perlakuan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100X (untuk polen berukuran besar) dan 200X (untuk polen berukuran kecil). Polen yang hidup akan berkecambah dan membentuk tabung polen. Polen dikategorikan normal apabila panjang tabung polen sudah mencapai minimal sama dengan diameter polen tersebut. Sedangkan pada pewarnaan, polen dikategorikan viabel apabila berwarna biru tua pada aniline blue, merah cerah pada asetocarmine, ungu kehitaman pada IKI, dan merah cerah pada TTC. Pengamatan dihentikan apabila nilai daya berkecambah sudah mencapai nilai yang konstan. Untuk tiap pengujian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dengan satu kali ulangan berisi 3 – 7 bidang pandang. Banyaknya polen tiap ulangan sekitar 200 – 700 butir.

6. Selanjutnya dilakukan penghitungan nilai daya berkecambah atau viabilitas dengan menggunakan rumus :

$$viabilitas = \frac{\text{jumlah polen yang berkecambah}}{\text{total polen yang dikecambahan}} \times 100\%$$

$$viabilitas = \frac{\text{jumlah polen yang terwarnai}}{\text{total polen yang diamati}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Polen

Morfologi dari keempat famili menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Perbedaan ini merupakan salah satu bagian dari ciri khusus tiap famili karena dalam satu famili diduga mempunyai bentuk luar yang mirip. Perbedaan morfologi ini dapat dijadikan sebagai landasan dalam sistem identifikasi tanaman (Erdtman, 1972).

Euphorbiaceae mempunyai bentuk polen yang bulat dengan ukuran yang bervariasi. Polen *Jatropha pandurifolia* (diameternya sebesar $81,2 \pm 8,65 \mu\text{m}$) lebih besar daripada polen *Codiaeum variegatum* ($47,3 \pm 1,98 \mu\text{m}$) (Tabel 1). Cekungan pada polen tersebut disebabkan oleh keadaan polen yang terdehidrasi (Gambar 1A). Bentuk dan jumlah pori polen pada Euphorbiaceae tidak terlihat dengan jelas, tetapi permukaan polen famili ini terdapat tonjolan-tonjolan yang membentuk suatu pola. Menurut Erdtman (1972), polen Euphorbiaceae merupakan golongan *nonaperture* atau tidak memiliki lubang pori.

Solanaceae (*Capsicum annuum*) memiliki bentuk polen yang lonjong dengan panjang $46,9 \pm 2,89 \mu\text{m}$ dan lebar $21,8 \pm 2,20 \mu\text{m}$ (Tabel 1). Porinya berbentuk kolpata berjumlah 3 buah (trikolpata) (Gambar 1B). Ketiga spesies dari famili Solanaceae menunjukkan morfologi yang serupa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Erdtman (1972) yang menyatakan bahwa dalam genus *Capsicum* dengan *Solanum* memiliki morfologi yang serupa. Dalam penelitian ini juga diketahui bahwa *Nicotiana tabacum* juga memiliki morfologi yang mirip dengan *Capsicum annuum*. Meskipun demikian dalam satu famili belum tentu memiliki bentuk yang sama karena menurut Erdtman (1972) morfologi polen dalam Solanaceae tidak selalu berpori, tetapi ada beberapa spesies yang tidak memiliki pori.

Famili Poaceae (*Sorghum bicolor*) memiliki bentuk polen yang bulat dengan diameter $48,9 \pm 1,87 \mu\text{m}$ dengan satu pori (uniporata). Erdtman (1972) menyatakan bahwa morfologi polen Poaceae biasanya berupa satu buah pori di bagian distal, tetapi pada *Triticale sp.* jumlah porinya bervariasi sebanyak 0–7 buah dengan bentuk porinya mendekati bulat, ramping dan menonjol (Gambar 1C).

Myrtaceae (*Psidium guajava*) memiliki bentuk polen yang beragam meskipun dalam satu antera. Bentuk polennya ada yang segitiga dan segiempat. Pada polen yang mendekati bentuk segitiga sama sisi, tingginya sekitar $17,16 \mu\text{m}$ dan pada polen yang bentuknya mendekati segiempat tingginya mencapai $20,26 \mu\text{m}$. Bentuk porinya kolpata dengan jumlah sesuai dengan bentuk polen. Polen segitiga jumlah pori tiga dan segiempat jumlah pori juga empat (Gambar 1D). Menurut Erdtman (1972), polen Myrtaceae membentuk kutub yang sama (isopolar) dan biasanya radiosimetrik dengan pori 2, 3, dan 4 kolpata.

Percobaan 1

Daya berkecambah (DB) polen pada masing-masing famili menunjukkan nilai yang berbeda pada media perkecambahan yang berbeda (Tabel 2). Perbedaan tersebut sangat dipengaruhi oleh komposisi kimia masing-masing media..

Uji lanjut DMRT pada taraf 5% menunjukkan bahwa media PGM menghasilkan DB yang tidak berbeda nyata pada Euphorbiaceae dan Solanaceae, tetapi tidak pada *Zea mays* (Poaceae) dan *Syzygium aquaeae* serta *Eugenia jambolana* (Myrtaceae), begitu juga dengan media BK menunjukkan DB yang tidak berbeda nyata pada hampir semua famili, kecuali pada *Psidium guajava* (Myrtaceae) (Tabel 2). Nilai DB tertinggi diperoleh dari polen *Psidium guajava* dengan media PGM (96,8%), namun nilai DB ini tidak berbeda nyata dengan media BK (93,6%). Sedangkan nilai DB terendah terjadi pada *Syzygium aquaeae* (10%) walaupun pada media BK spesies ini menunjukkan DB yang lebih baik (30,9%).

Pada media Brewbaker & Kwack tanpa sukrosa (BK-S) hanya ada satu spesies yang berhasil berkecambah, yaitu *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) sebesar 17,2%, sedangkan pada media

sukrosa 10%, hanya ada tiga spesies yang mampu berkecambah, yaitu *Codiaeum variegatum* (Euphorbiaceae) sebesar 74,4%, *Capsicum annuum*, dan *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) masing-

masing sebesar 17,4% dan 24,6%. Oleh karena itu hanya data perkecambahan pada media PGM dan BK yang digunakan dalam uji korelasi.

Tabel 1. Morfologi polen keempat famili

Famili/Spesies	Bentuk	Ukuran ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	Bentuk pori	Jumlah pori
Euphorbiaceae				
- <i>Codiaeum variegatum</i>	Bulat	$d = 47.3 \pm 1.98$	-	-
- <i>Jatropha pandurifolia</i>		$d = 81.2 \pm 8.65$		
Solanaceae		$p = 46.9 \pm 2.89$	Kolpata	3
<i>Capsicum annuum</i>	Lonjong	$l = 21.8 \pm 2.20$	Kolpata	
Poaceae				
- <i>Sorghum bicolor</i>	Bulat	$d = 48.9 \pm 1.87$	Porata	1
- <i>Zea mays</i>		$d = 98.141$	Porata	
Myrtaceae	Segitiga	$t = 17.161$	Kolpata	3
<i>Psidium guajava</i>	Segiempat	$t = 20.260$	Kolpata	4

Tabel 2. Daya berkecambah polen masing-masing famili pada media yang berbeda

Famili	Spesies	PGM	BK	BK-S	Sukrosa
Euphorbiaceae	<i>Jatropha curcas</i>	19,4 ^{ab}	4,2 ^b	0	0
	<i>Jatropha pandurifolia</i>	31,7 ^a	3,3 ^b	0	0
	<i>Codiaeum variegatum</i>	48,4 ^a	45,8 ^a	0	74,4
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>	78,4 ^a	57,4 ^{ab}	0	17,4
	<i>Nicotiana tabacum</i>	71,9 ^{ab}	40,4 ^b	17,2	24,6
	<i>Solanum torvum</i>	84,7 ^a	63,8 ^{ab}	0	0
Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	27,8 ^a	2,9 ^c	0	0
	<i>Sorghum bicolor</i>	22,3 ^a	4,6 ^{bc}	0	0
	<i>Zea mays</i>	12,9 ^b	4,1 ^{bc}	0	0
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	96,8 ^a	93,6 ^a	0	0
	<i>Syzygium aquaeae</i>	10,0 ^c	30,9 ^b	0	0
	<i>Eugenia jambolana</i>	15,2 ^c	38,4 ^b	0	0

Ket. Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu famili tidak berbeda nyata menurut DMRT taraf 5%

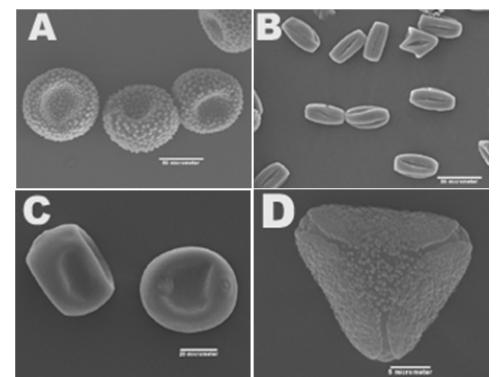
Tabel 3. Viabilitas polen masing-masing famili pada pewarna yang berbeda

Famili	Spesies	Aniline blue	Asetocarmin	IKI	TTC
Euphorbiaceae	<i>Jatropha curcas</i>	76,7 ^{a-d}	94,3 ^{ab}	85,4 ^d	83,6 ^{a-d}
	<i>Jatropha pandurifolia</i>	93,2 ^{a-c}	98,5 ^a	86,6 ^{b-d}	93,5 ^{a-d}
	<i>Codiaeum variegatum</i>	90,7 ^{a-d}	99,3 ^a	5,0 ^{cd}	95,1 ^{a-d}
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>	75,0 ^b	100 ^a	0	72,7 ^b
	<i>Nicotiana tabacum</i>	100 ^a	99,8 ^a	0	73,2 ^b
	<i>Solanum torvum</i>	96,0 ^a	95,6 ^a	0	69,8 ^b
Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	56,5 ^{bc}	100 ^a	60,3 ^{bc}	6,6
	<i>Sorghum bicolor</i>	62,4 ^{bc}	92,6 ^{ab}	29,1 ^{cd}	0
	<i>Zea mays</i>	11,1 ^d	99,0 ^a	83,9 ^a	21,0
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	95,4 ^{ab}	98,3 ^a	0	10,2
	<i>Syzygium aquaeae</i>	73,8 ^d	91,1 ^{bc}	0	0
	<i>Eugenia jambolana</i>	63,7 ^d	85,9 ^c	0	0

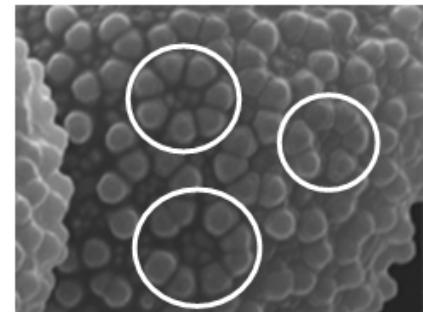
Ket. Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu famili tidak berbeda nyata menurut DMRT 5%

Meskipun kedua media (PGM dan BK) menunjukkan hasil yang serupa, tetapi media PGM memberikan nilai daya berkecambah yang lebih baik dibandingkan dengan media BK. Hampir semua spesies menunjukkan daya berkecambah yang lebih baik pada media PGM kecuali *Syzygium aquaeae* dan *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). Hal ini mengindikasikan bahwa media PGM dapat digunakan secara umum dibandingkan BK yang hanya menghasilkan nilai DB yang baik pada beberapa spesies saja. Schreiber dan Dresselhaus (2003) menyatakan bahwa PGM memang bukan merupakan media yang umum untuk perkecambahan polen bagi semua spesies tanaman, tetapi PGM dapat digunakan untuk mempelajari perkecambahan polen pada banyak spesies baik monokotil maupun dikotil dari famili yang berbeda di bawah kondisi yang sama.

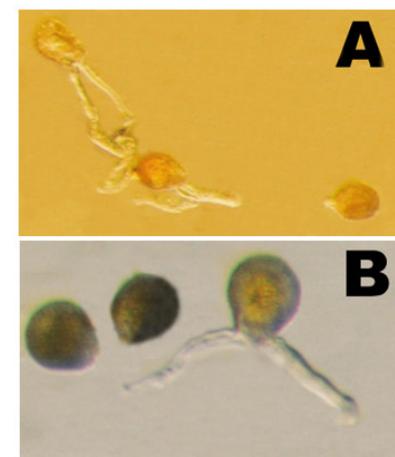
Tinggi atau rendahnya nilai daya berkecambah polen dipengaruhi oleh banyak faktor eksternal, seperti sumber karbon, boron dan kalsium, potensial air, derajat kemasaman media, kerapatan polen dalam media dan aerasi dalam media kultur (Rihova *et al.*, 1996). Karbon sangat diperlukan untuk inisiasi dan pertumbuhan tabung polen. Sukrosa merupakan senyawa gula sebagai sumber karbon yang mudah diabsorbsi oleh sel tanaman, sehingga sukrosa sering digunakan dalam pembuatan media perkecambahan polen karena dapat menghasilkan persentase perkecambahan yang lebih tinggi dan perpanjangan tabung polen (Malik, 1979). Sukrosa merupakan komponen gula yang esensial pada media pengecambahan polen *Pinus roxburghii*. Tetapi untuk



Gambar 1. Morfologi polen keempat famili



Gambar 2. Permukaan polen yang berpola



Gambar 3. Polen dengan tabung bercabang

pengujian DB jangka pendek (< 48 jam), sukrosa dalam media bukan merupakan sumber karbon yang esensial bagi perkecambahan polen, tetapi lebih dikarenakan sifat osmotikumnya dalam media (Galleta, 1983; Nygaard 1977 dalam Webber dan Masimbert, 1993). Dalam percobaan ini dapat dilihat bahwa media yang tidak mengandung sukrosa (BK-S) hanya mampu menghasilkan perkecambahan pada *Nicotiana tabacum*, sementara media yang mengandung sukrosa cenderung menghasilkan perkecambahan yang lebih baik pada beberapa spesies. Polen *Codiaeum variegatum*, memberikan perkecambahan yang lebih tinggi (74,4%) pada sukrosa 10% dibandingkan media lainnya.

Polen sebagian spesies mensyaratkan boron untuk kesempurnaan perkecambahan *in vitro*. Polen angiospermae pada umumnya mengandung lebih banyak boron dari pada gymnospermae. Hal ini berkaitan dengan waktu yang dibutuhkan dalam perkecambahan. Polen buah pear dengan konsentrasi optimum boron dalam polen 80 ppm dapat berkecambah kira-kira dua jam, sedangkan *Pinus elliotii* membutuhkan waktu 40 sampai 70 jam untuk perkecambahan dalam air murni (Malik, 1979). Peter and Stanley (1974) dalam Malik, (1979) menyatakan bahwa penambahan 3 ppm boron dapat meningkatkan perkecambahan *in vitro* kira-kira 5%. Schreiber and Dresselhaus (2003) juga menambahkan bahwa penambahan boron 0,005% dapat meningkatkan perkecambahan polen sampai 90% pada *Zea mays*. Tanpa adanya asam borat, perkecambahan polen kentang $< 5\%$ (Rihova *et al.*, 1996).

Berdasarkan kandungan boron dalam media, PGM merupakan media yang optimal kandungan boronnya dibandingkan media lainnya, termasuk BK. Pada media BK, komposisi boron sekitar 100 ppm sedangkan PGM 0,005% (50 ppm). PGM dengan kandungan boron di bawah 100 ppm menunjukkan hasil yang lebih baik pada hampir semua spesies, kecuali *Syzygium aquaeae* dan *Eugenia jambolana*. Meskipun boron cukup penting bagi pengecambahan polen, konsentrasi boron yang tinggi juga mampu menurunkan daya berkecambah. Menurut Rihova *et al.* (1996), penambahan boron di atas 1,6 mM dapat menurunkan perkembahan polen kentang.

Pengaruh penambahan boron dapat optimal apabila disertai pula dengan sukrosa. Media dengan 0,8 mM asam borat ditambah 20% sukrosa merupakan media yang optimal bagi perkembahan polen genus *Solanum* (Rihova *et al.*, 1996). Dalam penelitian ini media yang mengandung boron tetapi tanpa sukrosa tidak menghasilkan perkembahan polen kecuali *Nicotiana tabacum* sebesar 17,2% (Tabel 2).

Potensial osmotik air relatif lebih tinggi daripada bulir polen sehingga polen yang dikecambahan pada air dapat mengalami plasmolisis. Menurut Webber dan Masimbert (1993), polen *Douglas fir* yang dikecambahan pada media air saja mengalami kerusakan sebesar 42,4%. Potensial osmotik air dapat diturunkan dengan penambahan sukrosa, PEG, atau media Brewbaker sehingga kerusakan polen akibat tekanan osmotik media menurun. Penambahan PEG 4000 dapat menurunkan kerusakan polen *Douglas fir* sebesar 9,3%, sedangkan sukrosa dapat menurunkan kerusakan polen sebesar 20,8%. Media BK menunjukkan proporsi kerusakan polen akibat tekanan osmotik paling rendah yaitu 0,08%. Tingginya nilai DB pada media PGM diduga disebabkan oleh adanya senyawa osmotik untuk media perkembahan. Pada dasarnya, media PGM serupa dengan BK kecuali dalam PGM ditambahkan PEG. Penggunaan PEG 4000 lebih didasarkan pada perannya sebagai pemelihara sifat fisik polen dari hidrasi dan elastisitas membran sel. Menurut Webber dan Masimbert (1993), penambahan 10% media BK dalam PEG dapat menghilangkan kerusakan polen *Douglas fir* akibat tekanan osmotik. Dalam penelitian ini digunakan PEG 6000 karena lebih mudah diperoleh. Schreiber and Dresselhaus (2003) mengungkapkan bahwa aplikasi PEG dengan bobot molekul yang tinggi atau rendah tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada polen jagung.

Banyaknya pori yang dimiliki suatu polen dapat mempengaruhi jumlah tabung polen yang muncul. Pada famili Poaceae, hanya ditemukan satu tabung polen saja karena famili ini hanya memiliki satu pori. Berbeda dengan Myrtaceae yang jumlah porinya tiga atau empat, sehingga kadang-kadang diperoleh tabung polen lebih dari satu walaupun hanya ada satu tabung yang dapat tumbuh memanjang setelah beberapa saat. Lain halnya dengan Euphorbiaceae yang jumlah porinya tidak diketahui tetapi tekstur permukaan polen membentuk suatu pola (Gambar 2), tabung polen yang muncul dari famili ini dapat lebih dari satu (Gambar 3). Pola tersebut diduga merupakan pori polen yang menyebar, sehingga tabung polen dapat muncul dari beberapa tempat.

Periode pengecambahan ditentukan berdasarkan pada periode ketika persentase perkembahan sudah konstan. Periode perkembahan masing-masing spesies berbeda dan dipengaruhi oleh media. Pada media BK dan PGM, Euphorbiaceae sudah tidak lagi mengalami pertambahan perkembahan pada 48 jam setelah perlakuan (Gambar 4). sedangkan pada Solanaceae dibutuhkan enam jam pada media BK dan enam jam pada media PGM untuk mencapai perkembahan yang konstan (Gambar 4).

Pengamatan pada Euphorbiaceae dihentikan pada 72 jam setelah inkubasi karena pada hari kedua (24 jam) media sudah terkontaminasi cendawan terutama yang mengandung sukrosa, sehingga mempersulit pengamatan. Tidak adanya pertambahan polen yang berkecambah mungkin disebabkan oleh habisnya nutrisi media terserap oleh cendawan sehingga polen tidak mampu berkecambah.

Pada Poaceae, pengamatan DB dapat dilakukan dua jam setelah pengecambahan pada media BK dan delapan jam dalam media PGM (Gambar 4). Sedangkan pada Myrtaceae, pengamatan dapat dilakukan empat jam (*Psidium guajava*) atau 24 jam dengan media BK, demikian juga apabila menggunakan media PGM, dua jam (*Psidium guajava*) dan enam jam dapat dijadikan waktu pengamatan setelah inkubasi.

PGM merupakan media yang terbaik untuk pengecambahan polen karena selain menghasilkan daya berkecambah yang tinggi, periode pengamatannya relatif lebih cepat dibandingkan dengan

media BK. Periode pengamatan yang lebih cepat merupakan salah satu kriteria bagi penentuan media untuk pengujian viabilitas polen.

PERCOBAAN II

Viabilitas polen yang diuji berdasarkan pewarnaan juga memberikan hasil yang beragam pada masing-masing famili dengan menggunakan pewarna yang berbeda (Tabel 3). Perbedaan tersebut disebabkan oleh adanya senyawa kimia yang terkandung dalam pewarna. Berdasarkan uji lanjut DMRT dapat diketahui bahwa pewarna yang berbeda, menghasilkan nilai yang berbeda juga.

Aniline blue merupakan salah satu pewarna yang cukup banyak digunakan untuk menduga viabilitas polen. Pewarna ini bereaksi dengan kalosa. Kalosa adalah karbohidrat yang memisahkan sel induk mikrospora (MMC) dari sel lainnya dan menyelimuti polen sesudah meiosis (Lersten, 2004). Apabila suatu polen mengandung kalosa, maka polen tersebut akan terwarnai menjadi biru tua. Secara umum aniline blue menghasilkan estimasi yang lebih rendah pada Poaceae dibandingkan dengan famili lainnya (Tabel 3).

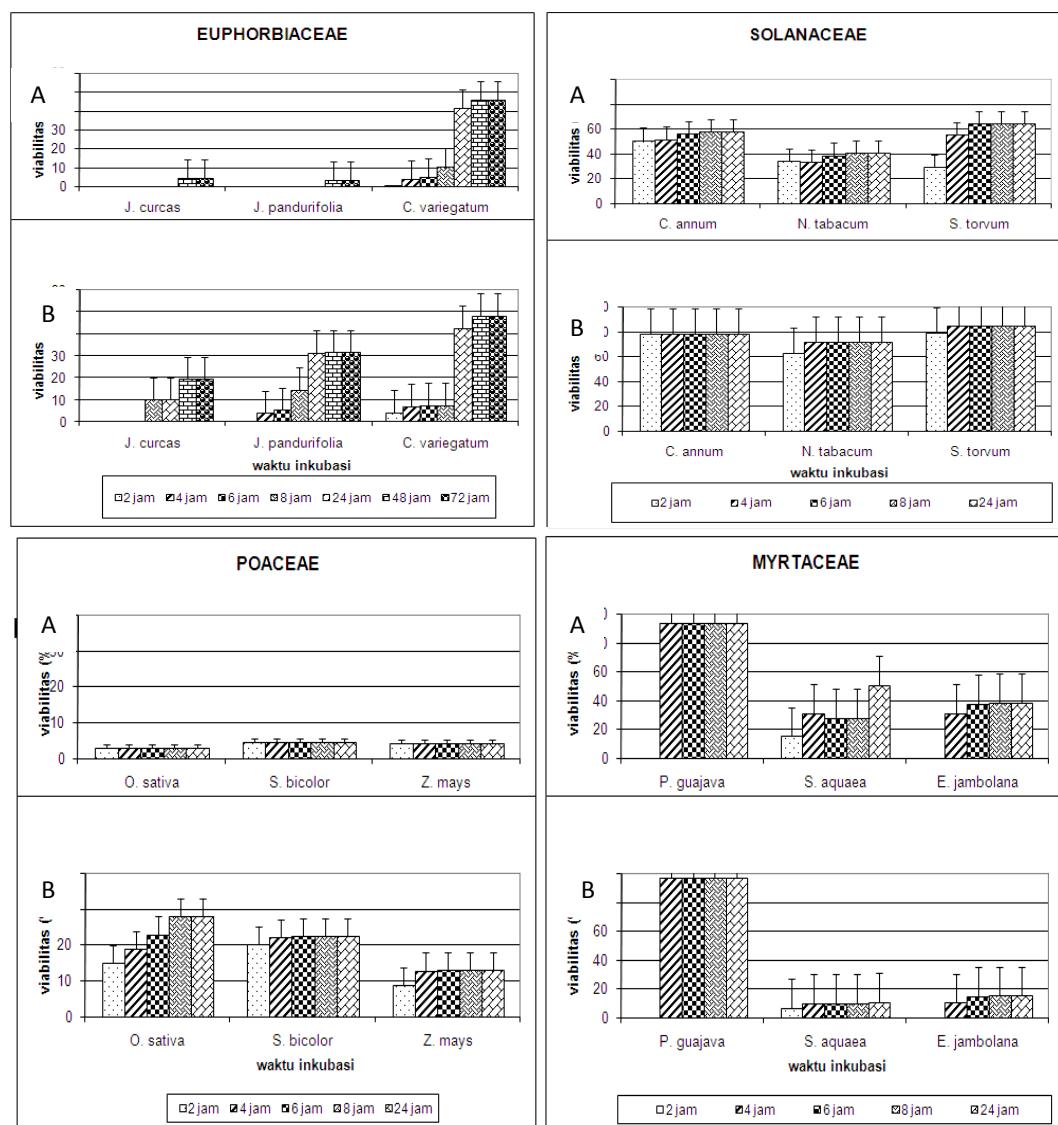
Periode pengamatan pewarna aniline blue masih tergolong panjang. Pada Euphorbiaceae, rata-rata diperlukan waktu sekitar 8 jam, begitu juga pada Poaceae dan Solanaceae. Pada Myrtaceae diperlukan waktu yang lebih panjang dibandingkan ketiga famili lainnya, yaitu sekitar 24 jam, kecuali pada *E. jambolana*. Pengamatan dihentikan ketika tidak terjadi penambahan jumlah polen yang terwarnai (Gambar 5).

Selain aniline blue, asetocarmen juga banyak digunakan untuk menduga viabilitas polen. Asetocarmen biasa digunakan untuk mendeteksi adanya kromosom. Sel induk mikrospora yang sedang mengalami meiosis pada tahap duplikasi kromosom dapat terwarnai menjadi merah tua menyala. Oleh karena itu, polen yang tidak viable (hampa) tidak dapat terwarnai. Asetocarmen memberikan hasil yang hampir seragam pada semua famili, kecuali pada Myrtaceae (Tabel 3).

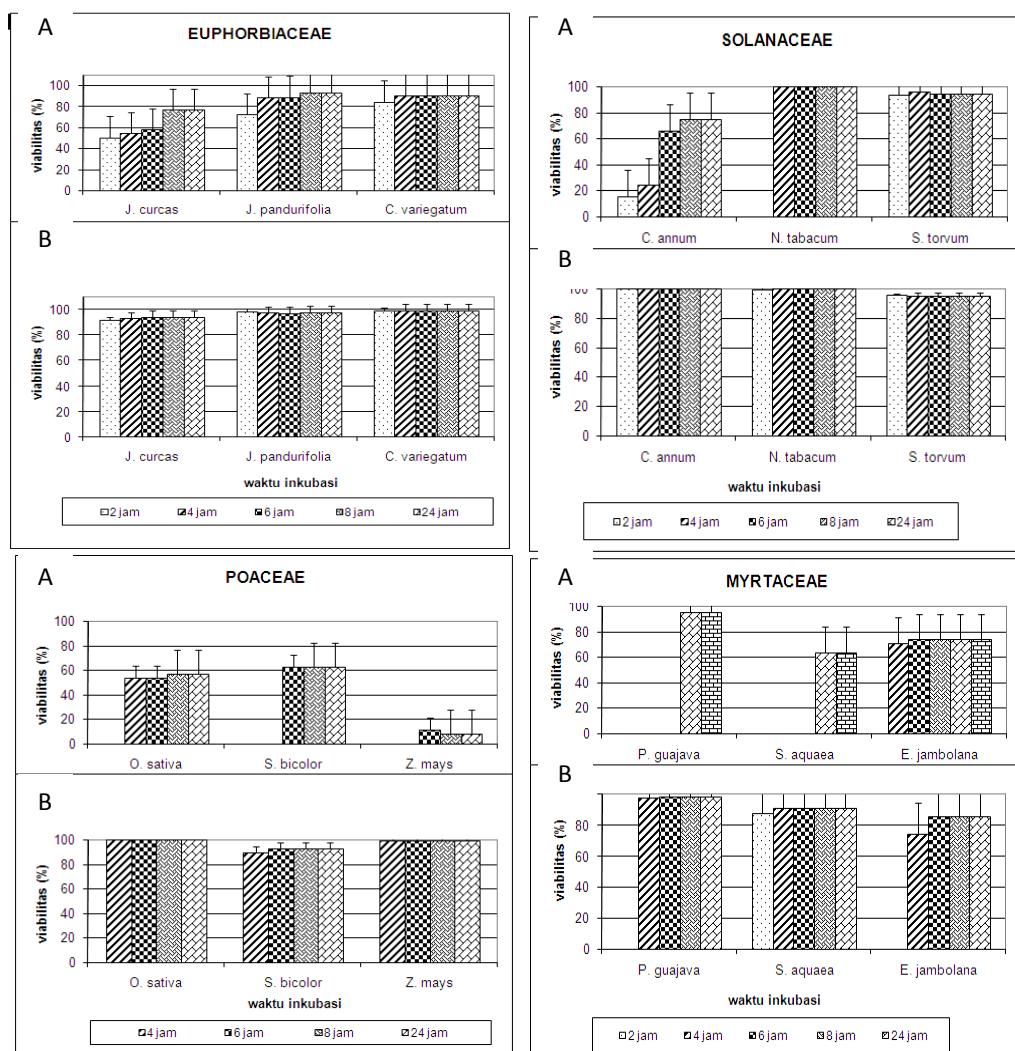
Periode pengamatan pewarna asetocarmen lebih pendek dibandingkan aniline blue. Pada Euphorbiaceae diperlukan waktu rata-rata dua jam, kecuali pada *J. curcas* yang dapat diamati pada enam jam. Demikian juga pada Solanaceae, rata-rata diperlukan waktu dua jam, kecuali pada *N. tabacum* (4 jam). Pada Poaceae dibutuhkan waktu rata-rata sekitar empat jam, kecuali pada *S. bicolor* yang dapat diamati pada 6 jam setelah pewarnaan, sedangkan pada Myrtaceae diperlukan sekitar 6 jam, kecuali pada *S. aquaeae* yang dapat diamati lebih awal pada 4 jam setelah pewarnaan (Gambar 5).

Iodine Potassium Iodide (IKI) merupakan senyawa yang sering dipakai untuk mendeteksi adanya kandungan gula/pati. Pati berperan dalam menunjang polen, sehingga diasumsikan semakin tinggi kandungan pati dalam polen, semakin tinggi viabilitas polen tersebut. Penelitian ini menunjukkan bahwa hanya polen Euphorbiaceae dan Poaceae yang dapat dideteksi viabilitasnya dengan menggunakan IKI (Tabel 3). Menurut Baker dan Baker dalam Mulcahy dan Ottaviano (1983), polen Solanaceae ada yang berpati dan ada juga yang tidak, polen dari suku Solanea, Daturae, Salpiglossideae, dan Cestreae (*Nicotiana* dan *Markea*) tidak mengandung pati. Diduga tanaman contoh yang digunakan dalam penelitian ini tergolong tidak mengandung pati. Sedangkan pada Myrtaceae, polen yang diuji tidak terwarnai menjadi biru kehitaman, melainkan hijau armi. Hal ini kemungkinan besar bahwa polen Myrtaceae tidak mengandung pati. Dengan demikian, diketahui bahwa pewarna IKI tidak dapat digunakan pada polen yang tidak berpati.

Periode pengamatan pewarna IKI dapat diamati rata-rata 8 jam pada Euphorbiaceae, kecuali pada *Codiaeum variegatum* yang dapat diamati pada dua jam. Pada Poaceae, periode pengamatan dengan pewarna IKI lebih pendek dari pada Euphorbiaceae, rata-rata 4 jam setelah pewarnaan, kecuali pada *Sorghum bicolor* (2 jam). Menurut Bolat & Pirlak (1999), periode pengamatan pewarna IKI pada buah batu dapat dilakukan beberapa menit saja setelah pewarnaan. Periode pengamatan diduga pula tergantung oleh pewarna itu sendiri (Iodin). Iodin yang sudah lama (membentuk kristal) sudah kurang efektif lagi dijadikan pewarna karena warna yang dihasilkan dapat hilang seperti semula setelah beberapa jam (Gambar 5).



Gambar 4. Periode pengamatan viabilitas polen keempat famili berdasarkan pengecambahan pada media BK (A) dan PGM (B)



Gambar 5. Periode pengamatan viabilitas polen keempat famili berdasarkan pewarna aniline blue (A) dan asetocarmine (B).

Selain pewarna yang dapat mendeteksi adanya senyawa kimia tertentu, ada juga pewarna yang dapat mendeteksi adanya enzim, salah satunya adalah TTC (2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride) yang dapat mendeteksi kandungan enzim dehidrogenase. Setiap organisme yang hidup pasti melakukan respirasi yang dapat menghasilkan gas H₂, gas hidroksida dihasilkan oleh bantuan enzim dehidrogenase. Enzim tersebut dapat bereaksi dengan tetrazolium membentuk endapan merah yang disebut formazan. Pada beberapa Poaceae dan Myrtaceae tidak terdeteksinya viabilitas polen dengan TTC mungkin disebabkan oleh rendahnya konsentrasi pewarna yang digunakan sebagaimana yang ditunjukkan oleh rendahnya intensitas warna merah yang ditampilkan, sehingga polen yang diuji berwarna merah muda.

Periode pengamatan pada pewarna tetrazolium menunjukkan keragaman pada masing-masing famili. Pada Euphorbiaceae dapat diamati dari mulai 2 jam (*C. variegatum*), 6 jam (*J. curcas*), sampai 8 jam (*J. pandurifolia*). Begitu juga pada Solanaceae, pengamatan dapat diamati setelah 4 - 8 jam (Gambar 5).

Tabel 4. Korelasi antara media dengan pewarna

	PGM	BK	Aniline	Asetocarmin
BK	0.831**			
Aniline	0.624*	0.540		
Asetocarmin	0.487	0.080	0.106	
TTC	0.341	0.046	0.511	0.486

Penggunaan metode pewarnaan ini memang memiliki beberapa keunggulan, diantaranya adalah evaluasi yang mudah dan waktu pengamatan yang relatif lebih cepat dibandingkan metode pengecambahan (Bolat & Pirlak, 1999). Oleh karenanya korelasi antara metode pengecambahan dengan pewarnaan perlu diketahui, sehingga metode pengecambahan *in vitro* yang memerlukan waktu inkubasi yang relatif lama dan evaluasi yang cukup sulit memiliki alternatif lain dalam pengujian viabilitas polen.

Media PGM dan Brewbaker memiliki korelasi yang positif dan sangat nyata, yaitu sebesar 0,831 (Tabel 4). Artinya, penggunaan media Brewbaker yang selama ini dijadikan dasar pengujian viabilitas polen mempunyai alternatif lain (PGM) yang lebih berlaku umum dan dapat digunakan pada banyak spesies tanpa perlu dimodifikasi lagi komposisinya. Selain itu, media PGM juga berkorelasi positif dengan aniline blue sebesar 0,624. Hal ini berarti bahwa pewarna aniline blue dapat digunakan sebagai alternatif lain dalam pengujian viabilitas polen.

Menurut Bolat & Pirlak (1999), pada Sweet Cherry ditemukan korelasi yang positif juga antara metode pengecambahan dengan pewarnaan, yaitu sebesar 0,704 antara IKI dengan media agar, begitu juga dengan Apricot dengan nilai korelasi 0,686. Meskipun demikian, lebih besarnya nilai viabilitas pada metode pewarnaan membuat metode tersebut hanya dijadikan sebagai penduga kasar pada pengujian viabilitas polen.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari percobaan yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Media pengecambah polen PGM memberikan nilai viabilitas yang lebih tinggi daripada media lain. Pengujian viabilitas polen menggunakan PGM dapat dilakukan pada 4 jam setelah pengecambahan.
2. Pewarna asetocarmin memberikan nilai viabilitas yang tertinggi dibandingkan pewarna lain dan pengamatan dapat dilakukan pada 2 jam setelah pewarnaan.
3. Aniline blue dapat digunakan untuk menduga perkembangan polen dengan PGM karena terdapat korelasi positif sebesar 0,624.

Ucapan Terimakasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Iris Rengganis dan Bapak Dudin Supti Wahyudin atas masukan selama penulisan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajaj, Y. P. S. 1979. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica*. 28(2): 267-285.
- Bolat, I. and L. Pirlak. 1999. An investigation on pollen viability, germination, and tube growth in some stone fruits. *Journal of Agriculture and Forestry*. 99 (23) 383-388.

Card, S.D., M.N. Pearson, and G.R.G. Clover. 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. *Australasian Plant Pathology*. 36(5): 455-461.

Erdtman, G. 1972. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy-Angiosperms (An Introduction to Palynology I)*. Hafner Publishing Company. New York.

Galletta, G. J. 1983. Pollen and seed management p. 23-35. In: J. N. More and J. Janick (Eds.). *Methods in Fruit Breeding*. Purdue Univ. Press. West Lafayette Ind.

Hawkes, J.G. 1981. Germplasm collection, preservation, and use. In K.J.Frey (Ed.). *Plant Breeding II*. Iowa State Univ. Ames. P. 57-84.

http://www.wiki.answer.com/Q/why_sterile_pollen_do_not_take_acetocarmine_stain diakses pada tanggal 06/12/2008

<http://news.bioversityinternational.org/index.php?itemid=1826> diakses pada tanggal 27/10/2007.

Kelly, J. K, A. Rasch, and S. Kalisz. 2002. a method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany*. 89 (6) : 1021-1023.

Lersten, 2004. *Flowering Plant Embryology*. Blackwell Publishing Professional. Ames IOWA USA.

Malik C. P. 1979. *Current Advantages in Plant Reproductive Biology*. Kalyani Publisher. Ludhiana, New Delhi. 351 p.

Mulcahy, G. M. and D. L. Mulcahy. 1983. A comparison of pollen tube growth in bi-and trinucleate pollen, p. 29 – 34. In ; D.L. Mulcahy and E. Ottaviano (Eds.). *Pollen : Biology and Implications for Plant Breeding*. Elsevier Science Publishing Co, Inc. New York.

Norton, J.D. 196. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. *The American Society Hort. Sci.* 59: 132-134.

Owens, J.N., P. Sornsathapornkul, and S. Tangmitcharon. 1991. Manual: Studying Flowering and Seed Ontogeny in Tropical Forest Trees. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre Project, Muak-Lek, Saraburi, Thailand.

Rihova, L., E. Hrabetova, and J. Tupy. 1996. Optimization of conditions for *in vitro* pollen growth in potatoes. *Int. J. Plant. Sci.* 157(5): 561-566.

Schreiber, D. N. and T. Dresselhaus. 2003. *In Vitro Pollen Germination and Transient Transformation of Zea mays and Other Plant Species*. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 31 – 41.

Song, Z.P. 2001. A study of pollen viability and longevity in *Oryza rufipogon*, *O. sativa*, and other hybrids. *Genetics resources report*; p : 31-32.

Wahyudin, D. S. 1999. Daya Simpan Serbuk Sari Salak (*Salacca* sp). Pada Tingkat Kemasakan yang Berbeda. Skripsi. Jurusan Budidaya Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Wang, Z. Y, Y. Ge, M. Scott, and G. Spangenberg. 2004. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. *American Journal of Botany*. 91 (4) 523 – 530.

Webber, J.E., and Masimbert, M.B. 1993. The response of dehydrated pollen Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) pollen to three *in vitro* viability assays and their relationship to actual fertility. *Ann. Sci. For.* 50: 1-22.