

## Pengembangan Kultur Mikrospora pada Varietas Padi Ladang Lokal Asal Kendari

### *Development of Microspore Culture of Local Upland Rice Varieties from Kendari*

Suaib\* dan Makmur Jaya Arma

Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo  
Kampus Kemaraya, Kendari-Sulawesi Tenggara, 93121, Indonesia

Diterima 15 November 2011/Disetujui 26 Maret 2012

#### ABSTRACT

The three Kendari local upland rice varieties i.e. Paedai Meeto, Pae Ikulaku and Pae Loio were studied for their ability to produce the embryogenic microspore and microspore callus from anther under high temperature stress pretreatments. The pretreatment was conducted by incubating the anther in a B medium at 33 °C in darkness for 0, 2, 4, and 7 days to induce the growth of embryogenic microspores. The formation of microspore calli was obtained by incubating the embryogenic microspores into the MO-19 embryo induction medium. Scoring was conducted on the percentage of: (1) embryogenic microspores, (2) symmetrical binucleate microspores, (3) multinucleate microspores, and (4) microspore calli or embryos. Each replication consisted of three hundred of individual microspores and every treatment was replicated in three times. The mean values of the data were analyzed by variance analysis, and the Fisher LSD mean separation at 0.05 of significance level were applied to judge the best treatments. The result showed that Pae Loio produced the higher frequency of embryogenic microspores after anther pretreatment in B medium for 4 days at 33 °C in darkness compared to other varieties. Culture of embryogenic microspore of Pae Loio in MO-19 medium over 30 days also produced the symmetrical binucleate and multinucleate microspores, and microspore calli at higher frequencies than those of other local varieties.

Keywords: anther, calli, embryogenic microspores, high temperature pretreatment, upland rice

#### ABSTRAK

Kemampuan menghasilkan mikrospora embriogenik dan kalus mikrospora melalui perlakuan cekaman antera, telah dipelajari pada tiga padi ladang varietas lokal asal Kendari, yaitu: Paedai Meeto, Pae Ikulaku dan Pae Loio. Mikrospora embriogenik dan kalus mikrospora merupakan prasyarat yang sangat diperlukan bagi pembentukan tanaman melalui kultur mikrospora. Perlakuan cekaman dilakukan dengan menginkubasi antera di dalam medium B pada suhu 33 °C selama 0, 2, 4, dan 7 hari dalam kondisi gelap untuk membentuk mikrospora embriogenik. Sementara itu, kalus mikrospora diperoleh setelah mikrospora embriogenik dikulturkan di dalam medium induksi embrio mikrospora, MO-19. Variabel yang diamati disajikan dalam bentuk persentase, yaitu: (1) mikrospora embriogenik, (2) mikrospora berinti dua simetris, (3) mikrospora berinti banyak, dan (4) kalus atau embrio mikrospora. Setiap ulangan diamati minimal 300 individu mikrospora dan setiap pengamatan diulang tiga kali. Data rerata hasil pengamatan dianalisis dengan ANOVA dan penentuan perlakuan terbaik dilakukan dengan uji pemisahan rerata menurut uji T-Fisher pada level keberartian alpha 0.05. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dibandingkan dengan dua varietas lainnya, antera padi Pae Loio yang diperlakukan di dalam medium B selama 4 hari pada suhu 33 °C kondisi gelap, menghasilkan mikrospora embriogenik pada frekuensi yang lebih tinggi. Selanjutnya, inkubasi mikrospora embriogenik padi Pae Loio di dalam medium MO-19 selama 30 hari pada suhu 18 °C pada kondisi gelap juga menghasilkan mikrospora berinti dua simetris, mikrospora berinti banyak, dan kalus mikrospora pada frekuensi yang lebih tinggi.

Kata kunci: cekaman suhu tinggi, kalus mikrospora, mikrospora embriogenik, padi ladang

#### PENDAHULUAN

Pada dasarnya, kegiatan pemuliaan tanaman dapat dilakukan dalam dua cara, yaitu secara konvensional dan secara inkonvensional. Cara konvensional dapat dilakukan melalui teknik persilangan yang dilanjutkan dengan seleksi

keturunan unggul hasil persilangan, sedangkan cara inkonvensional dapat dilakukan melalui beragam teknik modifikasi sifat genetik tanaman, misalnya yang dilakukan secara *in vitro* termasuk kultur antera dan kultur mikrospora yang dilanjutkan dengan seleksi keturunan unggul. Kultur antera atau kultur mikrospora akan menghasilkan galur murni, yang hanya diperlukan dalam dua generasi penanaman, sebagai populasi dasar bagi seleksi atau sebagai tetua bagi pembentukan varietas hibrida.

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail: suaib\_06@yahoo.co.id

Di Indonesia, kultur antera telah berhasil diaplikasikan pada program pemuliaan padi sebagaimana dilaporkan oleh banyak peneliti pemuliaan padi belakangan ini (Dewi *et al.*, 2007; Herawati *et al.*, 2008). Umumnya, dua atau lebih tetua unggul disilangkan untuk mendapatkan keturunan  $F_1$  yang memiliki dua atau lebih sifat unggul, kemudian antera atau mikrosporangya dikulturkan untuk mendapatkan tanaman haploid ganda (galur murni), baik secara spontan maupun melalui teknik penggandaan kromosom selama kultur. Galur murni yang dihasilkan terbentuk dari perkembangan mikrospora selama kultur *in vitro*. Fase perkembangan mikrospora yang dapat berdiferensiasi menjadi mikrospora embriogenik, kalus atau embrio mikrospora, dan *plantlet* hijau adalah mikrospora berinti satu (*uninucleate microspore*) terutama pada fase tengah (*mid-uninucleate*).

Mikrospora embriogenik adalah mikrospora satu inti dengan ciri spesifik antara lain seperti sitoplasma jernih karena belum mengandung amilum, atau vakuola mengalami fragmentasi setelah pemberian perlakuan, dan merupakan prasyarat bagi terbentuknya kalus atau embrio mikrospora. Mikrospora embriogenik terbentuk akibat adanya perlakuan cekaman (*stress treatment*) sehingga mengalami perkembangan tidak normal (Custers *et al.*, 1994). Dalam keadaan normal, mikrospora akan berkembang menjadi tepung sari (*pollen grains*) fungsional sebagai gamet jantan (*microgametogenesis*), sedangkan pada keadaan yang tidak normal mikrospora akan berkembang menjadi embrioid (*microspore embryogenesis*).

Pada kondisi *in vivo*, mikrospora akan melakukan pembelahan mitosis dan menghasilkan inti vegetatif dan inti generatif, selanjutnya berkembang sebagai tepung sari atau sel jantan yang berfungsi membuahi inti sel betina. Sementara itu, pada kondisi *in vitro*, mikrospora akan melakukan pembelahan mitosis dan menghasilkan dua macam mikrospora, yaitu: (i) mikrospora dengan inti vegetatif dan inti generatif, dan (ii) mikrospora dengan kedua intinya menyerupai inti vegetatif (*vegetative-like nuclear*). Mikrospora tipe pertama akan menghasilkan tepung sari fungsional dan mikrospora embriogenik karena masing-masing inti simetris dan atau asimetris melakukan pembelahan secara berulang-ulang sehingga terbentuk embrioid, sedangkan mikrospora tipe ke-2 hanya akan menghasilkan mikrospora embriogenik dan embrioid selama kultur *in vitro*. Sementara itu, kalus atau embrio mikrospora adalah kalus atau embrio yang dihasilkan dari embrioid dan merupakan prasyarat terbentuknya *plantlet*.

Meskipun mikrospora tipe pertama dan tipe ke-2 dapat diinduksi untuk menghasilkan mikrospora embriogenik, induksi embriogenesis pada mikrospora yang membentuk inti generatif dan vegetatif mengandung resiko terbentuknya embrio yang menghasilkan tanaman albino karena inti generatif yang melakukan pembelahan berulang-ulang membentuk embrio (Reynolds, 1997), dan embrio yang terbentuk melalui pembelahan inti generatif umumnya tidak mampu berdiferensiasi lebih lanjut. Sementara itu, mikrospora yang membentuk dua *vegetative-like nuclear* akan berdiferensiasi membentuk embrio dan tanaman hijau lengkap. Oleh karena itu, induksi mikrospora harus diarahkan agar membelah membentuk dua inti *vegetative-*

*like nuclear* karena pembelahan inti seperti ini secara terus-menerus akan menghasilkan embrio fertil dan tanaman hijau lengkap.

Berbagai perlakuan pada eksplan (malai, bulir, antera, dan mikrospora) yang bertujuan untuk merubah perkembangan mikrospora dari jalur gametofitik ke jalur sporofitik telah diaplikasikan pada berbagai tanaman budidaya. Pra-perlakuan dimaksud dilakukan dengan cara: (1) starvasi (*starvation*, pelaparan) gula dan nitrogen, (2) penyinaran singkat, (3) tekanan osmotik, (4) suhu panas, dan (5) suhu dingin, serta (6) kimiawi (Wang *et al.*, 2000).

Starvasi antera di dalam medium B (Kyo dan Harada, 1986) pada suhu tinggi selama beberapa hari dapat merubah orientasi perkembangan mikrospora beberapa tanaman budidaya ke arah *microspore embryogenesis* selama kultur *in vitro*. Starvasi gula dan nitrogen (medium B), dan suhu tinggi (33 °C) berhasil memperbaiki embriogenesis mikrospora pada tanaman gandum (Indrianto *et al.*, 2001). Tuncer dan Yanmaz (2011) menginduksi embriogenesis mikrospora melalui iradiasi sinar *gamma* hingga 100 Gy dan cekaman suhu tinggi (32 dan 35 °C) antera tanaman *Brassica oleraceae* (L.), efektif menstimulasi pembentukan mikrospora embriogenik dan embrio mikrospora. Dengan demikian, keberhasilan kultur mikrospora sangat ditentukan oleh peralihan perkembangan mikrospora dari jalur pembentukan polen (gametofitik) ke jalur pembentukan embrio (sporofitik) melalui perlakuan cekaman pada antera sebelum dikulturkan.

Tulisan ini melaporkan hasil penelitian mengenai respon tiga varietas padi ladang lokal berantosanin asal Kendari dalam membentuk mikrospora embriogenik, dan inkubasi mikrospora embriogenik membentuk embrio mikrospora melalui inkubasi antera pada suhu tinggi. Aspek ini sangat penting diketahui karena efisiensi dan efektivitas suatu kultur androgenesis sangat ditentukan oleh pembentukan mikrospora embriogenik dan kalus atau embrio mikrospora. Semakin tinggi mikrospora embriogenik yang terbentuk, akan semakin tinggi pula kalus atau embrio mikrospora yang diperoleh sehingga akan menghasilkan *plantlet* dengan frekuensi yang tinggi pula. Dengan demikian akan sangat bermanfaat bagi beragam studi genetika dan aplikasinya pada pemuliaan tanaman. Hal ini selaras dengan pernyataan Dewi *et al.* (2007) bahwa efisiensi metode kultur antera dalam menghasilkan tanaman hijau menentukan kegunaan teknik ini dalam pemuliaan tanaman dan studi genetik.

## BAHAN DAN METODE

Tiga varietas padi ladang lokal berantosanin asal Kendari, yaitu Pae Dai Meeto, Pae Ikulaku, dan Pae Loio, digunakan dalam penelitian ini. Ketiganya disemaikan di dalam wadah plastik dengan media pasir halus hingga bibit tumbuh dengan baik. Setelah bibit memiliki tiga helai daun, masing-masing varietas ditanam sebanyak 5 bibit dalam setiap ember plastik berdiameter 30 cm yang berisi tanah lapisan atas dan pupuk kandang masing-masing sebanyak 5 kg. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik, tanaman diberi pupuk NPK berupa Urea, SP-36, dan KCl masing-

masing dengan dosis 200, 100, dan 100 kg ha<sup>-1</sup> atau berturut-turut 8, 4, dan 4 g per ember. Penyiraman ke media tanam dilakukan secara berkala sesuai kebutuhan tanaman, dan pencegahan hama dan penyakit menggunakan pestisida dilakukan sesuai kondisi infestasi hama dan penyakit tanaman.

Setelah berbunga, malai dipisahkan dari tanaman induknya ketika masih terbungkus di dalam kelopak daun bendera, atau minimal 50% populasi mikrospora di dalam antera sudah berada pada tahap uninukleat tengah (*mid-uninucleate*) hingga uninukleat akhir (*late-uninucleate*). Tahap perkembangan mikrospora diamati mengikuti prosedur Suaib *et al.* (2006; 2007) yang dimodifikasi. Malai yang memenuhi kriteria disterilisasi, kemudian antera diisolasi menggunakan pinset berujung runcing.

Sekitar 100-120 antera (20 bulir padi, 6 antera per bulir) pada setiap varietas tanaman donor, diinkubasikan di dalam masing-masing 5 buah *petridish* steril berukuran 3.5 cm yang telah berisi 2 mL medium B. Medium B terdiri dari: 20 mM L<sup>-1</sup> KCl, 1 mM L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 1 mM L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 1 mM L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dan 0,4 mM L<sup>-1</sup> Manitol pada pH 7. Semua prosedur di atas dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* (LAF) mengikuti cara Suaib *et al.* (2006; 2007) yang dimodifikasi. *Petridish* yang telah berisi antera disegel dengan *parafilm* kemudian diinkubasikan di dalam inkubator pada suhu 33 °C selama 0 hari (D0), 2 hari (D2), 4 hari (D4), dan 7 hari (D7) dalam kondisi gelap. Isolasi mikrospora dari antera yang telah mendapat perlakuan cekaman, dan tanpa perlakuan cekaman dilakukan dengan menggunakan pengaduk magnet (*magnetic stirrer*). Dilanjutkan dengan penyaringan mikrospora ke dalam tabung *centrifuge* berukuran 10 mL menggunakan penyaring nilon berukuran 60 µm, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1,000 rpm selama 5 menit. Larutan dan kotoran pada permukaan atas endapan mikrospora dibuang, kemudian diganti dengan larutan medium kultur dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 1,000 rpm selama 5 menit.

Pengamatan tahap perkembangan mikrospora setelah perlakuan cekaman dilakukan dengan urutan kegiatan sebagai berikut. Antera yang telah diinkubasi atau antera yang tidak diinkubasi (perlakuan D0), difiksasi di dalam larutan Carnoy I, yang terdiri dari (v/v): 3 bagian etanol absolut : 1 bagian asam asetat glasial (Sharma dan Sharma, 1980) selama 24 jam, kemudian antera dicuci dengan alkohol 70% melalui sentrifugasi hingga aroma fiksator hilang, selanjutnya diwarnai dengan pewarna inti mikrospora *acetocarmine* 0.8%. Setelah pewarnaan (minimal 2 jam pada suhu kamar atau 24 jam pada suhu 4 °C), mikrospora diletakkan di atas gelas objek yang telah ditetesi 1-2 tetes 0.8% *acetocarmine*, kemudian diamati menggunakan mikroskop *inverted* dan dibuat fotonya menggunakan kamera Nikon *Coolpix* 5000.

Induksi kalus atau embrio dari mikrospora embriogenik hasil perlakuan cekaman dilakukan di dalam *petridish* berukuran 3.5 cm yang berisi medium dasar induksi kalus atau embrio, MO-19 (Raina dan Irfan, 1998), pada kepadatan 4 x 10<sup>4</sup> sebanyak 4 mL. Medium MO-19 terdiri dari (mg L<sup>-1</sup>): KNO<sub>3</sub> = 3.101; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 540; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 264; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 370; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O = 440; KI = 0.8; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> = 6.2; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O = 22.3; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 8.6;

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O = 0.25; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O = 0.025; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O = 0.025; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 27.8; Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O = 37.3; *Myo-Inositol* = 100; *Nicotinic acid* = 2.5; *Pyridoxine-HCl* = 2.5; *Thiamine-HCl* = 1.0; *Glycine* = 2.0, dan *Sucrose* = 40.000. Masing-masing *petridish* diisolasi dengan *parafilm*, kemudian diinkubasikan pada suhu 25 °C dalam kondisi gelap hingga terbentuknya kalus atau embrio mikrospora. Setiap perlakuan diulang minimal tiga kali, dengan satu *petridish* sebagai satu ulangan.

Variabel penelitian meliputi data persentase: (1) mikrospora embriogenik, yaitu mikrospora viabel yang memiliki morfologi sitoplasma bersekat-sekat, (2) mikrospora binukleat simetris, yaitu mikrospora yang telah mengalami pembelahan inti menjadi dua secara simetris, (3) mikrospora multinukleat, yaitu mikrospora yang telah mengalami beberapa kali pembelahan inti sehingga intinya semakin banyak dan ukurannya semakin besar tetapi selaput luar (*exine*) mikrospora masih utuh, dan (4) kalus mikrospora, yaitu mikrospora multinukleat tanpa *exine* dengan struktur sel yang tidak terspesialisasi, atau embrio mikrospora, yaitu mikrospora multinukleat tanpa *exine* dengan struktur sel yang sudah terspesialisasi minimal berada pada fase globular.

Jumlah mikrospora embriogenik, mikrospora binukleat simetris, mikrospora multinukleat, dan kalus atau embrio mikrospora serta mikrospora viabel non-embriogenik dan mikrospora yang telah mengalami plasmolisis, dihitung hingga mencapai 300 mikrospora pada setiap pengamatan atau setiap *petridish*. Penghitungan dilakukan pada lima bidang pandang mikroskop *inverted*, yaitu: atas, bawah, kiri, kanan, dan tengah, dan setiap pengamatan diulang tiga kali atau tiga *petridish*. Data pengamatan dalam bentuk persentase kemudian dihitung nilai rata-rata dan dianalisis menggunakan ANOVA. Penentuan perlakuan yang lebih baik dari perlakuan lainnya dilakukan dengan uji *t-Fisher* (LSD Fisher) pada tingkat nyata 95%. Semua teknik analisis data di atas mengikuti prosedur Steel dan Torrie (1960).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa morfologi malai untuk ketiga varietas yang mengandung mikrospora > 50% pada tahap *mid-* hingga *late-uninucleate* adalah ketika daun bendera telah berada setinggi 5-10 cm di atas lidah (*auricle*) daun terakhir. Tidak diperoleh embrio mikrospora secara langsung (*direct embryogenesis*) pada penelitian ini karena semua mikrospora hanya berhasil membentuk kalus mikrospora yang harus dikulturkan lagi untuk menghasilkan kalus embriogenik dan *plantlet*.

Pembentukan kalus mikrospora yang optimal pada tanaman padi ladang lokal berantusiasian asal Kendari, dimulai dari perubahan mikrospora viabel (Gambar 1A). Inkubasi antera di dalam medium B pada suhu 33 °C dalam kondisi gelap selama 4 hari, mikrospora viabel berubah menjadi mikrospora embriogenik (Gambar 1B<sub>1</sub>) dan mikrospora non-viabel (Gambar 1B<sub>2</sub>) serta non-embriogenik tetapi tetap viabel (selain mikrospora 1B<sub>1</sub> dan 1B<sub>2</sub>). Mikrospora embriogenik (Gambar 1C) dikulturkan di dalam medium induksi embrio MO-19, pada suhu 25 °C, dan kondisi gelap

selama 21-30 hari pada kepadatan  $4 \times 10^4$ , berubah menjadi prokalus (Gambar 1D) dengan pola pertumbuhan sel-sel yang tidak terspesialisasi, dan kalus (Gambar 1E) sebagai kelanjutan dari perkembangan prokalus.

Analisis varian persentase mikrospora embriogenik, mikrospora binukleat simetris, mikrospora multinukleat, dan kalus mikrospora menurut perlakuan varietas dan perlakuan lama cekaman, menunjukkan bahwa semua perlakuan varietas dan perlakuan lama cekaman berpengaruh ( $0,05 < P < 0,01$ ) terhadap semua variabel yang diamati. Hasil pengujian perbedaan rerata masing-masing variabel menurut perlakuan varietas dengan uji *t-Fisher* (Tabel 1) menunjukkan bahwa terdapat minimal satu pasangan perlakuan varietas yang berbeda nyata bagi rerata persentase semua variabel yang diamati. Rerata persentase semua variabel pengamatan tertinggi dicapai pada varietas Pae Loio dan berbeda nyata dengan varietas Pae Ikulaku dan Paedai Meeto.

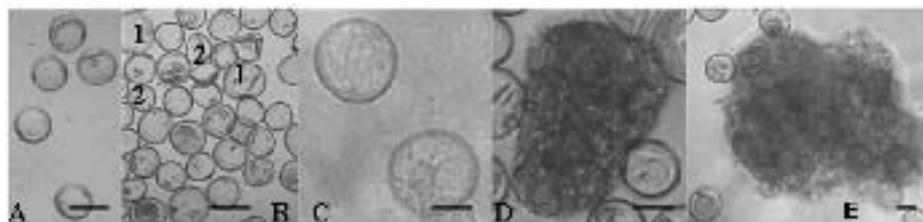
Dengan demikian, Pae Loio adalah varietas yang paling responsif terhadap perlakuan inkubasi antera di dalam medium B pada suhu 33 °C dalam kondisi gelap, dan induksi embrio mikrospora di dalam medium MO-19 pada suhu 25 °C dalam kondisi gelap. Hal ini berarti bahwa di antara varietas padi ladang lokal berantiosianin asal Kendari, terdapat perbedaan genetik yang menentukan level respon terhadap perlakuan cekaman antera di dalam medium B, dan gen-gen yang menentukan level respon terhadap pembentukan kalus mikrospora. Fenomena serupa pernah dilaporkan oleh Forster *et al.* (2007) dan Bagheri *et al.* (2009) bahwa karena adanya perbedaan varietas di dalam spesies yang sama, akan menunjukkan perbedaan respon terhadap kultur antera atau kultur mikrospora.

Selain respon varietas Pae Loio yang tinggi terhadap kultur mikrospora, juga nampak konsistennya nilai rerata persentase semua variabel yang dicapai. Sementara itu, dua

varietas lainnya menunjukkan respon yang lebih rendah dan tidak konsisten (Tabel 1). Tidak konsistennya rerata persentase semua variabel yang dicapai pada dua varietas padi lainnya (Pae Ikulaku dan Paedai Meeto) merupakan fenomena umum yang terjadi pada kultur mikrospora berbagai spesies dan varietas tanaman budidaya. Hal ini juga pernah dilaporkan oleh Supena *et al.* (2006), dan Füredi *et al.* (2011) bahwa rerata persentase mikrospora embriogenik yang tinggi berturut-turut pada tanaman cabai dan jagung menghasilkan embrio mikrospora yang tinggi, akan tetapi dengan jumlah embrio yang tinggi tidak otomatis menggambarkan hubungan yang linier dengan pembentukan *plantlet* yang tinggi pada akhir penelitian.

Perlakuan cekaman yang diberikan dengan cara inkubasi antera pada suhu 33 °C selama 4 hari menghasilkan rerata persentase semua variabel yang tertinggi dan berbeda nyata dengan lama perlakuan lainnya (Tabel 2). Persentase rerata varietas dan rerata perlakuan lama inkubasi antera di dalam medium B pada suhu 33 °C menunjukkan besaran yang rendah ( $< 50\%$ ) bagi hampir semua variabel yang diamati (Tabel 1 dan 2). Hanya variabel mikrospora binukleat simetris varietas Pae Loio yang mencapai rerata persentase  $> 50\%$  (Tabel 1).

Perlakuan cekaman antera di dalam medium B pada suhu 33 °C selama 4 hari kondisi gelap juga menunjukkan kekonsistennya terhadap rerata persentase mikrospora embriogenik yang lebih tinggi untuk ketiga varietas jika dibandingkan dengan inkubasi selama 2 dan 7 hari (Tabel 2). Inkubasi selama 4 hari mampu mengalihkan rute perkembangan mikrospora normal yang harus membentuk tepung sari fungsional ke arah perkembangan abnormal membentuk mikrospora embriogenik sebagai prasyarat pembentukan kalus atau embrio mikrospora secara optimal. Fenomena ini sesuai uraian Bagheri *et al.* (2009) bahwa



Gambar 1. Proses terbentuknya kalus mikrospora dari mikrospora viabel (A), membentuk mikrospora embriogenik (B1) dan mikrospora non-embriogenik (B2). Mikrospora embriogenik (C) berdiferensiasi membentuk pro-kalus mikrospora (D), dan akhirnya menjadi kalus mikrospora (E); Bar A-E = 50 µm

Tabel 1. Hasil uji perbedaan rerata variabel menurut varietas

Varietas	Persentase mikrospora			Persentase embrio mikrospora
	Embriogenik	Binukleat simetris	Multinukleat	
Pae Ikulaku	19.30b	47.08b	25.17a	4.54b
Paedai Meeto	23.15b	40.70c	21.07b	6.79b
Pae Loio	28.00a	56.46a	28.71a	11.92a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji LSD-Fisher pada  $\alpha = 0.05$

Tabel 2. Perbedaan rerata variabel menurut pra-perlakuan lama (hari) inkubasi antera pada suhu 33 °C

Lama inkubasi	Persentase mikrospora			Persentase embrio mikrospora
	Embriogenik	Binukleat simetris	Multinukleat	
0 hari	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c
2 hari 33 °C	22.28b	24.16b	22.53b	5.46bc
4 hari 33 °C	47.09a	43.80a	48.06a	14.82a
7 hari 33 °C	24.57b	25.46b	26.28b	9.06b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji LSD-Fisher pada  $\alpha = 0.05$

akibat perlakuan cekaman suhu tinggi pada antera yang mengandung mikrospora uninukleat akhir dan binukleat awal akan merubah orientasi perkembangan kedua macam mikrospora dari jalur normal gametofitik ke jalur sporofitik. Meskipun inkubasi selama 2 dan 7 hari juga mampu menghasilkan mikrospora embriogenik akan tetapi frekuensinya masih rendah. Perlakuan inkubasi antera pada suhu 33 °C selama 2 hari belum mampu mendorong secara optimal semua mikrospora potensial untuk berkembang ke arah sporofitik, sedangkan inkubasi selama 7 hari menyebabkan banyak mikrospora embriogenik yang mati sebagai konsekuensi negatif deraan suhu tinggi yang terlalu lama. Pernyataan di atas sesuai dengan temuan Indrianto *et al.* (2001) bahwa perlakuan inkubasi antera pada suhu tinggi (33 °C) selama 7 hari bagi tanaman gandum menyebabkan rendahnya mikrospora embriogenik dan kalus mikrospora.

Rerata persentase mikrospora embriogenik, mikrospora binukleat simetris, mikrospora multinukleat, dan kalus mikrospora menunjukkan frekuensi yang tidak konsisten bagi Pae Ikulaku dan Paedai Meeto untuk semua perlakuan lama inkubasi antera di dalam medium B dan inkubasi mikrospora embriogenik di dalam medium MO-

19. Akan tetapi, rerata persentase semua variabel di atas menunjukkan frekuensi yang konsisten bagi Pae Loio untuk ke-4 lama waktu inkubasi antera di dalam medium B dan inkubasi mikrospora embriogenik di dalam medium MO-19 (Tabel 3). Adanya perbedaan konsistensi di atas, selain disebabkan oleh perbedaan larik genetik (*genetic array*) atau komposisi genetik masing-masing varietas, juga disebabkan oleh adanya perbedaan status fisiologi (*physiological state*) tanaman. Hal tersebut sejalan dengan uraian Forster *et al.* (2007) bahwa dengan adanya perbedaan status fisiologi tanaman dapat menyebabkan inkonsistensinya hasil kultur mikrospora yang dicapai.

Dengan demikian, kultur mikrospora tanaman padi ladang lokal Kendari harus mencermati: (1) penggunaan malai dengan daun bendera telah berada sepanjang 5-10 cm di atas *auricle* daun terakhir; (2) antera yang mengandung paling sedikit 50% mikrospora berada pada fase perkembangan uninukleat tengah dan uninukleat akhir, diinduksi di dalam medium B untuk membentuk mikrospora embriogenik; dan (3) kalus mikrospora dapat dihasilkan dengan mengkulturkan mikrospora embriogenik di dalam medium MO-19 pada suhu 25 °C kondisi gelap.

Tabel 3. Rerata persentase mikrospora embriogenik, mikrospora binukleat simetris, mikrospora multinukleat, dan persentase embrio mikrospora menurut varietas dan lama inkubasi antera di dalam medium B dan di dalam medium MO-19

Varietas	Lama inkubasi antera	Persentase mikrospora			Persentase embrio mikrospora
		Embriogenik	Binukleat simetris	Multinukleat	
Pae Ikulaku	0 hari	0.00	0.00	0.00	0.00
	2 hari	18.37	15.07	21.27	5.27
	4 hari	49.60	29.23	38.10	10.30
	7 hari	24.63	18.50	20.70	9.10
Paedai Meeto	0 hari	0.00	0.00	0.00	0.00
	2 hari	13.20	19.50	18.23	3.00
	4 hari	42.53	39.67	51.20	8.23
	7 hari	21.47	29.13	27.57	5.93
Pae Loio	0 hari	0.00	0.00	0.00	0.00
	2 hari	35.27	37.90	28.10	8.10
	4 hari	49.13	62.50	54.87	25.93
	7 hari	27.60	28.73	30.56	12.13

Keterangan: Setiap perlakuan lama inkubasi antera diulang 3 kali

## KESIMPULAN

Kultur mikrospora pada beberapa kultivar padi ladang lokal berantosianin asal Kendari dapat menghasilkan kalus mikrospora, dan pembentukan mikrospora embriogenik yang optimal pada varietas Pae Loio dapat dicapai dengan menginkubasikan antera di dalam medium B pada suhu 33 °C selama 4 hari dalam kondisi gelap, dan kalus mikrospora dapat dihasilkan dengan mengkulturkan mikrospora embriogenik di dalam medium MO-19 pada suhu 25 °C dalam kondisi gelap hingga 30 hari.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dirjen DIKTI karena penelitian ini dapat dilaksanakan dengan menggunakan sebagian dari dana Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2009 dengan kontrak nomor: 76-3/PK-UPT/UNHALU/2009.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bagheri, N., N. Babaeian-Jelodar, A. Ghanbari. 2009. Evaluation of effective factors in anther culture of Iranian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Biharean Biologist* 3:117-122.
- Custers, J.B.M., J.H.G. Cordewener, Y. Nollen, J.J.M. Dons, M.M. Van Lookeren Campagne. 1994. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 13:267-271.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnoor, I.H. Soemantri. 2007. Regenerasi tanaman pada kultur antera padi: pengaruh persilangan dan aplikasi putresin. *J. Agron. Indonesia* 35:68-74.
- Forster, B.P., E. Heberle-Bors, K.J. Kasha, A. Touraev. 2007. The resurgence of haploid in higher plants. *Trends Plant Sci.* 12:368-375.
- Füredi, P.K.F., H. Ambrus, B. Barnabás. 2011. The effect of n-butanol and 2-amino-ethanol on the *in vitro* androgenesis of maize. *Acta Biol. Szegediensis* 55:77-78.
- Herawati, R., B.S. Purwoko, N. Khumaida, I.S. Dewi, B. Abdullah. 2008. Pembentukan galur haploid ganda padi gogo dengan sifat-sifat tipe baru melalui kultur antera. *J. Agron. Indonesia* 36:181-187.
- Indrianto, A., I. Barinova, A. Touraev, E. Heberle-Bors. 2001. Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212:163-174.
- Kyo, M., H. Harada, 1986. Control of the development pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta* 168:427-432.
- Raina S.K., S.T. Irfan. 1998. High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. *Plant Cell Rep.* 17:957-962.
- Reynolds, T.L. 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 33:1-10.
- Sharma, A.K., A. Sharma. 1980. *Chromosome Techniques Theory and Practice*, 3<sup>rd</sup> ed. Butterworths, London.
- Steel, R.G.D., J.H. Torrie. 1960. *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill, New York.
- Suaib, A. Indrianto, P.D.N. Mirzawan, W. Mangoendidjojo. 2006. Viabilitas mikrospora tanaman tebu (*Saccharum* spp.) klon POJ3025 pada suhu dan lama inkubasi bulir yang berbeda di dalam medium B dan Mannitol untuk pemuliaan haploid secara *in vitro*. *Habitat* 17:293-304.
- Suaib, P.D.N. Mirzawan, W. Mangoendidjojo, A. Indrianto. 2007. Proporsi mikrospora uninukleat pada empat klon tebu (*Saccharum* spp.). *Hayati* 12:145-152.
- Supena, E.D.J., S. Suharsono, E. Jacobsen, J.B.M. Custers, 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot peppers (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Rep.* 25:1-10.
- Tuncer, B., R. Yanmaz. 2011. Induction of microspore embryogenesis in ornamental kale by gamma irradiation and high temperature stress. *Asian J. Biotechnol.* 3:415-421.
- Wang, M., S. van Bergen, B. van Duijn. 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol.* 124:523-530.