

DETEKSI KERAGAMAN HASIL PERBANYAKAN TANAMAN MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK DENGAN METODA SITOMETRI DAN MOLEKULER

FLOW CYTOMETRY AND MOLECULAR DETECTION ON SOMACLONALE VARIATION OF PLANTS REGENERATED THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS

Taryono*

ABSTRACT

The production of somatic embryo is considered to be the best method of vegetative plant propagation. A great number of seedlings can be produced any time only by simply sowing them, although until now the genetic similarity is indisputed. Cytometry and PCR technique can be used to detect genetic changes that might occur in the cell. They were applied to seedlings of conifer *Larix decidua* produced through somatic embryo. Flow cytometry was found to be able to detect ploidy level of seedlings efficiently and the ploidy level was showed relatively stable. Mutation in the DNA level was detected using PCR fingerprinting. Oligonucleotide M13 (15 bp) can detect easily changes in minisatellite. Changes at the chromosomal level might also take place in somatic embryo derived seedlings.

Keywords: somatic embryogenesis, genetic variability, flow cytometry, PCR, *Larix decidua*

INTISARI

Perbanyakan tanaman secara vegetatif melalui penginduksian embrio somatik diduga merupakan cara terbaik. Bibit dalam jumlah besar dapat dihasilkan setiap waktu hanya dengan mengecambahkan embrio somatik yang telah dimasakkan, namun masalah keseragaman genetik bibit-bibit itu sampai sekarang masih diperdebatkan. Metoda sitometri dan reaksi polimerase berantai (PCR) dapat digunakan untuk mendeteksi kemungkinan perubahan genetik yang terjadi. Untuk itu kedua metoda akan dicoba terhadap bibit-bibit hasil embrio somatik tanaman konifera *Larix decidua*. Metoda sitometri mampu secara cepat mendeteksi tingkat ploidi dari bibit. Tingkat ploidi dari bibit-bibit yang dihasilkan dapat disimpulkan cukup stabil apabila dibandingkan dengan tanaman diploid kontrolnya. Perubahan pada tingkatan urutan DNA secara cepat dapat diketahui dengan PCR. Dengan oligonukleotida M13 perubahan yang terjadi pada minisatelit dengan mudah dapat dideteksi. Perubahan pada tingkat kromosom kemungkinan besar bisa terjadi pada bibit embrio somatik.

Kata kunci : embriogenesis somatik, keragaman genetik, flow sitometri, PCR, *Larix decidua*

PENGANTAR

Terdapat banyak cara untuk memperbanyak tanaman secara vegetatif *in vitro*, tetapi embriogenesis somatik diyakini sebagai cara terbaik (Mavituna & Buyukalaca, 1996). Keunggulan embriogenesis somatik yaitu jaringan meristem akar dan pucuk telah terbentuk pada saat embrio somatik masak (Jain, 1998), bentuk anatomi dan sifatnya serupa dengan embrio sigotik benih biasa. Bibit yang diinginkan dengan mudah dapat dihasilkan hanya dengan mengecambahkan embrio yang masak tersebut.

Apabila embrio somatik dapat dihasilkan melalui penginduksian kalus yang bersifat embriogenik, maka kalus tersebut dapat diperbanyak secara tidak terbatas dan dimasakkan setiap waktu (Merkle, 1995). Taryono (1997) membahas permasalahan yang mungkin dihadapi dari penginduksian sampai bibit dihasilkan khususnya pada tanaman keras dan kemungkinan cara pemecahannya.

Masalah keragaman tanaman hasil perbanyakan *in vitro* sampai saat ini masih sering diperdebatkan (Patnaik *et al.*, 1999). Seandainya

* Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

keragaman itu terjadi. keragaman itu mungkin disebabkan oleh perubahan pada tingkat genom, kromosom atau gen (Fourre *et al.*, 1997) dan dapat dideteksi baik secara morfologi, biokimiawi maupun molekuler (Goto *et al.*, 1998). Perubahan genom yang biasanya terjadi adalah jumlah kromosom (Karp *et al.*, 1987) atau tingkat ploidi (Lee & Phillips, 1988) dan dapat diketahui secara sitologi dengan menduga ukuran genom (Winkelmann *et al.*, 1998) atau dengan menghitung jumlah kromosom (Roth *et al.*, 1997). Sedang perubahan pada urutan DNA dengan mudah dapat dibuktikan secara molekuler menggunakan metoda AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Lin & Kuo, 1996). RFLP (*Random Fragment Length Polymorphism*) (Grant & Shoemaker, 1997) dan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Al-Zahim *et al.*, 1999; De Verno *et al.*, 1999).

Penghitungan jumlah kromosom untuk mengetahui ukuran genom suatu sel tanaman dianggap kurang praktis dan memerlukan banyak tahapan serta waktu (Sari *et al.*, 1999). Metoda flow sitometri (*Flow Cytometry*) dapat mengatasi semua kelemahan dari cara penghitungan jumlah kromosom biasa. Flow sitometri selain merupakan metoda yang cukup cepat dan efisien (Galbraith *et al.*, 1983) juga sangat jitu untuk mendeteksi campuran dari banyak sel yang mempunyai tingkat ploidi berbeda-beda (*polysomaty*) dalam suatu jaringan (Bueno *et al.*, 1996). Dengan metoda flow sitometri, inti sel dalam jumlah yang relatif banyak dapat diduga ukuran genomnya dalam waktu yang relatif singkat dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi (Price & Johnston, 1996).

Di antara ketiga metoda molekuler, barangkali reaksi polimerase berantai (PCR = *Polymerase Chain Reaction*) merupakan metoda yang paling menjanjikan untuk meneliti terjadinya perubahan karena mutasi pada urutan DNA (Rani *et al.*, 1995). Reaksi berantai ini hanya memerlukan DNA dalam jumlah yang relatif sedikit (Piola *et al.*, 1999), tidak memerlukan DNA yang berkualitas (Rafalski *et al.*, 1997), mampu memanen potongan DNA yang urutannya cukup spesifik (D'ovidio *et al.*, 1990), dapat menganalisis sejumlah besar bibit dalam waktu reaksi yang sama (Piola *et al.*, 1999), dapat digunakan untuk mengikuti perubahan DNA dari generasi ke generasi (Chowdari *et al.*, 1998) dan sangat mudah dilaksanakan (Skroch & Nieuhuis, 1995).

Pengamatan terhadap kemungkinan terjadinya perubahan genetik dalam inti sedapat mungkin tidak mematikan tanaman itu sendiri dan metoda flow sitometri serta PCR memenuhi syarat tersebut. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dicoba menggunakan kedua metoda untuk melihat kemungkinan terjadinya keragaman dari hasil perbanyakan tanaman secara in vitro melalui cara embriogenesis somatik tanaman konifera "*Larix decidua*".

BAHAN DAN METODE

Bahan biakan

Embrio somatik (ESM = *Embryo Suspensor Masses*) klon 493 dan 1792 diperoleh dari Laboratorium Botani Terapan, Institut Biologi, Universitas Humboldt - Berlin. Perbanyakan klon 493 dilakukan selang 7 - 10 hari dengan cara mencampur biakan dengan medium perbanyakan MSG (Klimaszewska, 1989) cair baru mengandung 9,04 μM 2,4-D (*asam 2,4-diklorophenoksiasetat*) and 2,22 μM BAP (*6-benzylaminopurine*) dengan perbandingan 1 : 10, sedangkan klon 1792 diperbanyak di atas medium padat dan penggantian dilakukan setiap bulan dengan menanam sebagian kecil ESM di atas medium perbanyakan yang sama.

Pemasakan embrio dilaksanakan menurut Attree *et al.* (1990), Zoglauer *et al.* (1995), Taryono *et al.* (1996) yaitu menggunakan medium perbanyakan yang mengandung 10% PEG 4000 (*polietilenglikol*) dan 38 μM ABA (*asam absisat*). Embrio yang telah masak kemudian dikecambahkan pada medium $\frac{1}{2}$ BM10 (Gupta & Durzan, 1986). Bibit umur 2 bulan yang dihasilkan kemudian ditanam pada campuran tanah - vermikulit dengan perbandingan 1 : 2 yang disterilisasi dalam wadah plastik tembus pandang yang diairi hingga jenuh dengan medium perkecambahan. Setelah 1 bulan di dalam kondisi steril, tutup wadah sedikit demi sedikit dibuka dan tanah tetap dijaga lembab dengan air biasa sampai bibit beradaptasi. Bibit yang tetap bertahan hidup dalam lingkungan terbuka selanjutnya ditanam di lapangan.

Flow sitometri

Isolasi inti sel dilakukan dengan pencacahan "*chopping*" (Ulrich & Ulrich, 1991). Tunas samping yang masih sangat muda dengan berat

antara 200 - 500 mg dari bibit berumur 1 tahun di lapangan dipanen, kemudian dipotong-potong dalam 0,5 ml larutan A penyangga ekstraksi inti sel ditambah 2 % PVP (*Polyvinyl pyrrolidone*). Setelah inti yang terlepas dari selnya cukup banyak, larutan disaring melewati nilon berukuran lubang kurang lebih 50 μ M, kemudian ditambah dengan 2 ml larutan B yang mengandung pewarna DAPI (*4,6-diamino-2-phenylindole-2HCl*). Pendugaan dilakukan menggunakan flow sitometer seri CAII dan hasilnya dianalisis dengan program komputer DPAC. Larutan penyangga ekstraksi, pewarna, sitometer dan program komputer diperoleh dari Partec, Münster, Jerman. Tanaman sejenis yang sama dengan tingkat ploidi telah diketahui digunakan sebagai pembanding. Bibit yang digunakan di dalam analisis lebih lanjut yaitu bibit dengan jumlah sel terukur lebih dari 3000.

Isolasi DNA

Isolasi DNA didasarkan pada metoda yang dimodifikasi oleh Wilke (1997) dan Walter *et al.* (1998). Sekitar 500 mg tunas sampling segar atau ESM digerus dalam nitrogen cair, dipindahkan ke dalam 15 ml tabung sentrifugasi, dicampur merata dengan 5 ml larutan penyangga ekstraksi panas (90°C) terkonsentrasi (2xCTAB) terdiri dari 2% CTAB (*N-cetil-N, N, N, trimetilaminiumbromida*); 1,4 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl (pH= 8); 20 mM Na₂-EDTA (*Na₂-asam etilendinitrilotetra asetat*) dan 0,2 % β -mercaptoethanol dan akhirnya diinkubasi pada suhu 65°C selama 90 menit sambil digoyang. Campuran selanjutnya didinginkan pada suhu kamar, dicampur secara merata dengan volume yang sama campuran kloroform dan isoamil alkohol (24 : 1) kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 2000 g.

Larutan lapisan atas hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi baru ukuran 15 ml, ditambah 2000 unit/ml larutan RNase sebanyak 1/100 dari volume larutan yang dipindahkan, dicampur secara hati-hati hingga merata dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Pengendapan DNA dalam larutan dilakukan dengan menambahkan isopropanol dingin sebanyak 2/3 dari larutan DNAny. Setelah inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar, DNA dapat dipanen dengan sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 1500 g. Endapan DNA selanjut-

nya dicuci dengan cara menginkubasi dalam 2 ml larutan 0,2 M amonium asetat dalam 76% alkohol selama 20 menit pada suhu kamar. Pemisahan DNA dari bahan pencucinya dilakukan dengan mensentrifugasi kembali larutan selama 5 menit pada kecepatan 1500 g, kemudian alkohol dibuang dan sisa alkohol dibiarkan menguap. Apabila endapan DNA dianggap sudah kering maka dapat dicuci kembali dengan 70% alkohol dingin dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 5 menit. Pemisahan DNA dari alkohol dapat dilakukan dengan sentrifugasi dalam waktu dan kecepatan yang sama dengan yang digunakan saat memisahkannya dari 76% alkohol. DNA dikeringkan kembali pada suhu 37°C kira-kira selama 15 menit, kemudian dilarutkan dalam 200 μ l larutan TE (10 mM Tris-HCL dan 1 mM Na₂-EDTA). Kuantitas DNA yang dihasilkan diduga secara elektrophoresis menggunakan 0,7% agarosa. Larutan DNA yang diperoleh diencerkan pada konsentrasi 400 ng/ μ l.

Penggandaan Potongan DNA dengan PCR

Reaksi penggandaan potongan DNA dilaksanakan pada volume 30 μ l yang mengandung 50 ng DNA terdiri dari 3 μ l 10x penyangga reaksi; 3 mM MgCl₂; masing-masing 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 20 ng oligonukleotida (*primer*) dan 1,25 unit Taq-polimerase (Promega, Madison, USA).

Urutan nukleotida yang digunakan sebagai primer:

1. Mikrosatelit (gACA)₄
2. Rob primer acak TgC CgA gCT g
3. M13 minisatelit gAg ggT ggC ggT TCg
4. OPB₁ primer acak gTT TCg CTC C
5. OPB₃ primer acak CAT CCC CCT g
6. OPB₅ primer acak TgC gCC CTT C
7. OPB₈ primer acak gTC CAC ACg g
8. OPB₁₀ primer acak CTg CTg ggA C

Setelah proses denaturasi DNA pada suhu 95°C selama 1 menit, penggandaan dilakukan dalam 40 kali reaksi berantai, berturut-turut denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada urutan DNA yang akan digandakan pada suhu 36° atau 50°C tergantung primer yang digunakan selama 60 detik, pemanjangan primer menjadi urutan DNA yang pas dengan pasangannya dilakukan pada suhu

72°C selama 2 menit. Setelah semua reaksi berantai dilalui, reaksi ditutup dengan suhu tetap 72°C selama 6 menit dan terakhir suhu diturunkan secara bertahap sampai mencapai 2°C untuk menghentikan reaksi. Semua reaksi berjalan secara otomatis dalam alat reaksi berantai terprogram terkendali PTC 100 P (MJ Research Inc., Watertown, USA).

Hasil dari reaksi dipisahkan dengan metoda elektroforesis menggunakan 1,2% agarosa yang dilarutkan dalam larutan 1xTAE yang terdiri dari 40 mM Tris HCl (pH= 8), 20 mM asam cuka dan 1 mM Na₂-EDTA dan diwarnai dengan 0,01 % larutan ethidium bromida. Lambda PstI (MBI Fermentas, New York, USA) digunakan sebagai marka. Gambar diambil di bawah pengaruh sinar ultra violet untuk mempermudah penilaian terhadap hasil pemisahan. Setiap reaksi diulang paling sedikit 2 kali.

Analisis data

Pada analisis flow sitometri, alat ditera sebelum digunakan untuk melakukan pendugaan tanaman diploid, sehingga nilai rata-rata tingkat diploiditas bibit yang diperoleh harus dibandingkan terlebih dahulu dengan nilai teranya. Penyimpangan dari nilai bibit tersebut selanjutnya dibandingkan dengan nilai yang sama dari bibit tanaman diploid dari jenis yang sama. Perbandingan dilakukan dengan uji F ($\alpha = 5\%$).

Hanya potongan DNA yang jelas dan selalu tergendakan pada saat reaksi diulang dianggap sebagai hasil PCR. Untuk suatu potongan DNA tertentu dalam semua bibit yang diuji, apabila tergendakan dinilai 1, sedangkan apabila tidak diberi nilai 0 (Hashmi *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1997; Divaret *et al.*, 1999; Gilbert *et al.*, 1999). Matrik jarak kemudian dihitung dengan metoda akar euclidean dan dendrogram dibuat dengan metoda tetangga terdekat. Semua analisis statistik dilaksanakan dengan bantuan program Statgraph 2.1 Plus (Statistical Graphic Corp., Maryland, USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman morfologi selama pemasakan, perkecambahan dan aklimatisasi

Pada medium pemasakan, embrio somatik sedikit demi sedikit tumbuh dan berkembang menjadi embrio masak. Setelah 8 minggu

inkubasi, sebagian besar embrio berkembang menjadi embrio yang serupa dengan embrio sigotik yang dicirikan dengan adanya kotiledon dan hipokotil. Pengamatan lebih lanjut menunjukkan bahwa keragaman morfologi telah terjadi. Hasil yang sama pernah dilaporkan oleh Klimaszewska (1989) dan Lelu *et al.* (1994). Sebagian kecil embrio (20%) mempunyai bentuk tidak normal. Ketidaknormalan perkembangan embrio dalam pemasakan merupakan nilai pembatas konversi ESM menjadi embrio masak (Bornman, 1993). Ketidaknormalan bentuk embrio, khususnya bentuk kotiledon dapat disebabkan oleh pengaruh auksin. Auksin mempunyai peranan yang sangat besar dalam proses diferensiasi embrio somatik (Schiafone & Cooke, 1987; Meinke, 1995), karena auksin berfungsi sebagai pemacu terbentuknya simetri bilateral selama proses pemasakan embrio (Chasan, 1993; Dodeman *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 1997). Sebagian proses pengangkutan auksin di dalam jaringan embrio bersifat polar (Fry & Wangermann, 1976) dan apabila proses pengangkutan auksin tersebut terganggu, maka inisiasi pembentukan kotiledon pada akhir fase globularnya akan terhambat (Golberg *et al.*, 1994). Liu *et al.* (1993) dengan embrio sigotik berhasil membuktikan bahwa pemberian senyawa penghambat pengangkutan auksin dalam medium budidaya embrio menyebabkan perkembangan embrio menjadi tidak normal, sedangkan Schiafone dan Cooke (1987) serta Choi *et al.* (1997) dengan metoda budidaya jaringan menunjukkan bahwa penggunaan senyawa penghambat pengangkutan auksin menyebabkan embrio somatik yang terinokulasi secara langsung mempunyai bentuk kotiledon yang tidak normal.

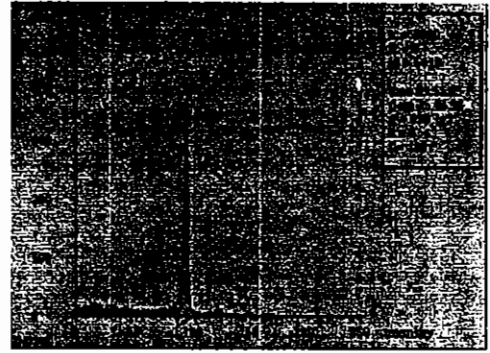
Pada medium perkecambahan tidak semua embrio yang berkecambah normal mampu berkecambah (Klimaszewska, 1989; Kvaalen & v. Arnold, 1991; Augustine & D'souza, 1997; Xu *et al.*, 1997; Dunstan *et al.*, 1998). Dalam penelitian ini hanya sekitar 60% embrio somatik mampu berkecambah. Pada awal proses perkecambahan, sebagian kecil embrio mempunyai radikula yang tidak berkembang atau meskipun berkembang pada akhirnya akar tidak terbentuk. Rendahnya persentase perkecambahan dan bibit yang dihasilkannya kemungkinan disebabkan oleh tidak terbentuknya meristem

akar (Bozhkov & v. Arnold, 1998) atau perkembangan akar terhambat karena pengaruh ikatan ABA (Gutmann *et al.*, 1996). Lelu dan Label (1994) berhasil membuktikan bahwa kandungan ABA dalam embrio masak berkorelasi negatif nyata dengan daya berkecambah. Bozhkov & v. Arnold (1998) berusaha menjelaskan fenomena tidak terbentuknya meristem akar dengan penggunaan PEG di dalam medium pemasakan. PEG merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi tidak terbentuknya meristem akar. Penggunaan PEG dalam proses pemasakan embrio somatik menyebabkan terdegradasinya jaringan "quiescent center". Jaringan ini terletak diantara sel suspensor dan embrio dan mempunyai peranan yang sangat penting selama perkembangan meristem calon akar.

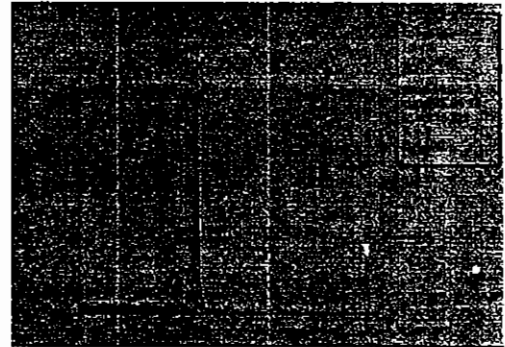
Meskipun hanya bibit yang baik yang dicirikan dengan pertumbuhan yang gigas selama perkecambahan yang ditanam pada medium tanah, namun pertumbuhan bibit selama aklimatisasi sangat beragam. Sebagian kecil bibit tumbuh kerdil meskipun tetap hijau, sedangkan yang lain tumbuh gigas. Keragaman tinggi tanaman mencapai 60%. Keragaman juga terjadi setelah bibit dipindah ke lapangan. Keragaman morfologi merupakan fenomena yang biasa dijumpai pada bibit-bibit hasil budidaya jaringan (George, 1993). Keragaman morfologi juga diamati oleh Isabel *et al.* (1996), Fourre *et al.* (1997) dan Tremblay *et al.* (1999), bahkan keragaman tidak hanya terjadi pada ketinggian tanaman tetapi juga pada warna daun.

Flow sitometri

Dari 173 bibit yang bisa dipanen, jumlah inti sel yang dapat teramati berkisar antara 308 sampai dengan 8446, dengan rata-rata 2859 dan tingkat kesalahan 145,23 sel. Kurva hasil pengukuran sangat halus dengan tingkat ketelitian cukup tinggi (Koefisien keragaman = $1.380 \pm 0.030\%$). Sebagian bibit mengandung sel yang sedang aktif membelah, yang ditunjukkan dengan adanya dua titik maksimum dalam kurva (Gambar 1). Titik maksimum pertama menandakan kelompok sel yang mengandung inti diploid, sedangkan yang kedua karena letaknya di sebelah kanan dari yang pertama menggambarkan tingkat ploidi yang lebih tinggi.



a. Tanaman diploid (kontrol)



b. Bibit dari embrio somatik

Gambar 1. Histogram hasil pengukuran ploidi dengan metoda flow sitometri

Bibit yang mempunyai jumlah sel terdeteksi melebihi dari besaran yang telah ditentukan sebanyak 64 bibit. Apabila nilai simpangan dari penera ke 64 bibit tersebut dibandingkan dengan nilai yang sama dengan kontrol, nilai penyimpanannya tidak berbeda nyata. Dengan kata lain, kemungkinan terjadinya perubahan tingkat ploidi dari bibit-bibit hasil perbanyakan melalui embriogenesis somatik sangat kecil. Hasil yang sama juga sebenarnya pernah dilaporkan oleh peneliti-peneliti sebelumnya (Konan *et al.*, 1994; Rival *et al.*, 1997). Nampaknya kestabilan tingkat ploidi bibit-bibit embrio somatik sangat dipengaruhi oleh jenis tanaman dan cara embrio somatik diinduksi. Kubalukova *et al.* (1996) melaporkan bahwa 40% bibit mentimun yang diperbanyak melalui pembentukan kalus embriogenik menjadi poliploid. Zat pengatur tumbuh khususnya yang buatan, misalnya 2,4-D diduga sebagai faktor yang menyebabkan perubahan jumlah kromosom dalam sel (George, 1993; Phillips *et al.*, 1994; Karp, 1995). Penggunaan zat pengatur tumbuh dalam induksi

embrio somatik, seperti 2,4-D dalam konsentrasi tinggi, kemungkinan dapat menghambat terbentuknya benang gelendong selama proses mitosis, menyebabkan benang gelendong berbentuk tidak normal atau selama proses pembelahan sel, sel yang seharusnya memasuki proses tahapan istirahat sementara tetapi sekonyong-konyong dipacu untuk memasuki pembelahan sel berikutnya sebelum sel tersebut menyelesaikan proses pembelahan mitosis inti selnya.

PCR

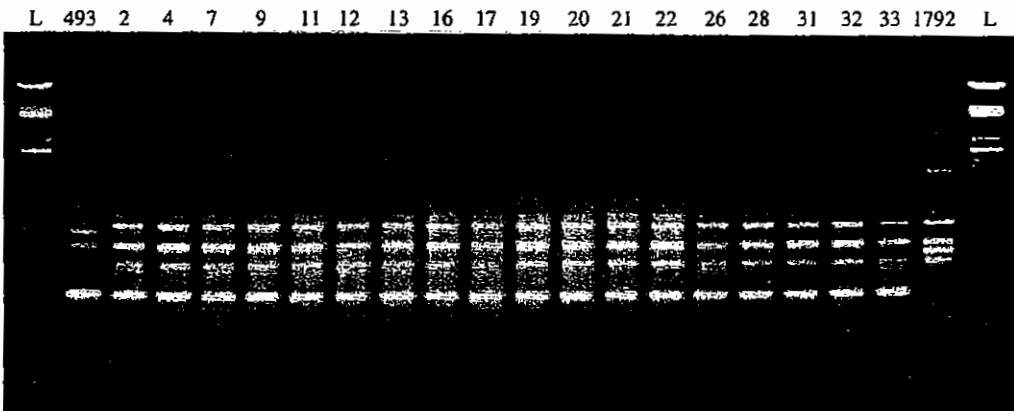
Di antara 80 bibit yang mampu dipanen dari bibit yang telah ditanam di lapangan hanya 24 bibit yang memberikan jumlah DNA yang layak digunakan untuk menghasilkan marka molekuler. DNA yang berasal dari ESM asal (klon 493) dan ESM 1792 yang sifatnya sangat berlainan dengan klon 493 diikuti dalam proses reaksi sebagai pembandingan, untuk mempermudah penilaian marka yang dihasilkan.

Banyaknya potongan DNA yang mampu digandakan tergantung dari bibit (asal DNA) dan urutan oligonukleotida yang digunakan sebagai primer. Jumlah potongan DNA yang tergandakan berkisar antara 8 sampai 12 buah dengan ukuran potongan antara 393 sampai dengan 2800 urutan basa. Kecuali urutan oligonukleotida OPB₅, urutan oligonukleotida yang lain dengan jelas dapat membedakan klon 493 dari 1792. Urutan oligonukleotida (gACA)₄ sebagai contoh berhasil

menggandakan potongan DNA sepanjang 731 urutan basa hanya pada klon 1792 (Gambar 2).

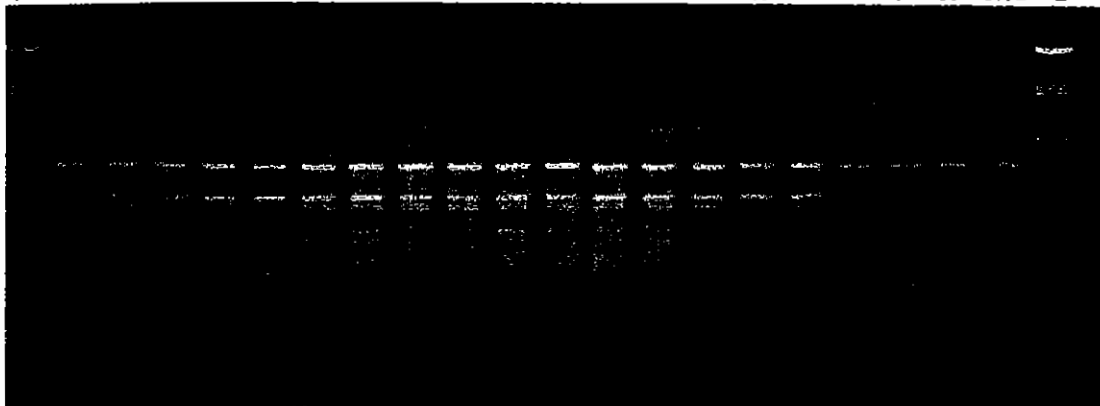
Bibit dapat dibedakan dengan ESM asalnya dengan menggunakan urutan nukleotida (gACA)₄, Rob dan OPB₁₀, meskipun perbedaannya tidak begitu jelas. Dengan (gACA)₄ sebagai contoh, perbedaan dapat dilihat pada potongan DNA sepanjang 1295, 1430 dan 1700 urutan basa, sedangkan Rob dan OPB₁₀ hanya memberikan perbedaan dalam banyaknya potongan DNA yang mampu digandakan yang ditunjukkan dengan perbedaan ketebalan. Jumlah potongan DNA yang mampu digandakan pada ESM lebih banyak dibanding dengan pada bibit-bibit turunannya, meskipun potongan DNA yang tergandakan pada bibit juga ada pada ESM.

Banyaknya potongan DNA yang tergandakan diantara bibit dapat dikatakan relatif seragam yaitu antara 6 - 11 buah tergantung dari urutan oligonukleotida yang digunakan (Tabel 1). Primer M13 menggandakan potongan DNA sebesar 1950 urutan basa hanya pada satu bibit yaitu bibit nomer 31. Potongan DNA yang dihasilkan cukup tebal dan sangat jelas (Gambar 3). Penggunaan primer M13 cukup efektif untuk mencari perbedaan genetik antar individu secara molekuler (Fladung & Ziegenhagen, 1998). Oligonukleotida M13 berhibridisasi dengan urutan DNA serupa minisatelit dari tanaman, jamur, protosoa bahkan bakteri, oleh karena itu oligonukleotida ini paling sering digunakan sebagai probe minisatelit untuk sidik jari DNA tanaman (Weising *et al.*, 1995).



Gambar 2. Hasil PCR menggunakan urutan oligonukleotida (gACA)₄ sebagai primer. L. Lambda PstI penanda ukuran, 493. ESM asal, 2-33. Bibit dari embrio somatik, 1792. ESM pembandingan

L 493 2 4 7 9 11 12 13 16 17 19 20 21 22 26 28 31 32 33 1792 L



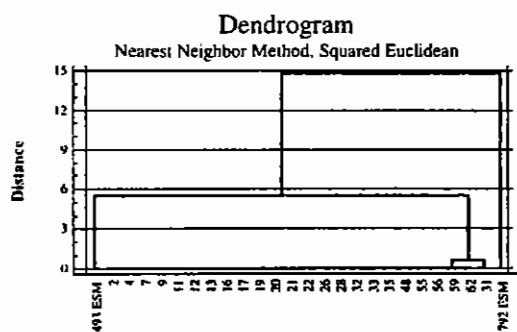
Gambar 3. Hasil PCR menggunakan urutan oligonukleotida M13 sebagai primer.
 L. Lambda PstI penanda ukuran, 493. ESM asal, 2-33. Bibit dari embrio somatik, 1792.
 ESM pembanding

Tab. 1. Jumlah potongan DNA terdakan dari ESM 493 dan bibit turunannya serta ESM 1792

Primer	Potongan DNA	493 ESM	Bibit yang dihasilkan dari embrio somatik ESM 493																				1792 ESM			
			2	4	7	9	11	12	13	16	17	19	20	21	22	26	28	31	32	33	35	48		55	56	59
(gACA) ₄	Jumlah	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	0	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1	10	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
M ₁₃	Jumlah	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	8	8	8	8	8	8	8	8
Rob	Jumlah	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	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	0	0
	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
OPB ₁	Jumlah	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	1	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10
OPB ₃	Jumlah	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
OPB ₅	Jumlah	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
OPB ₈	Jumlah	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
OPB ₁₀	Jumlah	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	6
	1	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	5
Total	Jumlah	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	
	0	8	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	16
	1	68	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	65	64	64	64	64	64	64	64	59

Keterangan : 0. Tidak ada potongan DNA; 1. Potongan DNA jelas terlihat

Di antara 8 urutan oligonukleotida yang digunakan mampu digandakan sebanyak 76 potongan DNA (Tabel 1). ESM 493 mempunyai jumlah marka terbanyak (89,5%), sedangkan ESM 1792 terkecil (77,6%). Bibit rata-rata mempunyai 84% potongan DNA, kecuali bibit nomer 31. Bibit secara jelas dapat dibedakan (Gambar 4) dengan analisis pengelompokan "Cluster analysis". Pertama ESM 493 dan bibit turunannya berada dalam satu kelompok terpisah dari ESM 1792. Pengelompokan berikutnya berhasil membedakan antara ESM 493 dan turunannya, sedang yang terakhir satu bibit dengan jelas memisah dari yang lainnya meskipun perbedaannya tidak begitu besar. Terjadinya keragaman genetik bibit-bibit embrio somatik yang dapat dideteksi dengan PCR dilaporkan oleh Hashmi *et al.* (1997); Al-Zahim *et al.* (1999).



Gambar 4. Hasil analisis pengelompokan "Cluster analysis" terhadap bibit embrio somatik dan ESM asal

Besarnya perubahan genetik yang mungkin terjadi dipengaruhi oleh genotipa asal embrio somatik. Perubahan itu dapat terjadi karena pematangan kromosom akibat dari pengaruh cekaman selama *in vitro*. Tempat terjadinya pematangan kromosom diketahui tidaklah acak, tetapi terjadi di daerah heterokromatin dan dapat menyebabkan terjadinya pemindahan, pembalikan dan penghilangan urutan DNA (Benzion & Phillip. 1988; Lapitan *et al.*, 1988; George, 1993). Bahan pelarut dan logam berat hara mikro diduga sebagai penyebab terjadinya pematangan kromosom (George, 1993).

KESIMPULAN

Bibit-bibit embrio somatik mampu diaklimatisasi di lapangan. Terjadi keragaman morfologi yang secara kualitatif ditunjukkan dengan beragamnya ukuran ketinggian bibit, namun secara flow sitometri tingkat ploidi dari bibit-bibit tersebut dikategorikan identik dan tidak berbeda nyata dengan tanaman diploid kontrol. Dengan metoda reaksi polimerase berantai perubahan pada tingkatan DNA mampu terdeteksi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dr. Kurt Zoglauer, penanggung jawab kelompok kerja budidaya jaringan Laboratorium Botani Terapan, Institut Biologi, Universitas Humboldt di Berlin yang telah memberi bahan, tempat dan bimbingan selama penelitian; Prof. Dr. M.-B. Schröder, direktur bidang Botani, Lembaga Penelitian Geisenheim, Hessen yang telah memberikan ijin penggunaan flow sitometer dan dengan sabar membimbing; dan terakhir DAAD yang secara sukarela memberi bantuan finansial kepada penulis selama di Jerman.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Zahim M.A., Ford-Lloyd B.V., Newbury H.J. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports* 18: 473 - 477
- Attree S.M., Tautorus T.E., Dunstan D.I., Fowke L.C. 1990. Somatic embryo maturation, germination, and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany* 68: 2583 - 2589.
- Augustine A.C., D'souza L. 1997. Somatic embryogenesis in *Gnetum ula* Brongn (*Gnetum edule*) Blune. *Plant Cell Report* 16: 354 - 357
- Benzion G., Phillips R.L. 1988. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. *Genome* 30: 318 - 325

- Bornman C.H. 1993. Maturation of somatic embryos. Dalam: Redenbaugh K. (ed.). *Synseeds, Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. CRC Press Inc. Florida. 105 - 114
- Bozhkov P.V., Von Arnold S. 1998. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 104: 211 - 224
- Bueno M.A., Gomez A., Vicente O., Manzanera J.A. 1996. Stability in ploidy level during somatic embryogenesis in *Quercus canariensis*. Dalam Ahuja M.R. et al.(eds.) *Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht 23 - 28
- Chasan R. 1993. Embryogenesis: new molecular insight. *The Plant Cell* 5: 597 - 599
- Choi Y.E., Kim H.S., Soh W.Y., Yang D.C. 1997. Developmental and structural aspects of somatic embryos formed on medium containing 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Cell Reports* 16: 738 - 744
- Chowdari K.V., Ramakrishna W., Tamhankar S.A., Hendre R.R., Gupta V.S., Sahasrabudhe N.A., Ranjekar P.K. 1998. Identification of minor DNA variations in rice somaclonal variations. *Plant Cell Reports* 18: 55 - 58
- De Verno L.L., Park Y.S., Bonga J.M., Barrett J.D. 1999. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.). *Plant Cell Reports* 18: 948 - 953
- Divaret I., Margale E., Thomas G. 1999. RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of a *Brassica oleracea* L. collection. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1029 - 1035
- Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48: 1493 - 1509
- D'ovidio R., Tanzarella O.A., Porceddu E. 1990. Rapid and efficient detection of genetic polymorphism in wheat through amplification by polymerase chain reaction. *Plant Molecular Biology* 15: 169 - 171
- Dunstan D.I., Dong J.Z., Carrier D.J., Abrams S.R. 1998. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34: 159 - 168
- Fladung M., Ziegenhagen B. 1998. M13 DNA fingerprinting can be used in studies on phenotypic reversions of forest tree mutants. *Trees* 12: 310 - 314
- Fourre J.-L., Berger P., Niquet L., Andre P. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 159 - 169
- Fry S.C., Wangermann E. 1976. Polar transport of auxin through embryos. *New Phytologist* 77: 313 - 317
- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle intact plant tissue. *Science* 220: 1049 - 1051
- George E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture: I. Technology*. Exegetics Ltd. Edington.
- Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S. 1999. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1125 - 1131
- Goldberg R.B., de Paiva G., Yadegari R. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*. 266: 605 - 614
- Goto S., Thakur R.C., Ishii K. 1998. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. *Plant Cell Reports*. 18: 193 - 197
- Grant D. Shoemaker R. 1997. Molecular Hybridization. Dalam: Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (eds.) *DNA Markers: Protocols, Application and Overviews*. Wiley-Liss Inc. New York. 15 - 26
- Gupta P.K., Durzan D.J. 1986. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *In Vitro Cellular Developmental Biology* 22: 685 - 688
- Gutmann M., von Arnold P., Label P., Lelu M.-A. 1996. Effects of abscisic acid on somatic

- embryo maturation of hybrid larch. *Journal of Experimental Botany* 47 (305): 1905 - 1917
- Hashmi G., Huettel R., Meyer R., Krusberg L., Hammerschlag F. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports* 16: 624 - 627
- Ho C.Y., McMaugh S.J., Wilton A.N., McFarlane I.J., Mackinlay A.G. 1997. DNA amplification variation within cultivars of turf-type Couch grasses (*Cynodon* spp.). *Plant Cell Reports* 16: 797 - 801
- Isabel N., Boivin R., Levasseur C., Charest P.-M., Bousquet J., Tremblay F.M. 1996. Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). *American Journal of Botany* 83 (9): 1121 - 1130
- Jain 1998. An overview of progress on somatic embryogenesis in forest trees. Dalam: Altman et al. (eds.) *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 57 - 64
- Karp A., Steele S.H., Breiman N.A., Shewry P.R.S., Parmar S., Jones M.G.K. 1987. Minimal variation in barley plants regenerated from cultured immature embryos. *Genome* 29: 405 - 412
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295 - 302
- Klimaszewska K. 1989. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Science* 63: 95 - 103
- Kubalaková M., Doležel J., Lebeda A. 1996. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture. *Biologia Plantarum* 38(3): 475 - 480
- Konan N.K., Sangwan R.S., Sangwan B.S. 1994. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 91 - 102
- Kong L., Attree S.M., Fowke L.C. 1997. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. *Physiologia Plantarum* 101: 23 - 30
- Kvaalen H., von Arnold S. 1991. Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 49 - 57
- Lapitan N.L.V., Sears R.G., Gill B.S. 1988. Amplification of repeated sequences in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics* 75: 381 - 388
- Lee M., Phillips R.L. 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annuals Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 413 - 437
- Lelu M.-A., Label P. 1994. Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. in relation to germination and plantlet recovery. *Physiologia Plantarum* 92: 53 - 60
- Lelu M.-A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. 1994. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 1. somatic embryo maturation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 107 - 115
- Lin J.-J., Kuo J. 1996. AFLP: a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 17: 52 - 56
- Liu C.-M., Xu Z.-H., Chua N.-H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5: 621 - 630
- Mavituna F., Buyukalaca S. 1996. Somatic embryogenesis of pepper in bioreactors: a study of bioreactor type and oxygen-uptake rates. *Applied Microbiology Biotechnology* 46: 327 - 333
- Meinke D.W. 1995. Molecular genetics of plant embryogenesis. *Annuals Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 369 - 394
- Merkle S.A. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1(3): 112 - 121
- Patnaik J., Sahoo S., Debata B.K. 1999. Somaclonal variation in cell suspension

- culture-derived regenerants of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *Motia*. *Plant Breeding* 118: 351 - 354
- Philips R.L.S., Kaepler S.M., Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tissue culture: breakdown of normal controls. *Proceeding of National Academic Science USA* 91: 5222 - 5226
- Piola F., Rohr R., Heizmann P. 1999. Rapid detection of genetic variation within and among in vitro propagated cedar (*Cedrus libani* Loudon) clones. *Plant Science* 141: 159 - 163
- Price H.J., Johnston J.S. 1996. Analysis of plant DNA content by fuelsen microspectrophotometry and flow cytometry. Dalam: Jauhar P.P.(ed.) *Methods of Genome Analysis in Plants*. CRC Press Inc. Florida. 115 - 132
- Rafalski J.A. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Dalam: Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (eds.) *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews*. Wiley-Liss Inc. New York. 75 - 84
- Rani V., Parida A., Raina S.N. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Reports* 14: 459 - 462
- Rival A., Beule T., Barre P., Hamon S., Duval Y., Noirot M. 1997. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reports* 16: 884 - 887
- Roth R., Ebert I., Schmidt J. 1997. Trisomy associated with loss of maturation capacity in along-term embryogenic culture of *Abies alba*. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 353 - 358
- Sari N., Abak K., Pitrat M. 1999. Comparison of ploidy screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai. *Scientia Horticultura* 82: 265 - 277
- Schiavone F.M., Cooke T.J. 1987. Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differentiation* 1: 53 - 62
- Skroch P.W., Nienhuis J. 1995. Qualitative und quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1078 - 1085
- Taryono, Dembny H., Zoglauer K. 1996. Maturation and germination of somatic embryos in *Larix decidua* Mill. Dalam: *Plant Embryogenesis Workshop: From Single Plant Cell to Plant - Progress Towards Understanding Zygotic, Androgenesis and Somatic Embryogenesis*. Centre for Applied Plant Molecular Biology. University of Hamburg. Poster 114
- Taryono. 1997. Embriogenesisa somatik sebagai cara penyediaan bibit tanaman keras. *Buletin Agro Industri (Agro Industry Bulletin)* 03: 63 - 76
- Ulrich I., Ulrich W. 1991. High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. *Protoplasma* 165: 212 - 215
- Walter C., Grace L.J., Wagner A., White D.W.R., Walden A.R., Donaldson S.S., Hinton H., Gardner R.C., Smith D.R. 1998. Stable transformation and regeneration of transgenic plants *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Reports* 17: 460 - 468
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press Inc. Florida
- Wilke S. 1997. Isolation of total genomic DNA. Dalam: Clark M.S.(ed.) *Plant Molecular Biology. A Laboratory Manual*. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg. 3 - 14
- Winkelmann T., Sangwan R.S., Schwenkel H.-G. 1998. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 400 - 404
- Xu Z.Q., Jia J.-F., Hu Z.D. 1997. Somatic embryogenesis in *Sesamum indicum* Nigrum. *Journal of Plant Physiology* 150: 755 - 758
- Zoglauer K., Dembny H., Behrendt U., Koralach J. 1995. Developmental patterns and regulating factors in direct somatic embryogenesis of european larch (*Larix decidua* Mill.). *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent.* 60/4a: 1627 - 1636