

Kajian Pendahuluan Perbanyak Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Melalui Kultur Antera dan Mikrospora Secara *in vitro*

Preliminary Study on Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Propagation Via In Vitro Anther and Microspore Culture

Suaib^{1*)}, Makmur Jaya Arma², Norma Arif²

¹Fakultas Pertanian Universitas Halu Oleo Kendari, Sulawesi Tenggara

²Fakultas Pertanian Universitas Halu Oleo, Kendari Sultra

^{*)}Penulis untuk korespondensi: Tel. +6204013196058

Email.suaib_06@yahoo.co.id

ABSTRACT

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is one of many kinds of a small tree that could be growing and producing in the marginal land. This plant maybe used as groundwater table and suboptimal land conservations, and seed production for many significances. Propagating by cuttings and seedlings are commonly practiced, but these techniques are needed more plant materials as donor plant and wide area of nursery, so the alternative technique have to be considered. The use of *in vitro* anthers and microspore cultures will an effective and promising way to solve above problems. The morphological features of flower that contain in the high frequency of mid- to late-uninucleate microspores, and the pretreatment of anthers and microspores were variables observed. Observation of the flowers morphology and the *in vitro* incubation procedures were prepared in standard procedure commonly used. Anthers and microspores were incubated onto B medium (Kyo and Harada, 1986) at 4, 25, and 33°C for 0, 2, 4, and 7 days in darkness and sterile conditions to induce microspore embryogenic. Result of the research showed that the length of the flowers must be in the range of 2 to 3 mm, in which such anthers were containing the yellowish, and were bearing more than 80% of microspores in the mid- to late-uninucleate stages. Amount 30 % of microspores were develop into the embryogenic stage after cultured onto B medium at 33°C for four days.

Key words: anther, microspore, *in vitro* propagation, marginal land, physic nut

ABSTRAK

Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) adalah termasuk tumbuhan pohon pendek yang dapat tumbuh dan berproduksi dengan baik padalahan marginal. Dengan demikian, tanaman jarak pagar dapat digunakan untuk tujuan konservasi air tanah dan lahan suboptimal, dan untuk produksi biji bagi berbagai kegunaan. Lazimnya, perbanyak tanaman dilakukan dengan setek batang dan bibit dari benih, tetapi teknik ini membutuhkan tanaman induk yang banyak dan kebun induk yang luas, sehingga perlu dipertimbangkan metode alternatif lainnya. Penggunaan budidaya antera dan mikrospora secara *in vitro* menjadi teknik yang efektif dan menjanjikan untuk memecahkan masalah di atas. Ciri morfologi bunga yang mengandung mikrospora satu inti tengah hingga satu inti akhir pada frekuensi yang tinggi dan praperlakuan antera dan mikrospora sebelum dikulturkan adalah variabel pengamatan dalam penelitian ini. Pengamatan morfologi bunga, dan inkubasi antera dan mikrospora dilakukan sesuai prosedur umum. Khusus untuk praperlakuan antera dan mikrospora, keduanya diinkubasikan pada medium B (Kyo

dan Harada, 1986) pada suhu 4, 25, dan 33°C selama 0, 2, 4, dan 7 hari kondisi gelap dan sucipatogen hingga terbentuknya mikrospora embriogenik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bunga harus berukuran 2 – 3 mm dan anteranya berwarna kekuningan yang mengandung lebih dari 80% mikrospora berinti satu tengah dan akhir. Sekitar 30% mikrosporamemasuki tahap mikrospora embriogeniksetelah diinkubasikan padamedium B pada suhu 33°C selama 4 hari.

Kata kunci: anthera, jarak pagar, lahan marginal, mikrospora, perbanyakan *in vitro*.

PENDAHULUAN

Pusat Penelitian Tanah dan Agroklimat, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian, 2005 melaporkan bahwa di Indonesia terdapat 52,5 juta hektar lahan kritis. Pulau Jawa dan Bali seluas 7,1 juta hektar, pulau Sumatera sekitar 4,8 juta hektar, pulau Kalimantan sekitar 7,4 juta hektar, pulau Sulawesi sekitar 5,1 juta hektar, pulau Maluku dan Nusa Tenggara sekitar 6,2 juta hektar, dan pulau Papua (Papua Barat dan Papua) sekitar 11,8 juta hektar (Anonim, 2013). Luasan ini diperkirakan semakin bertambah akibat semakin banyaknya faktor-faktor pemicu terbentuknya lahan marginal termasuk semakin maraknya pembukaan lahan produktif untuk kegiatan penambangan, baik pada skala pertambangan rakyat maupun pada skala pertambangan korporasi. Dari fenomena ini ada prediksi yang menyatakan bahwa hingga tahun 2013 yang lalu bisa mencapai 90 juta hektar (Kompas.com, 2013).

Awalnya, tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) hanya digunakan sebagai pembatas antara kebun petani, baik di Indonesia maupun di luar negeri (Helller, 1996). Namun seiring dengan perkembangan penelitian yang intensif, tanaman ini memberi banyak manfaat mulai dari aspek produksi dan manfaat hasilnya hingga dalam konservasi lahan-lahan non-produktif. Beberapa peneliti melaporkan bahwa lahan kritis atau lahan marginal termasuk lahan bekas penambangan dapat direhabilitasi dengan metode fitoteknik menggunakan tanaman jarak pagar. Mulyani *et al.*, (2006) dan Mulyani dan Las (2008) melaporkan bahwa penggunaan tanaman jarak pagar bagi budidaya pada lahan kritis di Indonesia mempunyai prospek yang baik.

Di belahan bumi lainnya, juga dilaporkan bahwa selain sebagai penghasil minyak non-fosil “biofuel”, tanaman jarak pagar juga cocok untuk budidaya pada lahan kritis yang terletak di daerah tropis hingga sub tropis (van der Putten *et al.* 2010). Fu *et al.* (2014) melaporkan bahwa tanaman jarak pagar sangat cocok pada lahan marginal karena tidak memerlukan banyak hara untuk mempertahankan pertumbuhannya. Bahkan pada lahan marginal yang dibatasi oleh kehadiran logam-logam berat seperti: Al, Fe, Cr, Mn, Ar, Zn, Cd, dan Pb, tanaman jarak pagar masih dapat tumbuh dan berproduksi karena kemampuannya mengakumulasi “bioaccumulation” logam-logam berat tersebut. Dengan demikian tanaman ini dapat digunakan sebagai tanaman remediasi “phyto-remediation” bagi logam-logam berat pada lahan yang telah terkontaminasi selain lahan marginal (Juwarkar *et al.*, 2008; Kumaret *al.*, 2008; Mangkoedihardjo dan Surahmida, 2008; Mangkoedihardjo *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2009).

Lazimnya, perbanyakan tanaman jarak pagar selama ini adalah dengan menggunakan potongan batang dan budidaya jaringan yang tersusun dari sel-sel meristem tubuh tanaman (somatis) atau perbanyakan secara vegetatif, atau penggunaan bibit dari benih yang dikecambahkan atau perbanyakan secara generatif. Perbanyakan menggunakan potongan batang memerlukan lahan kebun induk yang luas dan tanaman induk yang banyak, sedangkan penggunaan sel-sel meristematis melalui budidaya *in vitro* juga

memiliki keterbatasan jumlah sel-sel sebagai eksplan yang bisa digunakan. Oleh karena itu, pemilihan alternatif metode yang lebih efisien dan efektif menjadi hal yang sangat penting.

Perbanyakan tanaman jarak pagar menggunakan metode budidaya antera dan mikrospora hingga saat ini belum banyak dilakukan. Akan tetapi, jika metode ini berhasil, mempunyai banyak kelebihan jika dibandingkan dengan metode lainnya yang telah disebutkan di atas. Dalam satu tandan "raceme" bunga tanaman jarak terdapat paling sedikit 50 bunga jantan dan dalam satu bunga jantan terdapat 10 antera (anthers) dimana setiap antera terdiri dari dua ruang sari (loculus atau theca). Paling sedikit, terdapat 1.500 butir mikrospora (microspores) setiap "loculus" sehingga dalam satu tandan, jumlah mikrospora adalah $50 \text{ bunga} \times 10 \text{ anthera} \times 2 \text{ loculus} \times 1.500 \text{ butir mikrospora} = 1.500.000$ butir mikrospora. Jumlah sel tunggal di atas sangat besar jika dibandingkan dengan jumlah sel somatis meristematis yang bisa digunakan sebagai eksplan dari setiap pohon tanaman jarak pagar.

Setiap mikrospora dapat berdiferensiasi selama budidaya *in vitro* membentuk mikrospora embriogenik yang selanjutnya berkembang menjadi embrio, dan satu embrio menghasilkan satu tanaman haploid yang tidak bisa menghasilkan biji (steril) sehingga masih harus digandakan kromosomnya menjadi tanaman haploid ganda (doubled haploid). Oleh karena itu, induksi mikrospora secara *in vitro* menjadi mikrospora embriogenik merupakan langkah paling awal yang harus diteliti keberhasilannya karena tanpa mikrospora embriogenik, tidak mungkin bisa diperoleh embrio, "plantlet", dan tanaman dewasa.

Hasil penelitian pendahuluan yang menggunakan antera dan mikrospora dalam menghasilkan mikrospora embriogenik pada tanaman jarak pagar menjadi pokok bahasan dalam makalah hasil penelitian ini.

BAHAN DAN METODE

Penanaman Tanaman Donor. Sepanjang 20-30 cm potongan batang, ditanam di dalam ember plastik berdiameter 30 cm yang berisi medium tanaman tanah lapisan atas dan pupuk kandang dengan perbandingan yang sama. Setelah tumbuh, tanaman dipelihara hingga berbunga dengan pemberian pupuk sumber N, P, dan K berupa Urea, TSP, dan KCl, berturut-turut dengan dosis 200, 100, dan 100 kg ha⁻¹. Penyiraman medium tumbuh tanaman dilakukan secara berkala sesuai kebutuhan, dan pencegahan pengganggu dengan pestisida.

Penetapan Ciri Morfologi Bunga. Ciri morfologi bunga yang diukur adalah diameter dan panjang bunga. Antera dikeluarkan dari dalam bunga dengan menggunakan sepasang pinset berujung runcing, kemudian diletakkan di atas "microscope slides" yang telah ditetesi larutan 3% sukrosa. Mikrospora dikeluarkan dari dalam antera dengan membelah dinding antera, kotoran berupa serpihan dinding antera dibuang kemudian ditutup dengan "coverslides". Tahap perkembangan mikrospora diamati dengan mikroskop cahaya dalam dua kategori, yaitu: (1) mikrospora berinti satu tengah, dan (2), mikrospora berinti dua akhir, mengacu pada penjelasan Zhang *et al.*, (2005) dan Gonzalez dan Jouve (2005).

Sterilisasi Bunga dan Isolasi Antera. Ciri morfologi bunga yang mengandung sebagian besar mikrospora pada tahap berinti satu tengah hingga berinti satu akhir disterilisasi secara kimiawi, kemudian mikrospora diisolasi mengikuti prosedur Suaibet *al.* (2008) yang dimodifikasi.

Pembuatan Media Inkubasi. Media inkubasi antera yang digunakan adalah medium B (Kyo dan Harada, 1986) dan medium Mannitol (Kasha *et al.*, 2001). Cara pembuatan media inkubasi antera mengikuti prosedur masing-masing medium. Keasaman medium B atau Mannitol diatur pada pH 7.0 sebelum disterilisasi dengan “autoclave”.

Inkubasi Antera. Sepuluh antera diletakkan di dalam masing-masing 27 buah cawan petri (petri dish) steril berukuran 50 ml yang berisi 10 ml medium B atau Mannitol. Tutup “petri dish” dengan kapas dan aluminium foil yang telah disterilkan lalu disegel dengan lembaran plastik tipis. Semua prosedur dilakukan pada kondisi aseptik (sterile) di atas meja “Laminar Air Flow Cabinet, LAFC”. Dari 27 buah “petri dish” untuk masing-masing medium B dan Mannitol, 3 “petri dish” untuk masing-masing perlakuan suhu 4, 25, dan 33°C, dan 3 “petri dish” lainnya untuk masing-masing perlakuan lama inkubasi antera, yaitu: 2, 4, dan 7 hari.

Isolasi, Pewarnaan Inti, dan Pemeriksaan Status Embriogenesis Mikrospora. Masing-masing dua antera yang telah mendapat perlakuan inkubasi dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml larutan fiksasi Carnoy I (Sharma dan Sharma, 1980) selama 30 menit. Selanjutnya ke dalam tabung tadi ditambahkan larutan “ferric chloride” kemudian diinkubasikan hingga 24 jam. Larutan fiksatif dan “ferric chloride” diganti dengan alkohol 70%, kemudian status embriogenesis mikrospora diperiksa atau disimpan pada lemari pendingin pada suhu 4°C hingga dilakukan pemeriksaan.

Pemeriksaan status embriogenesis mikrospora dilakukan dengan meletakkan antera di atas “glass slide” yang telah ditetesi larutan pewarna inti “acetic carmine”. Mikrospora dikeluarkan dengan membelah antera menggunakan sepasang pinset berujung runcing. Kotoran berupa serpihan dinding antera dibuang, kemudian ditutup dengan “coverslide”. Dengan melewati sediaan beberapa detik di atas lampu spiritus/bunsen, sediaan diamati menggunakan mikroskop cahaya dan fotonya dibuat menggunakan kamera digital Nikon CoolPix S3500.

Status embriogenesis mikrospora ditetapkan dengan dua kriteria, yaitu: (1) mikrospora embriogenik, yaitu mikrospora yang telah melakukan pembelahan minimal satu kali, “bicellular-symmetric” dan atau beberapa kali “multicellular”, dan (2) mikrospora non-embriogenik, yaitu mikrospora yang tidak mengalami pembelahan inti, plasmolisis, rusak secara fisik, atau memasuki tahap perkembangan gametofitik atau terbentuknya polen atau tepung sari selama inkubasi.

Rancangan Percobaan. Kecuali penanaman tanaman donor antera dan mikrospora, penataan cawan petri dalam percobaan inkubasi antera menggunakan rancangan faktorial dalam pola rancangan acak lengkap (RAL). Dua medium, tiga suhu, dan tiga lama inkubasi antera atau mikrospora dikombinasikan sehingga terdapat 18 kombinasi perlakuan sebagai unit pengamatan, kemudian diulang minimal 5 kali.

Variabel Penelitian. Variabel utama yang diamati pada penelitian ini adalah persentase: (1) mikrospora embriogenik, dan (2) mikrospora non-embriogenik. Perhitungan persentase mikrospora embriogenik mengikuti prosedur sebagai berikut:

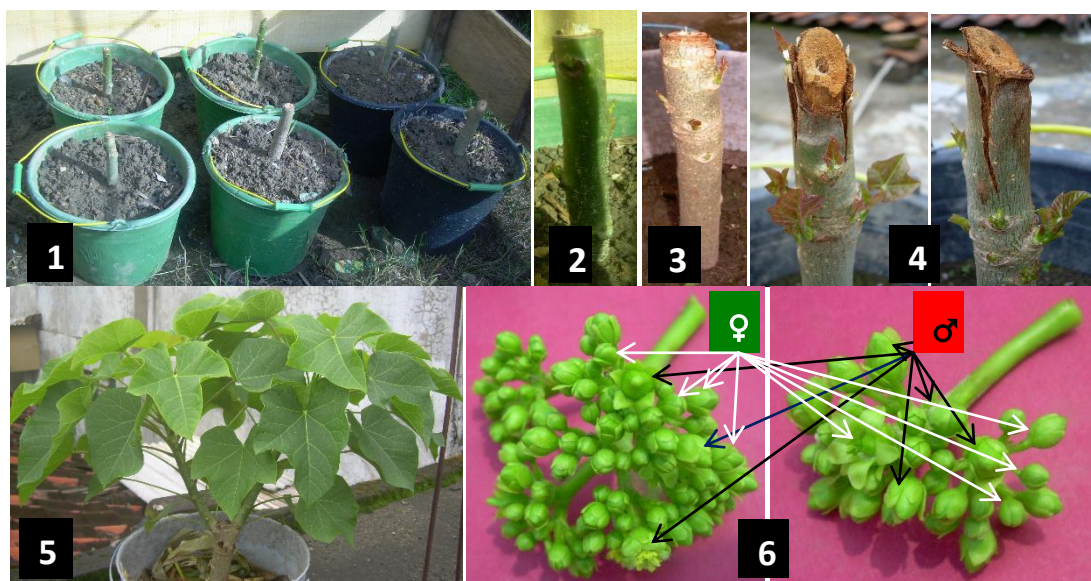
$$\text{Persen Embriogeni k (PE)} = \frac{\text{Jumlah embriogeni k}}{\text{Jumlah embriogeni k + non - embriogeni k}} \times 100 \%$$

Analisis Data. Data hasil pengamatan ditabulasi, kemudian dihitung nilai rerata dan simpangan bakunya kemudian dianalisis secara anova. Perbandingan nilai rerata antar perlakuan dilakukan dengan uji “Duncan’s Multiple Range Test, DMRT” pada taraf kepercayaan 95% sesuai prosedur Steel dan Torrie (1995).

HASIL

Morfologi Bunga

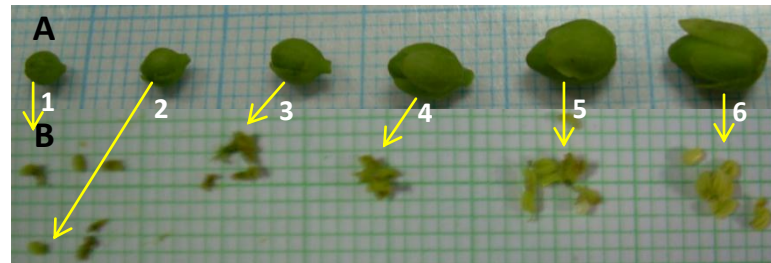
Penampilan pertumbuhan dan perkembangan tanaman dan tandan bunga jarak pagar sumber antera dan mikrospora sebagai eksplan, disajikan pada Gambar 1. Terlihat bahwa tanaman jarak pagar tumbuh cepat dengan baik dan dapat menghasilkan tandan "raceme" dengan jumlah bunga yang banyak. Dalam satu tandan terdapat dua macam bunga berdasarkan jenis kelaminnya, yaitu bunga berkelamin jantan dan bunga berkelamin betina. Bunga yang berkelamin jantan memiliki kepala sari dengan 10 buah antera dan tidak memiliki putik, sedangkan bunga betina hanya memiliki putik dan tidak memiliki kepala sari. Hanya bunga jantan yang menjadi sumber antera dan mikrospora sebagai eksplan dalam penelitian ini.



Gambar 1. Pertumbuhan dan perkembangan tanaman dan bunga jarak pagar sebagai sumber eksplan. Atas: nomor 1, sesaat setelah penanaman potongan batang; nomor 2, batang berwarna hijau mudapun bisa dijadikan bibit; nomor 3 setelah 7 hari penanaman, dan nomor 4 setelah 14 hari penanaman. Bawah: nomor 5, tanaman menjelang berbunga sekitar 2 bulan setelah penanaman, dan nomor 6, tandan bunga yang terdiri dari bunga jantan (♂) ujung panah hitam dan betina (♀) pangkal panah putih.

Pada pengamatan ukuran bunga terlihat bahwa panjang dan lebar bunga hampir mempunyai ukuran yang sama. Berdasarkan ukuran bunga maka diklasifikasikan ke dalam tujuh kelompok dimana kelompok paling kecil yaitu berukuran kurang dari 2 mm (tidak ditampilkan) sedangkan bunga berukuran lebih dari 2 mm ditunjukkan pada Gambar 2. Berdasarkan panjang antera, kelompok bunga paling kecil memiliki ukuran antera kurang dari 1 mm dan mikrospora sebahagian besar berada pada stadia satu inti sangat awal "very early uninucleate microspores" hingga stadium satu inti awal "early uninucleate microspores". Bahkan ukuran bunga seperti ini mengandung mikrospora yang masih berada pada stadium "tetrad" dan memasuki "very early uninucleate microspores". Sementara itu, bunga yang berukuran 2 – 3 mm (Gambar 2 A1 dan A2) memiliki antera (Gambar 2 B1 dan B2) yang kebanyakan mengandung mikrospora berinti satu tengah "mid-uninucleate

microspores” hingga berinti satu akhir “late-uninucleate microspore”. Bunga yang berukuran lebih besar dari 3 mm (Gambar 2 A3 s.d. A6) memiliki antera (Gambar 2 B3 s.d. B6) yang mengandung kebanyakan mikrospora berada pada stadia dua inti awal “early binucleate microspores” hingga dua inti akhir “late binucleate microspore” dan bahkan telah memasuki stadium “trinucleate” atau tepung sari “pollen grains”.



Gambar 2. Penampilan ukuran panjang dan lebar individu bunga (A) dan antera (B) tanaman jarak pagar.

Inti mikrospora melalui teknik pewarnaan tidak dapat ditampilkan dalam laporan ini karena ketidaksempurnaan interaksi antara inti mikrospora dengan “acetic carmin” yang digunakan. Berdasarkan tahap perkembangan mikrospora, frekuensi mikrospora uninukleat tengah dan akhir diperoleh pada bunga dengan lebar dan panjang 2-3 mm (Tabel 1). Bunga yang berukuran panjang dan atau lebar yang kurang dari 2 mm dan lebih dari 3 mm mengandung kurang dari 50% mikrospora berada pada stadia mikrospora uninukleat tengah dan uninukleat akhir. Dengan demikian, bunga yang berukuran 2 – 3 mm adalah bunga yang sesuai bagi pelaksanaan budidaya antera dan mikrospora secara *in vitro*, sedangkan bunga yang berukuran kurang dari 2 mm dan lebih dari 3 mm mengandung mikrospora uninukleat tengah dan akhir yang kurang dari 50%. Kedua rentang ukuran bunga ini tidak sesuai bagi budidaya antera dan mikrospora secara *in vitro* pada tanaman jarak pagar.

Tabel 1. Rerata persentase (%) mikrospora uninukleat tengah dan akhir menurut panjang dan lebar bunga

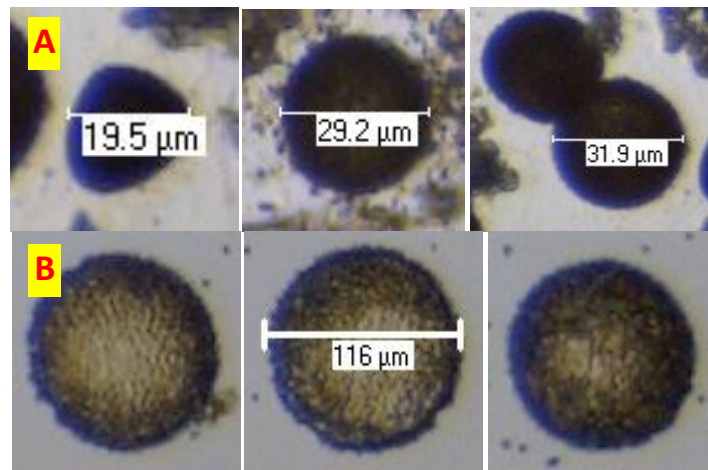
Ulangan*)	Persentase Mikrospora Uninukleat Tengah dan Akhir Menurut Ukuran Panjang dan Lebar Bunga (milimeter)					
	< 2	2 - < 3	3 - < 4	4 - < 5	5 - < 6	6 >
1	20,46	80,68	10,24	2,86	0,00	0,00
2	18,26	89,76	5,83	0,82	0,00	0,00
3	10,36	86,94	4,42	1,84	0,00	0,00
Total	49,08	257,38	20,49	5,52	0,00	0,00
Rerata	16,36	85,79	6,83	1,84	0,00	0,00
Std. Dev.	5,31	4,65	3,04	1,02	0,00	0,00

*) Sepuluh antera setiap ulangan (n = 10) setiap klasifikasi ukuran bunga.

Status Embriogenik Mikrospora

Hasil percobaan inkubasi antera dan mikrospora melalui praperlakuan stres bagi pembentukan mikrospora embriogenik menunjukkan perbedaan ukuran/diameter seperti disajikan pada Gambar 3. Penampilan mikrospora embriogenik setelah mendapat praperlakuan stres menunjukkan perubahan morfologi, yaitu semakin bertambahnya

ukuran mikrospora. Besarnya perubahan ukuran karena bertambahnya volume mikrospora minimal sebesar 100% atau paling kecil dua kali lebih besar dari ukuran mikrospora non-embriogenik atau mikrospora yang belum mendapat praperlakuan stres. Mikrospora non-embriogenik mempunyai ukuran yang lebih kecil yaitu kurang dari 50 μm , sedangkan mikrospora embriogenik berukuran lebih besar dari 50 μm .



Gambar 2. Mikrospora embriogenik dan non-embriogenik setelah mendapat praperlakuan inkubasi antera atau mikrospora. A mikrospora non-embriogenik, dan B mikrospora embriogenik.

Rerata persentase mikrospora embriogenik yang mendapat kombinasi praperlakuan stres suhu, medium starvasi, dan lama inkubasi, disajikan pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan persentase mikrospora embriogenik (Gambar 3B) antara inkubasi antera dan mikrospora menurut *uji-t* pada taraf kepercayaan 95 %. Persentase mikrospora embriogenik tertinggi diperoleh pada perlakuan inkubasi antera dibanding dengan perlakuan inkubasi mikrospora. Demikian juga terdapat perbedaan persentase mikrospora embriogenik pada masing-masing kombinasi perlakuan stres bagi inkubasi antera atau bagi inkubasi mikrospora.

Terdapat perbedaan yang signifikan persentase mikrospora embriogenik antara media starvasi B dan *Mannitol*, baik bagi inkubasi antera maupun mikrospora. Sementara itu, juga diperoleh informasi bahwa lama inkubasi masing-masing antera dan mikrospora menunjukkan perbedaan yang signifikan. Dengan demikian, persentase mikrospora embriogenik tertinggi diperoleh melalui praperlakuan inkubasi antera di dalam medium starvasi B pada suhu 33°C selama empat hari pada kondisi gelap. Namun, bila melihat frekuensi mikrospora embriogenik yang dicapai pada praperlakuan ini masih rendah yaitu kurang dari 32 %, atau hanya 30.93 %.

Tabel 2. Rerata persentase (%) mikrospora embriogenik menurut kombinasi praperlakuan inkubasi antera dan mikrospora di dalam medium starvasi B dan Mannitol pada suhu 4, 25, dan 33°C selama 0, 2, 4, dan 7 hari

Perlakuan Antera	Persentase Embriogenik	Perlakuan Mikrospora	Persentase Embriogenik
B-04-2	12,50 <i>d</i>	B-04-2	4,27 <i>ghi</i>
B-04-4	9,67 <i>ef</i>	B-04-4	4,13 <i>ghi</i>
B-04-7	11,07 <i>de</i>	B-04-7	3,60 <i>gh</i>
B-25-2	8,63 <i>fg</i>	B-25-2	2,27 <i>i</i>
B-25-4	7,87 <i>fg</i>	B-25-4	2,90 <i>hi</i>
B-25-7	7,27 <i>fg</i>	B-25-7	3,60 <i>hi</i>
B-33-2	26,50 <i>b</i>	B-33-2	14,73 <i>c</i>
B-33-4	30,93 <i>a</i>	B-33-4	23,27 <i>a</i>
B-33-7	19,60 <i>c</i>	B-33-7	17,87 <i>b</i>
M-04-2	7,53 <i>fg</i>	M-04-2	6,27 <i>g</i>
M-04-4	7,67 <i>fg</i>	M-04-4	9,40 <i>f</i>
M-04-7	8,40 <i>fg</i>	M-04-7	9,73 <i>f</i>
M-25-2	4,30 <i>h</i>	M-25-2	2,93 <i>hi</i>
M-25-4	5,87 <i>gh</i>	M-25-4	3,73 <i>hi</i>
M-25-7	6,20 <i>gh</i>	M-25-7	4,67 <i>gh</i>
M-33-2	12,87 <i>d</i>	M-33-2	10,67 <i>ef</i>
M-33-4	13,60 <i>d</i>	M-33-4	13,47 <i>cd</i>
M-33-7	11,27 <i>de</i>	M-33-7	12,60 <i>de</i>
Rerata	11,76 <i>r</i>	Rerata	8,42 <i>s</i>

Keterangan: Nilai-nilai yang diikuti dengan huruf yang sama (*a-i*) pada kolom yang sama berbeda tidak signifikan menurut uji *Duncan* pada $\alpha 0.05$, dan nilai yang diikuti oleh huruf yang berbeda (*r-s*) pada baris rerata perlakuan berbeda signifikan menurut uji-*t* pada $\alpha 0.05$.

PEMBAHASAN

Pengamatan morfologi bunga yang mengandung mikrospora uninukleat terbanyak tidak ditentukan oleh panjang rangkaian bunga, tetapi lebih ditentukan oleh panjang dan lebar bunga. Hal ini terlihat dari populasi mikrospora uninukleat yang lebih besar yang sangat berhubungan dengan ukuran bunga, bukan ukuran rangkaian bunga. Bunga dengan lebar dan panjang 2-3 mm, mengandung mikrospora uninukleat tengah dan akhir yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan bunga dengan lebar dan panjang kurang dari 2 mm atau lebih dari 3 mm. Bahkan bunga dengan panjang dan lebar < 2 mm mengandung mikrospora uninukleat awal yang lebih tinggi, sedangkan bunga dengan panjang dan lebar > 3 mm mengandung tepung sari dengan frekuensi yang lebih tinggi (Tabel 1).

Fenomena di atas umumnya telah dilaporkan oleh banyak peneliti atau kelompok peneliti pada berbagai tanaman budidaya. Tanaman-tanaman dimaksud seperti tanaman tembakau (Volcov *et al.*, 2005), *Brassica* (Zhang *et al.*, 2006), kedelai (Rodrigues *et al.*, 2006), tomat (Segui-Semarro dan Nuez, 2007), dan kentang (Panahandeh *et al.*, 2008). Bagi tanaman jarak pagar, selain morfologi bunga berupa panjang dan lebar bunga, umur bunga juga menentukan frekuensi mikrospora uninukleat tengah dan akhir. Semakin tua umur bunga semakin tinggi frekuensi mikrospora pada tahap lebih lanjut atau polen sehingga tidak sesuai untuk digunakan sebagai eksplan bagi penyelenggaraan budidaya antera atau mikrospora secara *in vitro*.

Selain itu, ukuran antera bagi beberapa spesies tanaman juga berhubungan erat dengan fase perkembangan mikrospora. Pada tanaman cabai, ukuran dan warna antera diketahui berpengaruh terhadap fase perkembangan mikrospora (Indrianto *et al.*, 2004; Supena *et al.*, 2006). Indrianto *et al.* (2004) menguraikan bahwa mikrospora tanaman cabai besar pada tahap *tetrad* hanya dijumpai pada kuncup bunga yang berukuran 0,3-0,5 cm. Antera yang berwarna hijau muda, sebagian hijau dan sebagian ungu, akan mengandung mikrospora uninukleat. Setelah bunga berukuran 0,6-0,8 cm dan anteranya berwarna ungu muda, bunga hanya akan mengandung mikrospora binukleat. Dengan demikian, tahap perkembangan mikrospora di dalam antera sangat ditentukan oleh ukuran bunga dan antera, sehingga penggunaan ciri morfologi bunga atau ukuran kuncup merupakan cara yang tepat dalam menentukan tahap perkembangan mikrospora.

Pengaruh praperlakuan stres terhadap pembentukan mikrospora embriogenik telah dilaporkan sebagai suatu upaya yang mempunyai peran sangat menentukan. Berbagai laporan menunjukkan bahwa praperlakuan stres sejumlah kombinasi perlakuan terhadap antera atau mikrospora pada banyak tanaman percobaan merupakan persyaratan penting. Kyo dan Harada (1986), Custers *et al.* (1994), Touraev *et al.* (1996), dan Indrianto *et al.* (2001) melaporkan bahwa mikrospora embriogenik hanya akan diperoleh apabila antera mendapat praperlakuan stres berupa kombinasi medium starvasi B pada suhu 33°C selama 2 hingga 7 hari kondisi gelap.

Kombinasi praperlakuan yang optimal bagi setiap tanaman dalam menghasilkan mikrospora embriogenik pada frekuensi yang paling tinggi menunjukkan perbedaan, utamanya lama inkubasi. Akan tetapi, suhu, medium, dan kondisi inkubasi menunjukkan status yang hampir berlaku umum. Sebagai contoh, penggunaan medium starvasi B nir-nitrogen, suhu 33°C, dan kondisi gelap mensyaratkan bagi kebanyakan budidaya antera dan mikrospora tanaman. Oleh karena itu, penggunaan praperlakuan antera di dalam medium starvasi B suhu 33°C dan kondisi gelap pada penelitian ini memberikan hasil yang lebih baik dari pada paraperlakuan lainnya. Dengan persentase mikrospora embriogenik yang masih rendah (kurang dari 32 %, Tabel 2), mengindikasikan bahwa tanaman jarak pagar merupakan tanaman yang agak bandel, "*recalcitrant*", karena pada tanaman *Brassica* (Supena *et al.*, 2006) dan tanaman *wheat* (Indrianto *et al.*, 2001) dapat menghasilkan mikrospora embriogenik dan embrio mikrospora pada frekuensi lebih dari 50 %.

Analisis varians dan pemisahan rerata perlakuan (Tabel 2) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh praperlakuan terhadap persentase mikrospora embriogenik. Demikian juga, perbedaan antar macam eksplan (anteras dan mikrospora) terhadap kemampuan menghasilkan mikrospora embriogenik menunjukkan perbedaan yang signifikan menurut uji-t *Student* pada taraf kepercayaan 95 %. Sementara itu, juga terdapat perbedaan yang signifikan antara kombinasi perlakuan inkubasi antera atau inkubasi mikrospora menurut uji jarak berganda "*Duncan*" pada taraf kepercayaan 95 %.

Ini berarti pada penelitian ini berhasil mencapai tujuan penelitian yaitu diperolehnya mikrospora embriogenik melalui praperlakuan antera di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 33°C. Inkubasi antera selama 4 hari dalam kondisi gelap menghasilkan mikrospora embriogenik pada frekuensi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lama inkubasi lainnya. Oleh karena itu, perolehan mikrospora embriogenik yang lebih tinggi bagi tanaman jarak pagar pada penelitian ini adalah optimal bagi praperlakuan inkubasi antera di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 33°C selama empat hari kondisi gelap. Dari hasil ini memberi peluang yang besar untuk mendapatkan embrio mikrospora karena embrio mikrospora hanya akan dapat dicapai apabila mikrospora yang dikulturkan adalah mikrospora embriogenik.

KESIMPULAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Morfologi bunga tanaman jarak pagar yang sesuai bagi kultur mikrospora adalah ketika bunga mempunyai panjang dan lebar antara 2-3 mm, dan dengan antera berwarna kuning muda, dan
2. Untuk mendapatkan mikrospora embriogenik yang lebih tinggi diperlukan praperlakuan stres berupa inkubasi antera di dalam medium starvasi B nir-nitrogen pada suhu 33°C selama empat hari kondisi gelap.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rektor Universitas Halu Oleo atas pendanaan penelitian melalui BOPTN Tahun Anggaran 2013/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Agamuthu P, Abioye OP, Aziz AA, 2010. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. *J. Hazard Mater*, 179: 891-4.
- Anonim, 2013. Petunjuk teknis pelaksanaantugas pembantuan kementerian dalam negeri program penanganan lahan kritis dan sumber daya air berbasis masyarakat (PLKSDA-BM) tahun 2013. Lampiran I Kementerian Dalam Negeri Republik Indonesia, 22 hlm.
- Custers JBM, Cordewener JHG, Nollen Y, Dons JJM, Van Lookeren Campagne MM, 1994. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 13: 267-271.
- Fu J, Jiang D, Huang Y, Zhuang D, Ji W, 2014. Evaluating the marginal land resources suitable for developing bioenergy in Asia. *Advances in Meteorology*, Volume 2014: 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/238945>.
- Gonzalez JM, Jouve N, 2005. Microspore development during in vitro androgenesis in triticale. *Biologia Plantarum*, 49(1): 23-28.
- Gonzalez RC, Gonzalez-Chavez MCA, 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ. Pollut*, 144: 84-92.
- Heller J, 1996. Physic Nut, *Jatropha curcas* L. International Plant Genetic Resources Institute, p. 66.
- Indrianto A, Barinova I, Touraev A, Heberle-Bors E, 2001. Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta*, 212: 163-174.
- Indrianto A, Semiarti E, Surifah, 2004. Produksi galur murni melalui induksi embriogenik mikrospora cabai merah dengan stres. *Zuriat*, 15(2): 133-139.
- Jamil S, Abhilash PC, Singh N, Sharma PN, 2009. *Jatropha curcas*: a potential crop for phytoremediation of coal fly ash. *J. Hazard. Mater*, 172: 269-75.
- Juwarkar AA, Yadav SK, Kumar P, Singh SK. 2008. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. *Environ Monit Assess*, 145:7-15.
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR, 2001. An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*, 120:379-385.
- Kompas.com, 12 Februari 2013. Diakses pada tanggal 1 September 2014.

- Kumar GP, Yadav SK, Thawale PR, Singh SK, Juwarkar AA, 2008. Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and azotobacter - a greenhouse study. *Bioresour Technol*, 99: 2078-82.
- Kyo M, Harada H, 1986. Control of the development pathway of tobacco pollenin vitro. *Planta*, 168:427-432.
- Mangkoedihardjo S, Surahmida, 2008. *Jatropha curcas* L. for phytoremediation of lead and cadmium polluted soil. *World. Appl. Sci. J.*, 4: 519-22.
- Mangkoedihardjo S, Ratnawati R, Alfianti N, 2008. Phytoremediation of hexavalent chromium polluted soil using *Pterocarpus indicus* and *Jatropha curcas* L. *World Appl. Sci. J.*, 4:338-42.
- Mulyani A, Agus F, Allelorung D, 2006. Potensi sumberdaya lahan untuk pengembangan jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) di Indonesia. *Jurnal Litbang Pertanian*, 25(4): 130-138.
- Mulyani A, Las I, 2008. Potensi sumberdaya lahan dan optimalisasi pengembangan komoditas penghasil bioenergi di Indonesia. *Jurnal Litbang Pertanian*, 27(1): 31-41.
- Panahandeh J, Valizadeh M, Khosroshahly M, Yermishin AP, Khoei FR, Mahna N, 2008. Microsporogenesis and crossing behavior of a tetraploid, interspecific inter-EBN hybrid potato. *Scientiae Horticulturae*, doi:10.1016/j.scienta.2008.02.006.
- Rodrigues LR, de Camargo-Forte B, Bodanese-Zanettini MH, 2005. Isolation and culture of soybean (*Glycine max*L. Merrill) microspores and pollen grains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4): 537-545.
- Segui-Simarro JM, Nuez F, 2007. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/erl271.
- Sharma AK, Sharma A, 1980. *Chromosome techniques theory and practice*. 3rd ed., London:Butterworths.
- Steel RGD, Torrie JH, 1995. *Principles and procedures of statistics. A Biometrical Approach*. International Student Edition. Koga Kusha:McGraw-Hill Ltd., pp.137-167.
- Suaib, Gusnawaty HS, Darwis, Makmur JA, Muhidin, 2008. Studi kulturin vitro mikrospora tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.). Laporan Tahun I Program Insentif Riset Dasar, kerjasama Kemenristek RI dengan Universitas Halu Oleo (Tidak dipublikasikan).
- Supena EDJ, Muswita W, Suharsono S, Custers JBM, 2006. Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper(*Capsicum annum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 107: 226-232.
- Touraev A, Pfosser M, Vicente O, Heberle-Bors E, 1996. Stress as the major signal controlling the development fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*, 200:144-152.
- van der Putten E, Franken YJ, Nielsen F, de Jongh J, Rijsenbeek W, Beerens P, van Eijck J, Galema T, Groeneveld G, Ansø N, Wijnker M, Adriaans T, Moers P, 2010. *The jatropha handbook, from cultivation to application*. Horsten 15612 AX Eindhoven the Netherlands, p. 172.
- Volkov RA, Irina, Panchuk I, Schöffl F, 2005. Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 57:487-502.
- Wang CH, Tabares E, Ceballos H, Peng Z, Lentini Z, 2006. Development of an in vitro protocol for the production of cassava doubled haploids and its use in breeding. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*.

- Yadav SK, Juwarkar AA, Kumar GP, Thawale PR, Singh SK, Chakrabarti T, 2009. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L. impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresour Technol* 100(46):16-22.
- Zhang Z, Lu Y, Liu X, Feng J, 2005. Nuclear and cell migration during pollen development in rice (*Oryza sativa* L). *Sex Plant Reproduction*, 17: 297-302.
- Zhang SF, Ma CZ, Zhu JC, Wang JP, Wen YC, Fu TD, 2006. Genetic analysis of oil content in *Brassica napus*L. using mixed model of major gene and polygene. *Acta Genetica Sinica*, 33(2): 171-180.