



# AGROSAINSTEK

## Jurnal Ilmu dan Teknologi Pertanian

Website jurnal : <http://journal.ubb.ac.id/index.php/agrosainstek>

### Artikel Penelitian

## Respon Antera *Lilium longiflorum* Thunb. dengan Berbagai Stadium Perkembangan Mikrospora pada Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh

### *Response of Lilium longiflorum Thunb. Anther with Various Microspore Development Stages in Combinations of Plant Growth Regulator Concentration*

Anggraeni<sup>1,2\*</sup> dan Iriawati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Jl. Ganesha No. 10 Bandung 40132

<sup>2</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung. Jl. Raya Balunujuk 33172

Diterima : 21 April 2017/Disetujui : 30 November 2017

#### ABSTRACT

The right stage of microspore development to be used as explants become critical factor for the successful of anther culture. Anther containing microspores at the pollen mother cell to binucleate stages were cultured on Murashige and Skoog (MS) media supplemented with various plant growth regulators. The media of 7.5  $\mu$ M NAA + 0.75  $\mu$ M BAP with bud size of 0.6-2.0 cm (pollen mother cell stage) are a combination that fits in callus, indirect shoot and direct shoot initiation with the percentage growth of each 30%; 16.6%; and 14.8%. Chromosome counts of root-tip cell of 89 regenerant revealed that 85 regenerant were diploids (95.5%) and 4 regenerant aneuploids (4.5%), but the haploid regenerants didn't obtained. This result suggests that regenerants were derived from a somatic cells division.

**Keywords:** BAP, Liliaceae, Microspores, NAA.

#### ABSTRAK

Tingkat perkembangan mikrospora yang tepat untuk dijadikan eksplan menjadi faktor penentu keberhasilan kultur antera. Antera yang mengandung mikrospora dengan stadium sel induk hingga binukleat dikultur pada media Murashige dan Skoog (MS) dengan beberapa kombinasi zat pengatur tumbuh. Media NAA 7,5  $\mu$ M + BAP 0,75  $\mu$ M dengan ukuran kuncup 0,6-2,0 cm (stadium sel induk mikrospora) merupakan kombinasi yang cocok dalam inisiasi kalus, tunas tidak langsung dan tunas langsung dengan persentase pertumbuhan masing-masing 30%; 16,6%; dan 14,8%. Penghitungan jumlah kromosom pada sel ujung akar terhadap 89 regeneran hasil kultur antera didapatkan 85 regeneran (95,5%) dengan tingkat ploidi diploid dan 4 regeneran aneuploid (4,5%), namun tidak didapatkan regeneran yang haploid. Hasil ini menunjukkan bahwa regeneran yang dihasilkan berasal dari pembelahan sel-sel somatik.

**Kata kunci:** BAP, Liliaceae, Mikrospora, NAA.

#### 1. Pendahuluan

*Lilium longiflorum* Thunb. merupakan tanaman hias yang menjadi salah satu dari tiga besar

tanaman hias berumbi (Pelkonen 2005). Perbanyakan *L. longiflorum* umumnya dilakukan dengan benih umbi berukuran lebih dari 3.5 cm. Namun, perbanyakan dengan benih umbi kurang disukai karena hasil perbanyakan sangat rendah dan memakan waktu lama. Selain itu, *L. longiflorum*

\*Korespondensi Penulis.

E-mail: [anggieib@gmail.com](mailto:anggieib@gmail.com) (Anggraeni)

merupakan individu *self-incompatible*, dan sifat ini menjadi salah satu hambatan dalam pemuliaan (Kamenetsky & Okubo 2013). Upaya pemuliaan *L. longiflorum* dapat dilakukan melalui teknik kultur *in vitro* untuk menghasilkan bibit *L. longiflorum* dalam jumlah banyak dan waktu yang relatif singkat. Keberhasilan perbanyak *L. longiflorum* melalui kultur *in vitro* bergantung pada kombinasi jenis media, zat pengatur tumbuh (ZPT), dan bagian eksplan yang digunakan. Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyak tanaman melalui kultur jaringan (Khosravi *et al.* 2007). Media kultur yang memenuhi syarat berupa media yang mengandung unsur hara makro, mikro, vitamin, dan sukrosa sebagai sumber energi (Pelkonen 2005).

Propagasi tanaman lili melalui kultur *in vitro* umumnya menggunakan eksplan berupa daun (Saetiew & Umamanit 2015), umbi (Kanchanapoom *et al.* 2011), hipokotil (Kedra & Bach 2005) dan akar (Kumar *et al.* 2008), namun terbatas hanya menghasilkan tanaman diploid. Kultur antera menjadi salah satu teknik kultur *in vitro* yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan tanaman haploid dan diploid (Fernandez *et al.* 1997). Faktor terpenting pada kultur antera adalah penentuan tingkat perkembangan polen atau mikrospora yang tepat untuk dijadikan eksplan sehingga androgenesis dapat terjadi. Penelitian yang dilakukan oleh Han & Niimi (2005) pada *L. formosanum* menunjukkan bahwa, mikrospora yang berada pada stadium inti uninukleat merupakan tahap yang paling responsif untuk induksi terbentuknya embriosomatik. Pada *L. longiflorum* cv. 'Wase Teppo Yuri', tahap paling responsif untuk induksi androgenesis adalah rentang tahap tetrad, uninukleat awal, uninukleat akhir sampai binukleat awal (Fernandez *et al.* 1997).

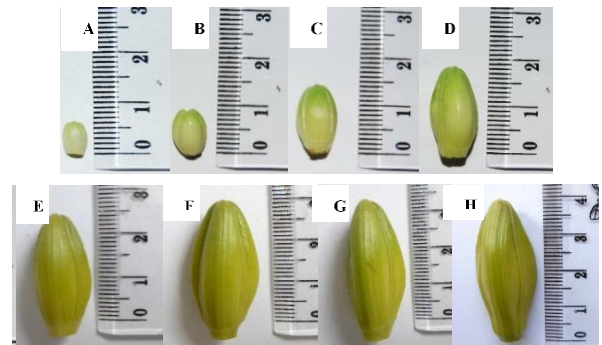
Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi stadium perkembangan mikrospora yang responsif terhadap pembentukan dan regenerasi kalus, tunas tidak langsung dan tunas langsung hasil kultur antera *L. longiflorum* pada media inisiasi dengan kombinasi konsentrasi ZPT yang berbeda. Diakhir penelitian diharapkan akan diperoleh stadium perkembangan mikrospora dan kombinasi ZPT yang sesuai untuk pembentukan dan regenerasi kalus, tunas tidak langsung dan tunas langsung.

## 2. Bahan dan Metode

### Eksplan

Antera yang berasal dari kuncup bunga *L. longiflorum* berukuran 0.1-4.0 cm dibagi menjadi 8 perbedaan ukuran kuncup dengan interval 0.5 cm (Gambar 1). Kuncup bunga disterilkan secara

bertahap menggunakan bakterisida 0.2%, NaOCl 2%, dan tween 20. Penghitungan rasio stadium perkembangan mikrospora dan jumlah kromosom menggunakan metode pewarnaan aceto-orcein.



Gambar 1. Kuncup bunga *L. longiflorum* (A) K1 0.1-0.5 cm; (B) K2 0.6-1.0 cm; (C) K3 1.1-1.5 cm; (D) K4 1.6-2.0 cm; (E) K5 2.1-2.5 cm; (F) K6 2.6-3.0 cm; (G) K7 3.1-3.5 cm; (H) K8 3.6-4.0 cm.

### Inisiasi kultur antera

Eksplan yang didapat dari hasil seleksi tahapan perkembangan mikrospora diinisiasi dalam media MS dengan 3 kombinasi zat pengatur tumbuh, yaitu M1 (MS + 2.5  $\mu$ M NAA + 0.25  $\mu$ M BAP), M2 (MS + 5  $\mu$ M NAA + 0.5  $\mu$ M BAP) dan M3 (MS + 7.5  $\mu$ M NAA + 0.75  $\mu$ M BAP). Kultur antera diinkubasi di ruang kultur (25  $\pm$  2  $^{\circ}$ C). Parameter yang diamati berupa persentase eksplan membentuk kalus, tunas tidak langsung, dan tunas langsung dengan melakukan pengamatan secara visual. Pengamatan dilakukan 1 bulan setelah inisiasi kultur, dan interval pengamatan 2 minggu sekali.

### Penghitungan rasio stadium perkembangan mikrospora dan jumlah kromosom

Penghitungan rasio stadium perkembangan mikrospora dan jumlah kromosom dilakukan dengan menggunakan metode *squash* yang diaplikasi dari Han & Niimi (2005). Eksplan dimasukkan ke dalam larutan 0.002 M 0.8 hidroksiquinolin, disimpan selama 3-5 jam pada suhu 18-20  $^{\circ}$ C. Kemudian eksplan difiksasi dalam etanol:asam asetat glasial (3:1) selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke dalam larutan HCl 1 N: asam asetat 45% (3:1) selama 5 menit dan dibilas dengan air mengalir selama 15 menit. Pewarnaan preparat dilakukan dengan menggunakan aceto-orcein 2% pada suhu 60  $^{\circ}$ C selama 60 menit, kemudian dibilas dalam larutan asam asetat 45% selama 5 menit. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dan inverted pada perbesaran 200x dan 400x. Pada setiap eksplan digunakan 3

ulangan. Pengamatan pada setiap ulangan dilakukan pada 10 bidang pandang mikroskop dan diulang minimal tiga kali untuk setiap ulangan. Tahap perkembangan mikrospora yang diamati berupa persentase sel induk, diad, tetrad, tahap inti tunggal (uninukleat awal dan akhir), tahap inti dua (binukleat), dan polen. Sedangkan, pengamatan kromosom dipilih beberapa sel yang menunjukkan fase metaphase dan dilakukan penghitungan jumlah kromosom.

**Analisis data**

Data dianalisis menggunakan ANOVA dengan uji lanjut LSD dan Mann Whitney pada taraf signifikan 5% untuk mengetahui pengaruh beda antar perlakuan.

**3. Hasil**

**3.1 Tahapan dan Stadium Perkembangan Mikrospora**

Hasil pengamatan pada antera *L. longiflorum* pada beberapa ukuran kuncup bunga didapatkan bahwa antera dengan panjang kuncup bunga antara 0.1-1.5 cm (K1, K2 dan K3) masih berada pada stadium perkembangan sel induk mikrospora (*pollen mother cell*) dengan rasio 100% (Tabel 1). Bunga yang mempunyai ukuran kuncup 1.6-2.0 cm (K4) mengandung sel dominan pada stadium sel

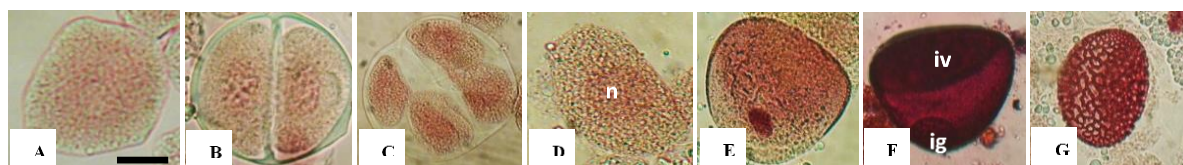
induk mikrospora dengan rasio 86.7%, namun pada ukuran kuncup tersebut juga didapatkan sel induk mikrospora yang telah mengalami pembelahan sel meiosis I menghasilkan sel dengan inti diad dengan rasio 13.24% (Tabel 1 dan Gambar 2B). Pada sel dengan inti diad memiliki jumlah kromosom haploid (n=12), yang mana pada tahap ini terjadi pemisahan kromosom dari pasangan kromosom homolog.

Stadium tetrad didapatkan pada ukuran kuncup bunga 2.1 cm hingga 3.5 cm (K5, K6 dan K7), seperti yang dilaporkan Inoue & Oldenbourg (1998), bahwa antera pada kuncup *L. longiflorum* Thunb. dengan panjang 2.24 cm mengandung mikrospora pada stadium tetrad. Stadium uninukleat awal banyak mendominasi kuncup K6 dan K7 dengan ukuran panjang antara 2.6-3.5 cm dengan persentase berkisar antara 15-20% (Gambar 2D).

Stadium uninukleat akhir didapatkan pada kuncup K7 dengan ukuran panjang antara 3.1-3.5 cm dengan rasio 10.46%. Stadium berikutnya terjadi pembelahan mitosis asimetris sehingga membentuk inti vegetatif dan inti generatif yang tampak terpisah, yang mana inti generatif mulai terkondensasi (Gambar 2F) yang disebut stadium binukleat. Stadium binukleat didapatkan pada kuncup K7 dengan ukuran panjang antara 3.1-3.5 cm dengan rasio 14.1%. Polen matang didapatkan pada kuncup K7 dan K8 dengan rasio 39.9% dan 100%.

Tabel 1. Tahap perkembangan sel induk mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga

Ukuran Kuncup	Tahap Perkembangan Inti Mikrospora (%)						
	Sel Induk	Diad	Tetrad	Uninukleat Awal	Uninukleat Akhir	Binukleat	Polen
K1	100.0 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
K2	100.0 ± 3.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
K3	100.0 ± 2.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
K4	86.7 ± 4.2	13.2 ± 1.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
K5	0.0 ± 0.0	49.3 ± 2.1	50.7 ± 1.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
K6	0.0 ± 0.0	14.0 ± 3.8	65.3 ± 2.4	20.7 ± 1.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
K7	0.0 ± 0.0	0.2 ± 13.8	19.2 ± 2.1	15.9 ± 1.7	10.4 ± 1.4	14.1 ± 2.4	39.9 ± 1.6
K8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 3.5



Gambar 2. Tahapan dan stadium perkembangan mikrospora *L. longiflorum* (A) Sel induk mikrospora, (B) Stadium diad, (C) Stadium tetrad, (D) Stadium uninukleat awal, (E) Stadium uninukleat akhir, (F) Stadium binukleat, (G) Polen matang. n: nukleaus; iv: inti vegetatif; ig: inti generatif. Pembesaran 400x. Bar: 10 µm.

### 3.2 Seleksi tahap perkembangan kuncup bunga pada media inisiasi kultur antera

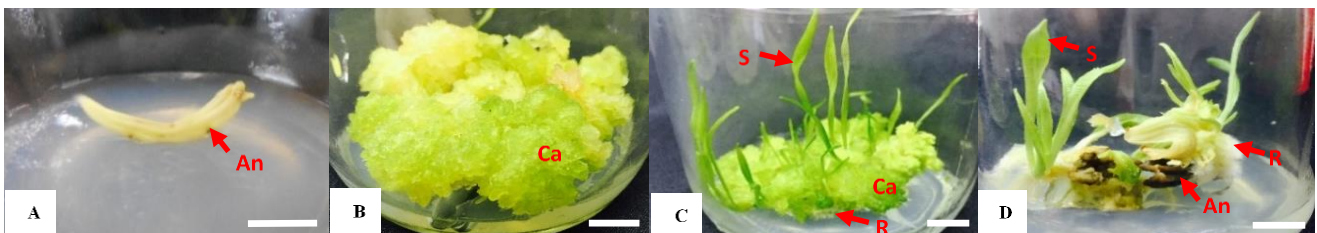
Kombinasi konsentrasi NAA 7.5  $\mu\text{M}$  dan BAP 0.75  $\mu\text{M}$  (M3) merupakan kombinasi yang paling baik untuk menginduksi pertumbuhan pada kultur antera. Kombinasi konsentrasi ini mampu menstimulus pertumbuhan kultur antera 25.00% hingga 53.33% (Tabel 2). Persentase pertumbuhan tertinggi terjadi pada ukuran panjang kuncup bunga K2 dengan nilai  $53.33 \pm 11.70\%$ , yang diikuti dengan ukuran panjang kuncup bunga K4 dengan nilai  $40.74 \pm 4.27\%$ . Kuncup bunga K2 dan K4 yang memiliki panjang antara 0.6-2.0 cm mengandung sel yang didominasi oleh stadium perkembangan sel induk mikrospora (Tabel 1).

Pada Tabel 2 juga menunjukkan bahwa kuncup K2 dan K4 mampu menginduksi pertumbuhan kalus, tunas tidak langsung dan tunas langsung. Induksi pembentukan kalus dan tunas tidak langsung tertinggi didapatkan pada kombinasi media dan ukuran kuncup M3K2 dengan persentase pertumbuhan masing-masing sebesar  $30.00 \pm 8.81\%$  dan  $16.66 \pm 3.84\%$ , dengan rata-rata jumlah tunas tidak langsung sebesar  $11.33 \pm 1.53$ . Namun, induksi pertumbuhan tunas langsung tertinggi didapatkan

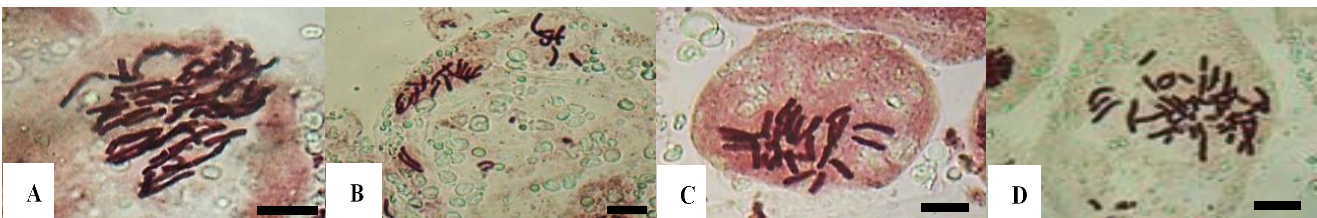
dari kombinasi media dan ukuran kuncup M3K4 dengan persentase pertumbuhan sebesar  $14.81 \pm 2.13\%$  dengan rata-rata jumlah tunas langsung  $2.33 \pm 0.58$ . Hasil pengamatan pada fenotip kalus dari eksplan antera *L. longiflorum* menunjukkan variasi pada warna kalus, mulai dari kalus berwarna hijau, hijau kekuningan, kuning, hingga kuning keputihan (Gambar 3B).

### 3.3 Penghitungan Jumlah Kromosom

Konfirmasi awal jumlah kromosom dilakukan pada akar tanaman *L. longiflorum* Thunb. *wildtype* yang memiliki jumlah kromosom  $2n=2x=24$ . Pengamatan sitologi pada akar dan kalus dari 89 regeneran yang berhasil diinduksi dari kultur antera, 85 (95.5%) regeneran memiliki jumlah kromosom diploid dan 4 (4.5%) aneuploid, namun tidak didapatkan regeneran yang haploid (Gambar 4). Pada regeneran aneuploid, terdapat sel dengan jumlah kromosom yang berbeda pada akar maupun kalus yang sama. Sel aneuploid ditemukan pada kalus dengan kombinasi media M2K1 ( $2n=20$ ) sebanyak 2.3% dan ( $2n=26$ ) sebanyak 1.1%, sedangkan pada akar ditemukan pada kombinasi media M3K2 ( $2n=20$ ) dengan persentase 1.1%.



Gambar 3. Respon pertumbuhan kultur antera. (A) eksplan antera; (B) kalus (M3K2); (C) tunas tidak langsung (M3K2); (D) tunas langsung (M3K4); An: antera; Ca: kalus; S: shoot; R: root. Bar: 1 cm.



Gambar 4. Determinasi tingkat ploidi pada akar dan kalus *L. longiflorum* hasil dari kultur antera. (A) sel diploid *wildtype* ( $2n=2x=24$ ), (B) sel diploid kultur antera ( $2n=2x=24$ ), (C) sel aneuploid ( $2n=20$ ), (D) sel aneuploid ( $2n=26$ ). Pembesaran: 400x. Bar: 10  $\mu\text{m}$ .

Tabel 2. Respon pertumbuhan kultur antera pada kombinasi media dan ukuran kuncup bunga *L. longiflorum* yang berbeda

Kombinasi Media dan Ukuran Kuncup	Pertumbuhan Kultur Antera (%)	Kalus (%)	TTL (%)	Rata-rata Jumlah TTL/Eksplan	TL (%)	Rata-rata Jumlah TL/Eksplan
M1K1	26.66 ± 6.93 bcd	23.33 ± 7.69 bc	3.33 ± 1.92 b	3.33 ± 0.58 ab	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M1K2	25.00 ± 7.21 bcd	12.50 ± 4.16 bc	12.50 ± 4.16 b	3.67 ± 1.15 ab	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M1K3	25.00 ± 7.43 bcd	10.71 ± 3.57 bc	14.28 ± 4.12 b	2.00 ± 1.00 ab	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M1K4	18.51 ± 5.65 bc	7.40 ± 2.13 bc	11.11 ± 3.70 b	4.33 ± 1.53 ab	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M1K5	3.33 ± 1.92 b	3.33 ± 1.92 b	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M1K6	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M1K7	3.33 ± 1.92 b	3.33 ± 1.92 b	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M2K1	28.57 ± 2.06 bcd	17.85 ± 4.12 bc	10.71 ± 3.57 b	8.00 ± 2.00 b	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M2K2	26.66 ± 3.84 bcd	20.00 ± 0.00 bc	6.66 ± 3.84 b	1.33 ± 0.58 ab	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M2K3	16.66 ± 4.81 bc	0.00 ± 0.00 a	12.50 ± 4.16 b	1.67 ± 1.15 ab	4.16 ± 2.40 b	0.67 ± 0.58 ab
M2K4	7.40 ± 4.27 b	7.40 ± 4.27 bc	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M2K5	10.00 ± 3.33 b	6.66 ± 3.84 bc	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M2K6	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M2K7	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M3K1	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M3K2 *	53.33 ± 11.70 d	30.00 ± 8.81 c	16.66 ± 3.84 b	11.33 ± 1.53 b	6.66 ± 1.92 b	1.33 ± 0.58 ab
M3K3	25.00 ± 8.98 bcd	25.00 ± 8.98 bc	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M3K4 *	40.74 ± 4.27 c	18.51 ± 2.13 bc	7.40 ± 2.13 b	9.67 ± 2.08 b	14.81 ± 2.13 b	2.33 ± 0.58 b
M3K5	6.66 ± 1.92 b	6.66 ± 1.92 bc	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M3K6	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
M3K7	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a

Keterangan = M: kombinasi NAA dan BAP; K: ukuran kuncup *L. longiflorum*; TTL: tunas tidak langsung; TL: tunas langsung. Asterisk: respon pertumbuhan terbaik. Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata menurut uji Kruskal-Wallis yang dilanjutkan uji Mann-Whitney pada taraf  $\alpha = 5\%$ .

#### 4. Pembahasan

Penentuan stadium mikrospora yang responsif menginduksi pertumbuhan kalus maupun tunas menjadi tahapan utama dalam kultur antera. Hal ini berkaitan dengan perubahan dan perkembangan yang terjadi di dalam antera, terutama dalam proses meiosis. Penentuan stadium perkembangan mikrospora berkaitan dengan ukuran panjang kuncup bunga, seperti yang dilaporkan oleh Lauxen *et al.* (2003) dan Wahidah (2010). Secara umum hasil pengamatan menunjukkan bahwa terdapat korelasi antara panjang kuncup bunga terhadap stadium perkembangan mikrospora. Semakin panjang ukuran kuncup bunga maka stadium perkembangan mikrospora semakin dewasa.

Hasil pengamatan tahapan dan stadium perkembangan mikrospora didapatkan bahwa eksplan antera yang dapat digunakan untuk proses inisiasi berupa kuncup bunga dengan ukuran 0.1-3.5 cm (K1-K7). Kuncup dengan ukuran 3.6-4.0 cm (K8) tidak digunakan sebagai eksplan untuk tahap inisiasi karena rasio stadium perkembangan menunjukkan 100% polen. Polen merupakan sel

yang telah terdeterminasi sehingga kemampuan sel untuk melakukan diferensiasi ketahap perkembangan selanjutnya telah hilang. Seleksi tahap perkembangan kuncup bunga pada beberapa media inisiasi ini bertujuan untuk menentukan ukuran kuncup yang responsif dalam menginduksi pembentukan kalus, tunas tidak langsung, dan tunas langsung. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara pemberian beberapa taraf konsentrasi NAA dan BAP terhadap persentase dan rata-rata pertumbuhan kultur antera.

Persentase pertumbuhan kultur antera tertinggi membentuk kalus, tunas tidak langsung dan tunas langsung terjadi pada kuncup bunga dengan dominan stadium perkembangan sel induk mikrospora. Sel induk mikrospora bersifat meristematik dan masih aktif membelah sehingga pemberian NAA dan BAP pada konsentrasi yang optimal mampu menginduksi pertumbuhan kultur antera. Interaksi dan keseimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen, menentukan arah perkembangan kultur antera. Penambahan auksin (NAA) dan sitokinin (BAP)

eksogen dapat mengubah level zat pengatur tumbuh endogen sel. Level zat pengatur tumbuh endogen ini kemudian merupakan *triggering factor* untuk proses-proses pertumbuhan dan morfogenesis (Murthy & Kondamudi 2010).

Rata-rata pertumbuhan kalus terjadi pada 6 minggu setelah inisiasi pada semua kombinasi media, seperti dilaporkan oleh Han *et al.* (1997) pada lili Asiatic hybrid 'Connecticut King'. Sebagian kalus mengalami pertumbuhan tunas menghasilkan tunas tidak langsung (Gambar 3C). Kalus pada kondisi yang mendukung pertumbuhannya akan mengarah pada pembentukan meristemoid. Aktivitas pembelahan meristemoid mengarah pada pembentukan primordial yang bersifat unipolar (Oluk *et al.* 2010). Rata-rata tunas tidak langsung tumbuh pada 8-9 minggu setelah pertumbuhan kalus. Induksi tunas langsung terjadi rata-rata pada 6-7 minggu setelah inisiasi. Tunas yang dihasilkan memiliki daun dengan ukuran yang lebih besar bila dibandingkan dengan tunas tidak langsung. Hal ini diduga karena nutrisi dan ZPT yang berada di dalam media terpusat pada induksi pertumbuhan tunas secara langsung, sedangkan pada tunas tidak langsung nutrisi dan ZPT yang terdapat pada media mendukung pertumbuhan kalus bersama dengan tunas tidak langsung. Namun, pembentukan tunas langsung pada penelitian ini relatif masih rendah. Hal ini diduga karena belum optimalnya media inisiasi yang digunakan. Rachmawati (2005) menyatakan bahwa faktor fisiologis eksplan seperti genotif tanaman donor, umur antera dan tahap perkembangan mikrospora, juga mempengaruhi keberhasilan kultur antera menginduksi pembentukan tunas.

Hasil analisis deskriptif terhadap kalus dari eksplan antera *L. longiflorum* Thunb. menunjukkan variasi pada warna kalus. Warna hijau pada kalus merupakan akibat efek sitokinin dalam pembentukan klorofil. Sitokinin berperan dalam memperlambat proses senesensi (penuaan) sel dengan menghambat perombakan butir-butir klorofil dan protein dalam sel (Wattimena 1992). Warna kalus dapat menjadi indikator perkembangan eksplan pada kultur *in vitro* sebagai gambaran visual kalus. Pada hasil analisis deskriptif terhadap struktur kalus menunjukkan bahwa kalus yang terbentuk memiliki struktur remah. Struktur kalus merupakan salah satu penanda kualitas suatu kalus. Terbentuknya kalus yang berstruktur remah dapat dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan dan auksin eksogen yang ditambahkan pada media inisiasi.

Pengamatan sitologi pada regenerasi yang berasal dari kuncup K7, yang berada pada stadium

perkembangan mikrospora uninukleat awal hingga binukleat, juga menghasilkan 100% regenerasi diploid. Dominasi regenerasi diploid dalam penelitian ini dapat terjadi karena regenerasi diduga berasal dari pembelahan sel-sel somatik dinding antera, seperti yang dilaporkan oleh Han *et al.* (1997) pada lili Asiatic hybrid 'Connecticut King', atau bagian antera yang lainnya seperti sisa filamen, bukan berasal dari sel mikrospora melalui proses organogenesis, seperti yang dilaporkan oleh Han & Niimi (2005) pada *L. formosanum*. Sel-sel dinding antera mengalami dediferensiasi dan menghasilkan sel-sel yang meristematis. Dinding antera yang tebal dan komposisi media yang kurang tepat mungkin dapat juga menjadi faktor penghambat untuk induksi terjadinya pertumbuhan mikrospora secara *in vitro*.

Selain didapatkan regenerasi diploid, terdapat juga regenerasi aneuploid. Jumlah kromosom pada regenerasi aneuploid yang didapatkan pada penelitian ini berupa hipohaploid ( $2n=20$ ) dan hiperdiploid ( $2n=26$ ). Hasil penelitian ini memperkuat penelitian sebelumnya bahwa kultur antera akan menghasilkan regenerasi dengan jumlah kromosom atau ploidi yang bervariasi (Zagorska *et al.* 2004). Sel pada regenerasi aneuploid diduga mengalami proliferasi lebih dari satu sel (Ramsay *et al.* 2003), pembelahan mitosis abnormal, pertumbuhan cepat dari sel-sel diploid, dan *nondisjunction* dari salah satu pasang kromosom serta terjadi endoreduplikasi (Asri *et al.* 2015). Oliveira *et al.* (2013) menyatakan bahwa jenis dan konsentrasi ZPT juga dapat memicu terjadinya aberasi kromosom yang dihubungkan dengan variasi somaklonal. Penambahan auksin eksogen dapat mempengaruhi proses dediferensiasi, sehingga kromosom menjadi tidak stabil dan mengganggu siklus mitosis serta replikasi DNA.

## 5. Kesimpulan

Stadium perkembangan mikrospora yang responsif menginduksi pertumbuhan dan regenerasi *L. longiflorum* Thunb. yaitu stadium sel induk mikrospora (kuncup K2 dan K4) dengan kombinasi media NAA 7.5  $\mu\text{M}$  dan BAP 0.75  $\mu\text{M}$ .

## 6. Daftar Pustaka

Asri AW, Sulistyarningsih E, Murti RH. 2015. Karakter dan Sitologi Tanaman Bawang Daun (*Allium fistulosum* L.) Hasil Induksi Kolkisin pada Generasi Vegetatif Kedua. *Vegetalika*. 4(1): 37-45.

- Fernandez AMA, Nakazaki T, Yamagata H, Tanisaka T. 1997. Production of Double-Haploid Plant from *Lilium longiflorum* Thunb. Anther Culture. *Plant Science*. 123: 179-187.
- Han DS & Niimi Y. 2005. Production of Haploid and Double Haploid Plants from Anther-derived Callus of *Lilium formosanum*. *Proc. IX Intl Symp. on Flower Bulbs*. 389-393.
- Han DS, Niimi Y, Nakano M. 1997. Regeneration of Haploid Plants from Anther Cultures of The Asiatic Hybrid Lily 'Connecticut King'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 47: 153-158.
- Inoue S & Oldenbourg R. 1998. Microtubule Dynamics in Mitotic Spindle Displayed by Polarized Light Microscopy. *Molecular Biology of the Cell*. 9: 1603-1607.
- Kamenetsky R & Okubo H. 2013. *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production*. CRC Press Taylor and Francis Group. p 94-100.
- Kanchanapoom K, Ponpiboon T, Wiraklat W. 2011. Regeneration of Lily (*Lilium longiflorum* 'Easter Lily') by Callus Derived from Leaf Explant Cultured *In vitro*. *Science Asia*. 37: 373-376.
- Kedra M & Bach A. 2005 Morphogenesis of *Lilium martagon* L. Explant in Callus Culture. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 47(1): 65-73.
- Khosravi S, Azghandi AV, Mojtahedi N, Haddad R. 2007. *In Vitro* Propagation of *Lilium longiflorum* var. Ceb-Dazzle Through Direct Somatic Embryogenesis. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(15): 2517-2521.
- Kumar S, Chaudhary V, Kanwar JK. 2008. Bulblet Regeneration from *In vitro* Roots of Oriental Lily Hybrid. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 16: 353-360.
- Luxen MS, Santos EK, Hu C, Jacques SMC, Zanettini MHB. 2003. Association Between Floral Bud Size and Developmental Stage in Soybean Microspore. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46(4): 515-520.
- Murthy KSR & Kondamudi R. 2010. Effect of Cytokinins and Auxins on *in vitro* Flowering of Endangered *Ceropegia spiralis* Wight and *C. pusilla* Wight & Arn. *Phytomorphology*. 60: 32-37.
- Oliviera SC, Nunes ACP, Carvalho CR, Clarindo WR. 2013. *In Vitro* Polyploidization from Shoot Tips of *Jatropha curcas* L.: A Biodiesel Plant. *Plant Growth Regal*. 69: 79-86.
- Oluk EA, Orhan S, Karakas O, Cakir A, Gonuz A. 2010. High Efficiency Indirect Shoot Regeneration and Hypericin Content in Embryogenic Callus of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *African Journal of Biotechnology*. 9(15): 2229-2233.
- Pelkonen VP. 2005. *Biotechnological Approaches in Lily Production*. Oulun Yliopisto, Oulu, Oulu University Press.
- Rachmawati F. 2005. Kultur Antera pada Anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden ex Andre). [Thesis] Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Ramsay JL, Galitz DS, Lee CL. 2003. Basal Medium and Sucrose Concentration Influence Regeneration of Easter Lily in Overy Culture. *Horticultural Science*. 38(3): 404-406.
- Saetiew K & Umamanit T. 2015. Micropropagation of *Lilium formolongo* via Leaf Explant. *Journal of Agriculture Technology*. 11(4): 855-862.
- Wahidah B. 2010. Pengaruh Cekaman Pelaparan dan Suhu Tinggi Terhadap Induksi Embriogenesis Mikrospora Tembakau. *Jurnal Biologi*. 14: 1-6.
- Wattimena GA & Mattjik NA. 1992. *Pemuliaan Tanaman secara In Vitro*. dalam Tim Laboratorium Kultur Jaringan (Ed.). Bioteknologi Tanaman. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Zagorska NA, Shtereva LA, Kruleva MM, Sotirova VG, Baralieva DL, Dimitrov BD. 2004. Induced Androgenesis in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) III: Characterization of the Regenerants. *Plant Cell Report*. 22: 449-456.