

Aktivitas Polifenol Oksidase Kultur Antera Padi Setelah Praperlakuan Cekaman Manitol

Rusnani

Abstrak

Penelitian tentang “Aktivitas Polifenol Oksidase Kultur Antera Padi Setelah Praperlakuan Cekaman Manitol”, telah dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya. Dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas polifenol oksidase setelah praperlakuan cekaman manitol. Antera padi fase uninukleat dikultur pada medium N6 yang dimodifikasi hara mikro MS dengan cekaman manitol 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M dan tanpa manitol (kontrol). Setelah 6 hari pada cekaman manitol, disubkultur pada medium N6 dengan hara mikro MS dan 2,4-D 1 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas PPO meningkat pada manitol 0,1 M, selanjutnya menurun seiring dengan penambahan konsentrasi manitol sampai 0,4 M. Dengan demikian perlakuan manitol 0,4 M memiliki kemampuan morfogenik sel lebih baik dari perlakuan lain.

Kata Kunci : Manitol, PPO, Kultur Antera Padi.

PENDAHULUAN

Usaha untuk meningkatkan produktivitas padi adalah dengan menanam varietas padi yang memiliki karakter unggul. Secara konvensional untuk menghasilkan suatu varietas unggul memerlukan waktu 7-10 tahun (Fehr 1987 dalam Dewi dan Purwoko 2001). Melalui kultur antera atau disebut juga kultur haploid, proses pemuliaan untuk memperoleh varietas unggul yang lama menjadi lebih singkat yaitu melalui satu sampai dua generasi saja (Dewi dan Purwoko 2001).

Selain itu pemuliaan padi melalui kultur antera memiliki keuntungan, diantaranya memperpendek siklus pemuliaan dengan memperoleh tanaman yang homozigot secara cepat, sehingga dapat menambah efisiensi seleksi. Memperluas viabilitas genetik melalui produksi gametoklonal dan gen resesif terekspresi lebih cepat (Zapata 1996 dalam Somantri *et al.* 2001). Selanjutnya tanaman yang dihasilkan melalui kultur antera biasanya toleran terhadap cekaman lingkungan dan penyakit (Hendaryono dan Wijayani 1994).

Jika dilihat dari keuntungannya, kultur antera sangat penting dalam pemuliaan tanaman padi, sehingga perlu diketahui beberapa faktor yang menyokong keberhasilan kultur antera. Dunwell (1985 dalam Katuuk 2000) mengemukakan ada delapan faktor yang penting dalam kultur antera yaitu kondisi fisiologis tanaman donor, jenis perlakuan, pre-kultur terhadap kuncup bunga, kehadiran zat pengatur tumbuh pada media, fase perkembangan polen pada saat antera di kultur, metode sterilisasi, kondisi inkubasi, cara diseksi dan cara subkultur.

Pada penelitian ini dilakukan pemuliaan tanaman melalui kultur antera, dimana antera yang digunakan adalah sub spesies *Javanica* kultivar pegagan. Sub spesies *Javanica* dikenal sebagai padi lokal di Indonesia yang mempunyai sifat superlatif, terutama toleran terhadap cekaman lingkungan. Bila dikultur secara *in vitro*, mempunyai kemampuan yang tinggi dalam menghasilkan tanaman hijau (*High anther cultibility*) (Dewi dan Purwoko 2001).

Aplikasi kultur *in vitro* melalui antera sub

spesies *Javanica* diharapkan dapat memacu program pemuliaan pada masa yang akan datang. Perbaikan efisiensi kultur antera juga terus dilakukan untuk memperoleh kalus embriogenik yang akhirnya diharapkan menjadi tanaman bersifat unggul, diantaranya toleran terhadap lingkungan dan penyakit.

Salah satu perlakuan yang digunakan untuk perbaikan efisiensi kultur antera adalah dengan memberikan praperlakuan cekaman manitol pada media sebelum di kultur pada media induksi kalus. Pemberian manitol dengan beberapa konsentrasi yang berbeda pada media menyebabkan terjadinya cekaman osmotik yang berbeda pula. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) cekaman osmotik dapat menyebabkan potensial osmotik medium rendah sehingga sel mendapatkan air sedikit. Sel-sel yang kekurangan air akan merespons keadaan tersebut dan selanjutnya mempunyai kemampuan toleran terhadap kekurangan air. Bohnert *et al.* (1995 dalam Gill 2002) menyatakan adaptasi tanaman terhadap cekaman lingkungan akan terlihat pada perubahan yang terjadi pada morfologi, perkembangan dinding sel, fisiologi dan biokimia.

Indikator biokimia yang sering digunakan untuk mendeteksi respons tanaman terhadap kekeringan adalah melalui aktivitas enzim. Enzim yang digunakan sebagai penanda kekeringan adalah peroksidase (PO), polifenol oksidase (PPO) dan katalase (Shiao 1973 dalam Gardner *et al.* 1991). PPO akan beraktivitas jika ada substratnya yaitu fenol. Aktivitas PPO akan menunjukkan peningkatan jika terjadi peningkatan kandungan senyawa fenol (Farkas dan Karaly 1962 dalam Elimasni 1996).

Senyawa fenol akan terbentuk dalam sel tanaman akibat terjadinya cekaman lingkungan seperti kekeringan. Senyawa ini bersifat toksik bagi tanaman, sehingga peranan PPO sangat penting dalam menguraikan fenol menjadi quinon. Quinon yang dihasilkan dalam jumlah stabil bermanfaat bagi

tumbuhan sebagai metabolit sekunder dan untuk melindungi diri dari serangan jamur, karena quinon bersifat toksik terhadap jamur. Tetapi bila dihasilkan dalam jumlah yang banyak, akan merugikan tanaman, karena quinon dapat menghambat pertumbuhan sel dan jaringan (Benyamin dan Parson 1986 dalam Daryani 1999).

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas polifenol oksidase kultur antera padi setelah praperlakuan cekaman manitol. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi fisiologi tentang aktivitas PPO pada kultur antera padi untuk digunakan sebagai evaluasi kemampuan androgenesis dan aktivitas morfogenik kalus, yang pada akhirnya diharapkan memperoleh tanaman yang toleran terhadap cekaman lingkungan dan resistensi terhadap penyakit.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya. Penelitian dimulai sejak bulan Agustus 2005 hingga Januari 2006. Bahan penelitian yang digunakan adalah Antera padi kultivar pegagan yang diambil dari tanaman padi yang telah mencapai fase uninukleat atau fase bunting (80 hari), malai diambil secara hati-hati agar polen tidak rusak. Kemudian dibungkus tisu yang dibasahi air es untuk menjaga kelembaban, selanjutnya dibungkus aluminium foil. Sebelum dikultur ke medium praperlakuan malai disterilisasi dalam *Laminar air flow*, dengan cara menyemprotkan natrium hipoklorit 4 %, selanjutnya dibilas dengan aquadest tiga kali, setelah itu disemprotkan alkohol 70% dan dibilas aquadest tiga kali.

Medium yang digunakan untuk induksi kalus adalah medium dasar N6 dan dimodifikasi dengan hara

mikro MS, serta ditambah 2,4-D 1 ppm, sebagai pengeras digunakan batoagar 8000 ppm. Medium untuk praperlakuan ditambahkan manitol (0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M dan tanpa manitol sebagai kontrol). Medium ini dimasukkan dalam botol kultur sebanyak 15 ml dan disterilisasi dalam autoklaf bertekanan 1,15 lbs dan suhu 121 °C. Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 ulangan. Setiap ulangan digunakan 10 antera.

Penanaman eksplan pada medium praperlakuan dilakukan dengan cara yaitu: diawali dengan pemilihan spikelet untuk melihat ketepatan fase polen dengan melihat letak antera tidak melebihi setengah panjang spikelet. Selanjutnya pangkal spikelet dipotong dengan gunting tepat dibawah antera, ujung spikelet dijepit dengan pinset dan diketukkan dipinggir botol kultur agar jatuh kedalamnya. Setiap botol diinokulasi sebanyak 20 antera. Setelah 6 hari diberi cekaman manitol sesuai perlakuan, kultur tersebut disubkultur ke medium induksi kalus dan diinkubasi dalam ruangan gelap dengan suhu 20 °C selama 8 minggu.

Setelah 8 minggu kalus dari antera diekstraksi dengan cara: kalus digerus dan dihomogenisasi dalam 2 ml buffer tris HCl pH 8 yang ditambah 0,15 % triton X-100. Homogenat yang didapat disentrifugasi dengan kecepatan 12.500 g pada suhu 0 °C selama 20 menit. Selanjutnya supernatan yang diperoleh dimasukkan dalam tabung effendorf dan disimpan pada suhu 0 – 4 °C untuk digunakan pada pengukuran aktivitas PPO.

Aktivitas PPO diukur menggunakan campuran pereaksi 10 mM pirolgalol, 0,0025 mM dapar posfat pada pH 6,8 yang ditambahkan kedalam 50 µg protein. Hasil oksidasi porolgalol diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm. Aktivitas PPO diukur dengan rumus :

Aktivitas PPO = Absorbansi/konsentrasi protein/menit (U/mg protein/menit).

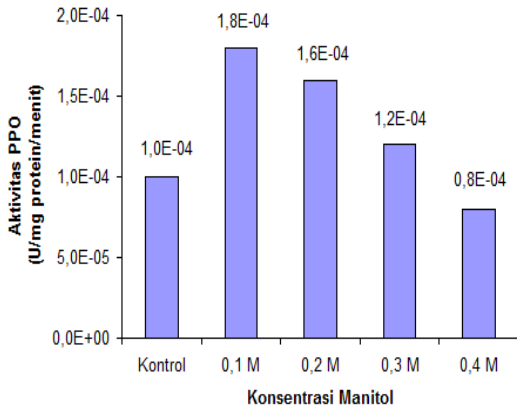
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pengukuran aktivitas PPO pada kalus antera setelah disubkultur selama 8 minggu dari praperlakuan cekaman manitol dengan beberapa konsentrasi, di dapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 1. Analisis Ragam (ANOVA) Aktivitas PPO Kalus Antera Padi Setelah Praprlakuan Cekaman Manitol.

	SK	DB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4		$3,39 \times 10^{-8}$	$8,48 \times 10^{-9}$	1,303	3,096
Galat		15	$9,76 \times 10^{-8}$	$6,51 \times 10^{-9}$	-	-
Total		19	$13,15 \times 10^{-8}$	-	-	-

Dari tabel diatas terlihat bahwa nilai F hitung lebih kecil dari pada nilai F tabel yang menandakan hasil yang diperoleh setelah dianalisis ragam (ANOVA) adalah berbeda tidak nyata. Yang berarti bahwa aktivitas PPO memiliki respons yang sama, baik praperlakuan cekaman manitol konsentrasi 0,1 M sampai 0,4 M maupun tanpa manitol (kontrol). Hal ini disebabkan saat antera disubkultur ke medium induksi kalus, aktivitas PPO mampu direcoveri oleh sel-sel yang tumbuh membentuk kalus. Tetapi akibat dari praperlakuan cekaman manitol, menyebabkan pola perubahan aktivitas PPO seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Aktivitas PPO setelah praperlakuan cekaman manitol

Pola perubahan aktivitas PPO (Gambar 1.) menunjukkan praperlakuan cekaman manitol masih memberikan pengaruh walaupun tidak nyata. Pada praperlakuan tanpa manitol (kontrol) aktivitas PPO diduga dalam keadaan konstan, karena tidak terjadi recoveri aktivitas enzim oleh sel yang membentuk kalus dan kondisi lingkungan pada praperlakuan sama dengan kondisi lingkungan saat disubkultur ke medium induksi kalus. Sedangkan pada praperlakukan cekaman manitol 0,1 M aktivitas PPO mengalami peningkatan, selanjutnya mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi cekaman manitol sampai 0,4 M. Hal ini disebabkan setelah praperlakuan manitol terjadi peningkatan penyerapan karbohidrat pada medium induksi kalus. Semakin tinggi konsentrasi manitol mengakibatkan semakin banyak penimbunan gula dan selanjutnya meningkatkan pembentukan kalus. Pembentukan kalus meningkat merupakan akibat dari berkurangnya reaksi aoksidatif dan aktivitas PPO yang rendah. Menurut Adresone & Ievins (2002) pada kultur *in vitro*, jaringan tanaman yang mengurangi kapasitas reaksi oksidatif akan memperlihatkan kemampuan morfogenik yang lebih baik.

Aktivitas PPO tertinggi di dapat pada

praperlakuan manitol 0,1 M yaitu $1,8 \times 10^{-4}$ U/mg protein/menit, kemudian diikuti secara berurutan oleh manitol 0,2 M, 0,3M, dan 0,4 M diduga saat disubkultur kecepatan recoveri metabolisme sel rendah dibandingkan perlakuan yang lain, sehingga reaksi oksidatif tinggi. Jika reaksi oksidatif tinggi maka produk yang dihasilkan berupa senyawa quinon banyak, sebagai akibatnya menghambat pertumbuhan sel. Benyamin dan Parson 1986 dalam Daryani (1999) menjelaskan apabila quinon yang dihasilkan dalam jumlah yang stabil, bermanfaat sebagai metabolisme sekunder bagi tumbuhan. Tetapi bila dalam jumlah yang banyak akan merugikan tumbuhan, karena quinon dapat menghambat pertumbuhan sel maupun jaringan.

Sedangkan aktivitas PPO terendah terdapat pada praperlakuan manitol 0,4 M yaitu $0,8 \times 10^{-4}$ U/mg protein/menit. Diduga saat praperlakuan cekaman manitol 0,4 M potensial osmotik medium rendah sehingga terjadi penimbunan glukosa dan akumulasi prolin untuk mempertahankan kestabilan potensial osmotik dalam sel. Adanya akumulasi prolin yang tinggi dalam sel, menyebabkan akumulasi fenol sedikit sebagai akibatnya aktivitas PPO rendah. Menurut Lakitan (1995) apabila jumlah substrat menjadi faktor pembatas, maka penambahan enzim selanjutnya tidak lagi mempengaruhi reaksi.

Senyawa fenol merupakan substrat bagi PPO. Substrat dalah salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Jika jumlah substrat sedikit, maka sktivitas enzim rendah. Sedikitnya substrat PPO berupa fenol, diduga berhubungan dengan adanya substansi osmoregulator dan osmoproteksi seperti prolin dan glukosa. Lakitan (1995) menyatakan bahwa penurunan laju reaksi adalah pengaruh dari penurunan konsentrasi substrat dan penimbunan produk.

Peningkatan cekaman manitol 0,4M menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas PPO

sehingga kemampuan pembentukan kalus lebih baik dibandingkan praperlakuan yang lain. Menurut Andersone dan Ievins (2002) penurunan aktivitas PPO menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas morfogenik.

Artinya praperlakuan cekaman manitol 0,4 M selama 6 hari pada antera padi dapat menghasilkan kalus embriogenik yang lebih baik. Menurut Bhojwani *et al.* (2003) praperlakuan cekaman manitol dengan konsentrasi 3,2 % dapat merespons pembentukan dari 23 % sampai 78 %. Selanjutnya Raina & Irfan (1998 dalam Bhojwani *et al.* 2003) melaporkan praperlakuan manitol 0,4 M penting untuk induksi androgenesis pada kultur mikrospora subspecies *indica* dan *Japonica*.

Penelitian ini masih perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai uji ketahanan pada kalus atau pinak tanaman, yaitu dengan memberikan perlakuan cekaman lingkungan dan penyakit. Apa tinggi, maka tanaman resisten terhadap penyakit maupun cekaman lingkungan. Tetapi bila kalus atau pinak tanaman tidak mampu tumbuh setelah setelah diberi perlakuan, maka tanaman tersebut tidak resisten terhadap penyakit dan terhadap cekaman lingkungan. Menurut Agrios (1996 dalam Ningsih 2004) aktivitas PPO yang tinggi menunjukkan ketahanan tanaman yang tinggi terhadap infeksi. Selanjutnya Shao (1973 dalam Gardner *et al* 1991) menjelaskan bahwa PPO merupakan indikator biokimia untuk mendeteksi respons tanaman terhadap lingkungan seperti kekeringan.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa aktivitas PPO mengalami peningkatan pada manitol 0,1 M dan selanjutnya menurun seiring dengan penambahan konsentrasi manitol sampai 0,4 M. Hal ini menandakan praperlakuan manitol 0,4 M memiliki aktivitas morfogenik paling baik dibanding praperlakuan lain.

SARAN

Dari penelitian ini, disarankan untuk melakukan uji ketahanan kalus atau pinak tanaman dengan memberi perlakuan cekaman lingkungan dan penyakit. Sebagai indikator biokimia ketahanan cekaman lingkungan dan toleran penyakit adalah dilihat dari aktivitas PPO.

DAFTAR PUSTAKA

- Adresone, U and G. Ievinsh. 2002. Change of Morphogenic Competence in Mature Pinus Sylvestris L. Buds *In vitro*. *Journal Annals of Botany* 90. 293-298 Page.
- Bhojwani, S.S, H. Pande and A. Raina. 2003. *Factors Affecting Androgenesis in Indica Rice*. Departement of Botany. University of Delhi. India. 12 Page.
- Dewi, I.S dan B.S. Purwoko. 2001. Kultur Antera Mendukung Program pemuliaan Tanaman Padi. *Jurnal Bul. Agron.* 29 (2). 59-63 hlm.
- Daryani. 1999. Respons Pertumbuhan Potongan Jaringan Daun Sukun (*Artocarpus communis* Forst) dan aktivitas Polifenol Oksidase dengan pemberian NAA dan BAP dalam Kultur *In vitro*. *Skripsi Sarjana Sains*. Jurusan Biologi. FMIPA. Universitas Sriwijaya. Indralaya. 45 hlm.
- Elimasni. 1996. Pengujian Aktivitas Enzim Peroksidase dan Polifenol Oksidase pada Lini Kalus Padi (*Oryza sativa* L.) Kultivar Sel Lilin yang Toleran Terhadap Asam α -Pikolinat. *Tesis Pasca Sarjana*. ITB. Bandung. 52 hlm.
- Gill, P.K, A.D. Sharma, P. Singh and S.S Bhullar. 2002. *Osmotic Stress-Induces Change In Germination, Growth dan Soluble Sugar Content of Sorghum bicolor Moench Seeds*. Department of Biotechnology. Guru Nanak Dev University. India. (1). 9 Page.
- Gardner. F.P, B.R. Perace dan L.R. Michell. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Susilo Herawati (*Penterjemah*). UI Press. Jakarta. 428 hlm.
- Hendaryono, D.P.S dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur*

- Jaringan*. Kanisius. Yogyakarta. xi + 199 hlm.
- Katuuk, J.R.P. 2001. *Teknik Kultur Jaringan Dalam Mikropropagasi Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Proyek Pengembangan Lembaga Pendidikan Tenaga Kependidikan. Jakarta. xi + 187 hlm.
- Lakitan, B. 1995. *Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 203 hlm.
- Ningsih, F.M. 2004. *Aktivitas Polifenol Oksidase pada Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) yang terserang penyakit karat *Phakopsora Pachyrhizi* Sydow sebagai Evaluasi Resistensi*. *Skripsi Sarjana Sains*. Jurusan Biologi. FMIPA, Universitas Sriwijaya. Indralaya : 40 hlm.
- Somantri, I.H, A.D Ambarwati dan A. Apriani. 2001. *Perbaikan Varietas Padi Melalui Kultur Anter*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.