

## PENGARUH SUHU INKUBASI TERHADAP PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN EMBRIO SOMATIK PURWOCENG (*Pimpinella pruatjan* Molk.)

NUR AJIJAH<sup>1)</sup>, IRENG DARWATI<sup>3)</sup>, YUDIWANTI<sup>2)</sup>, dan ROOSTIKA<sup>4)</sup>

<sup>1</sup> Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri

Jl. Raya Pakuwon Km 2, Parungkuda, Sukabumi

<sup>2</sup> Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik

Jl. Tentara Pelajar No. 3, Bogor

<sup>3</sup> Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta, IPB, Bogor

Kampus IPB Darmaga Bogor

<sup>4</sup> BB-Biogen, Bogor

Jl. Tentara Palajar No. 3a. Bogor

(Diterima Tgl. 24 – 2 - 2010 - Disetujui Tgl. 17 - 5 - 2010)

### ABSTRAK

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk. atau *P. alpina* KDS.) merupakan salah satu tanaman obat asli Indonesia endemik dataran tinggi dan pada saat ini dibudidayakan secara terbatas di Dataran Tinggi Dieng. Salah satu upaya yang dapat ditempuh untuk memperluas areal pengembangan tanaman ini adalah melalui perakitan varietas toleran dataran rendah atau menengah, yang antara lain dapat diperoleh melalui pendekatan seleksi ketahanan terhadap suhu tinggi yang dapat dilakukan secara *in vitro*. Pengaruh cekaman suhu tinggi terhadap pertumbuhan dan perkembangan purwoceng secara *in vitro* sejauh ini belum diketahui. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik purwoceng secara *in vitro*. Penelitian dilaksanakan di laboratorium kultur jaringan Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) Bogor mulai Oktober 2007 – Maret 2008. Embrio somatik purwoceng diinduksi dari eksplan daun aseptik. Embrio somatik fase globuler yang terbentuk dipergunakan sebagai eksplan kemudian diinkubasi pada tiga taraf suhu ruang yaitu  $17,3 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (kontrol),  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ , dan  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  selama 3 bulan dengan sub kultur setiap bulan sampai terbentuk planlet/tunas. Pengamatan dilakukan terhadap peubah pertumbuhan dan perkembangan eksplan embrio somatik yang meliputi penambahan bobot segar eksplan, persentase eksplan yang membentuk tunas, jumlah tunas yang terbentuk per eksplan serta persentase eksplan hidup. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu inkubasi berpengaruh nyata terhadap semua peubah yang diamati. Rata-rata penambahan bobot segar, persentase eksplan membentuk tunas, jumlah tunas per eksplan dan persentase eksplan hidup semakin menurun dengan semakin meningkatnya suhu inkubasi. Suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  memberikan pengaruh penghambatan yang nyata terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik purwoceng dibandingkan suhu kontrol dan  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  sejak periode inkubasi 1 bulan. Sedangkan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  baru memberikan pengaruh penghambatan yang nyata setelah periode inkubasi 3 bulan.

**Kata kunci :** *Pimpinella pruatjan*, embrio somatik, suhu, pertumbuhan

### ABSTRACT

**Effect of temperature incubation on growth and development of Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) somatic embryos**

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk., *P. alpina* KDS.) is one of Indonesian medicinal plants. It is high altitude endemic species which is currently cultivated on a limited areas in the Dieng Plateau. One effort to expand purwoceng cultivation areas is through the assembly of

purwoceng varieties tolerant to low or medium altitude, among others, can be obtained through the approach of selection for high temperature tolerance that can be done by *in vitro* selection. How high temperature stress influencing the growth and development of purwoceng somatic embryos is not known yet. The research aimed at determining the influence of incubation temperature on the growth and development of purwoceng somatic embryos. The research was conducted at tissue culture laboratory of Indonesian Medicinal and Aromatic Crops Research Institute (IMACRI) from October 2007 – March 2008. Purwoceng somatic embryos induced from aseptical leaves incubated at three levels of room temperature i.e.  $17.3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (control),  $23.3 \pm 2.1^{\circ}\text{C}$ , and  $32.8 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$  for 3 months with a subculture every month. Variables observed were explants fresh weight increment, percentage of explants forming shoot, number of shoot per explants, and percentage of survive explants. The result showed that the average of explants fresh weight increment, percentage of explants forming shoot, number of shoot per explants, and percentage of survive explants decreased with the increase of temperature. The growth and development of purwoceng somatic embryos were significantly inhibited at the temperature of  $32.8 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$  since one month after incubation, while the inhibition of temperature of  $23.3 \pm 2.1^{\circ}\text{C}$  was not significant except after 3 month of incubation.

**Key words:** *Pimpinella pruatjan*, somatic embryos, temperature, growth

### PENDAHULUAN

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk. atau *P. alpina* KDS.) merupakan tanaman obat asli Indonesia endemik dataran tinggi. Habitat alami purwoceng berada pada ketinggian 1.800 – 3.500 m dpl. (HEYNE, 1987). Daerah pengembangan budidaya purwoceng saat ini hanya di Dataran Tinggi Dieng dengan luasan terbatas, pada ketinggian 1.850 – 2.050 m dpl., dan suhu antara 15 – 21°C (RAHARDJO *et al.*, 2006).

Purwoceng dikenal memiliki khasiat afrodisiak (meningkatkan kemampuan seksual) pada pria dan telah lama digunakan di dalam ramuan obat tradisional. Seduhan purwoceng juga digunakan sebagai tonik untuk meningkatkan stamina tubuh (HEYNE, 1987). Dengan khasiat yang dimilikinya, purwoceng berpotensi untuk dikembangkan

sebagai tanaman obat pengganti ginseng yang pemakaiannya di Indonesia cukup tinggi. Impor ginseng Indonesia pada tahun 2005 mencapai 22.515 kg dengan nilai 1.801.599 US \$ (BPS, 2006).

Salah satu upaya yang dapat ditempuh untuk memperluas areal pengembangan purwoceng adalah melalui perakitan varietas toleran dataran rendah atau menengah. Varietas ini antara lain dapat diperoleh melalui pendekatan seleksi ketahanan terhadap suhu tinggi yang dapat dilakukan secara *in vitro*. Seleksi ketahanan terhadap suhu tinggi secara *in vitro* antara lain telah dilakukan pada tanaman kentang dan bawang putih dan telah berhasil diperoleh varietas toleran suhu tinggi (DAS *et al.*, 2000; GOSAL *et al.*, 2001; ZHEN, 2001). Metode seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap suhu tinggi pada tanaman purwoceng sejauh ini belum dikembangkan.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan suhu mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Menurut KOTAK *et al.* (2007), respon tanaman terhadap cekaman suhu tinggi merupakan fenomena yang sangat kompleks. Pertumbuhan dan perkembangan tanaman dipengaruhi oleh suhu lebih dari faktor lingkungan lainnya pada saat air bukan merupakan faktor pembatas (THUZAR *et al.*, 2010). Hasil penelitian AMUTHA *et al.* (2007) menunjukkan perlakuan cekaman suhu tinggi pada 22 genotipe tanaman bunga matahari menghasilkan perubahan yang signifikan pada karakter fisiologis tanaman secara *in vivo*. Sementara hasil penelitian VAZ *et al.* (2004) menunjukkan cekaman suhu tinggi (32°C) menekan pertumbuhan bunga matahari secara *in vitro*. Demikian juga hasil penelitian LI dan WOLYN (1996) menunjukkan suhu inkubasi berpengaruh secara nyata terhadap embriogenesis somatik tanaman asparagus yaitu terhadap jumlah embrio somatik yang dihasilkan dan keberhasilan konversi embrio somatik menjadi planlet. Bagaimana pengaruh cekaman suhu tinggi terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan embrio somatik purwoceng secara *in vitro* sejauh ini belum diketahui.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan, perkembangan, dan kemampuan hidup embrio somatik purwoceng. Informasi ini penting diketahui berkaitan dengan rencana pengembangan metode seleksi *in vitro* purwoceng untuk ketahanan terhadap suhu tinggi dalam rangka perakitan varietas purwoceng toleran dataran menengah atau rendah.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2007 – Maret 2008 di laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Ekofisiologi Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro), Bogor. Bahan tanaman yang digunakan adalah kultur purwoceng aseptik yang telah ada sebelumnya (Gambar 1).



Gambar 1. Kultur aseptik purwoceng yang digunakan sebagai sumber eksplan

Figure 1. Aseptic culture of purwoceng used as explants

## Induksi Embriogenesis Somatik

Embrio somatik diinduksi dari eksplan daun purwoceng aseptik menggunakan metode yang dikembangkan oleh ROOSTIKA *et al.*, (2005). Inisiasi kalus dilakukan pada media Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 2 mg/l dan pikloram 0,5 mg/l, gula 30 g/l dan pematat *phytagel* 2 g/l dengan pH media 5,8. Setiap botol kultur diisi 25 ml media dengan 4 – 5 potong eksplan per botol. Kultur diinkubasi pada suhu 16-18°C dalam kondisi gelap sampai terbentuk kalus. Kalus yang terbentuk kemudian disubkultur pada media induksi embriogenesis somatik yaitu media Driver, Kuniyuki dan Walnut (DKW) dengan penambahan zat pengatur tumbuh IBA 5 mg/l, gula 30 g/l dan pematat *phytagel* 2 g/l dengan pH media 5,8. Setiap botol diisi 4 potong kalus berukuran panjang dan lebar sekitar 1 cm x 1 cm. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 16 - 18°C dengan pencahayaan 2 buah lampu TL masing-masing 40 watt selama 16 jam sampai terbentuk embrio somatik fase globuler. Embrio somatik fase globular yang terbentuk dipergunakan sebagai bahan penelitian.

## Perlakuan Suhu Inkubasi

Embrio somatik fase globuler dipotong-potong berukuran sekitar 0,5 cm x 0,5 cm x 0,5 cm kemudian ditanam pada media pematangan embrio somatik yaitu media DKW dengan penambahan zat pengatur tumbuh IBA 5 mg/l, gula 30 g/l dan pematat *phytagel* 2 g/l dengan pH media 5,8 sebanyak 3 eksplan per botol. Setelah itu kultur diinkubasi pada tiga taraf suhu ruang, yaitu rata-rata suhu siang 17,3 ± 0,5°C (kontrol), 23,3 ± 2,1°C, dan 32,8 ± 1,7°C selama 3 bulan dengan subkultur setiap bulan. Masing-masing perlakuan suhu inkubasi dilakukan di dalam ruang terpisah. Rancangan lingkungan yang digunakan adalah acak lengkap dengan 3 ulangan, masing-masing ulangan terdiri dari 12 botol. Pencahayaan dilakukan dengan menggunakan dua buah lampu TL masing-masing 40 watt selama 16 jam. Perlakuan suhu kontrol dan suhu 23,3 ± 2,1°C dikontrol menggunakan AC sedangkan perlakuan suhu 32,8 ± 1,7°C dicapai dengan penggunaan lampu pijar yang ditutup cat hitam sebagai sumber panas.

Peubah yang diamati adalah pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang meliputi penambahan bobot segar eksplan, persentase eksplan membentuk tunas, jumlah tunas yang terbentuk per eksplan, serta persentase eksplan hidup. Pengamatan dilakukan setiap bulan selama 3 bulan.

Data yang diperoleh diuji kehomogenan ragamnya di antara ketiga ruang inkubasi menggunakan Uji Bartlett. Apabila ragam di antara ruang inkubasi homogen dilanjutkan dengan analisis ragam gabungan dan uji Jarak Berganda Duncan pada taraf  $\alpha$  0,05. Analisis data dilakukan menggunakan program SAS 9,1.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi Embriogenesis Somatik

Kalus berhasil diinduksi dari eksplan daun aseptik pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 2 mg/l + pikloram 0,5 mg/l (Gambar 2a). Kalus mulai

terbentuk pada umur 1 minggu, dan pada umur 4 minggu hampir seluruh permukaan eksplan telah ditutupi oleh kalus dengan warna krem keputihan atau krem muda (Gambar 2b). Setelah 6 minggu kalus dipindahkan ke dalam media induksi embriogenesis somatik yaitu media DKW dengan penambahan zat pengatur tumbuh IBA 5 mg/l. Kalus embriogenik (embriosomatik fase globuler) mulai terbentuk 6 minggu setelah sub kultur pada media DKW. Embrio somatik fase globuler yang terbentuk kemudian digunakan sebagai bahan penelitian (eksplan) (Gambar 2c).

### Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio Somatik Purwoceng

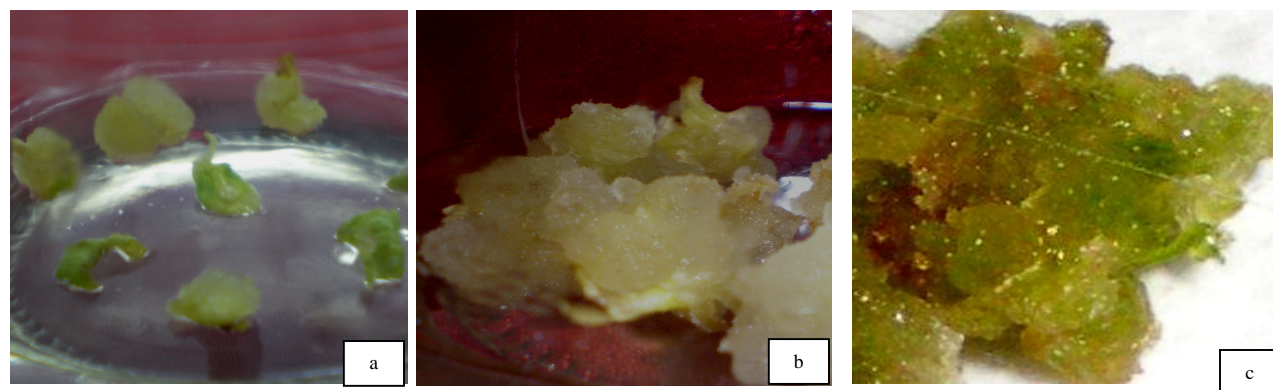
Hasil uji Bartlett pada taraf  $\alpha > 0,05$  menunjukkan adanya kehomogenan ragam di antara ketiga perlakuan suhu pada sebagian besar indikator pengamatan, kecuali terhadap indikator jumlah tunas per eksplan umur 3 bulan (Tabel 1).

Tabel 1. Rekapitulasi uji kehomogenan ragam di antara ruang inkubasi  
Table 1. Bartlett's test among rooms of incubation

Peubah Variables	Uji Barlett <i>Bartlett's test (P.val)</i>		
	1 bulan <i>1 month</i>	2 bulan <i>2 months</i>	3 bulan <i>3 months</i>
Penambahan bobot segar eksplan <i>Fresh weight increment</i>	0,466*	0,00 (0,208)*	0,404*
Persentase eksplan membentuk tunas <i>Percentage of explants forming shoot</i>	0,945*	0,937*	1,000*
Jumlah tunas per eksplan <i>Number of shoots per explant</i>	0,202*	0,001(0,217)*	0,008 (0,026)**
Persentase eksplan hidup <i>Percentage of survival explants</i>	0,086*	0,612*	0,336*

Keterangan : Angka dalam kurung menunjukkan P. val setelah data ditransformasi  
\* Ragam homogen \*\* Ragam tidak homogen

Note : Numbers in parentheses indicate P. val after transformation  
\* Homogeneous \*\* Heterogen



Gambar 2. Induksi kalus embriogenik purwoceng dari eksplan daun. Inisiasi kalus dari eksplan daun aseptik (a), kalus yang diinduksi pada media MS + 2,4-D 2 mg/l + pikloram 0,5 mg/l berwarna krem (b), dan embriosomatik fase globular berwarna hijau yang diinduksi pada media DKW + IBA 5 mg/l (c)

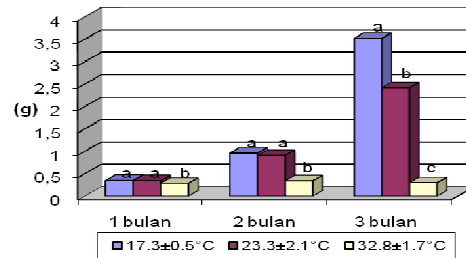
Figure 2. Embriogenic calli induction from leaf explants. Calli initiation from leaf explants (a), creamy calli induced on MS medium + 2,4-D 2 mg/l + picloram 0.5 mg/l (b), and green globular phase of somatic embryos induced on DKW medium + IBA 5 mg/l (c).

Oleh karena itu selanjutnya dilakukan analisis ragam gabungan untuk melihat pengaruh cekaman suhu, kemudian dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda Duncan untuk melihat perbedaan nilai tengah indikator pengamatan di antara ketiga taraf suhu ruang inkubasi.

Hasil analisis ragam gabungan menunjukkan suhu inkubasi memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap semua indikator pengamatan (Tabel 2). Pertumbuhan dan perkembangan eksplan semakin menurun dengan meningkatnya suhu ruang inkubasi dan bertambah lamanya periode inkubasi (Gambar 3, 4, 5, dan 8).

### Bobot Segar Eksplan

Menurut ROUX (2004), bobot segar eksplan digunakan untuk mengukur pertumbuhan tanaman baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Hasil penelitian menunjukkan suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  memberikan pengaruh penghambatan yang nyata sejak bulan pertama inkubasi terhadap pertumbuhan eksplan embrio somatik purwoceng dibandingkan suhu kontrol dan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ , yang ditunjukkan oleh rata-rata penambahan bobot segar eksplan yang paling rendah (Gambar 3). Sedangkan penghambatan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  terhadap pertumbuhan tidak nyata sampai periode inkubasi 2 bulan, penghambatannya baru tampak nyata setelah periode inkubasi 3 bulan (Gambar 3). Menurut SUNG *et al.* (2003) besarnya cekaman yang ditimbulkan oleh suhu berbeda-beda tergantung dari intensitas derajat suhu, laju perubahan suhu dan lamanya periode cekaman. Semakin tinggi intensitas derajat suhu dan semakin lama periode cekaman akan semakin besar tingkat cekaman yang diterima oleh tanaman. Hasil penelitian CHALUPA (1987) menunjukkan suhu memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan kalus tanaman *Pinus banksiana*. Suhu optimum untuk pertumbuhan kalus diperoleh pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ . Suhu di bawah dan di atas suhu optimum menghambat pertumbuhan kalus yang ditandai oleh rata-rata bobot segar dan bobot kering kalus yang lebih rendah dibandingkan pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ . Pada penelitian ini pertumbuhan eksplan embrio somatik purwoceng yang optimum dicapai pada suhu kontrol ( $17,3 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), sedangkan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  dan  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan yang ditunjukkan oleh rata-rata penambahan bobot segar yang lebih rendah baik pada



Gambar 3. Pengaruh suhu inkubasi terhadap rata-rata penambahan bobot segar eksplan embrio somatik purwoceng setelah periode inkubasi 1, 2, dan 3 bulan

Figure 3. The effect of incubation temperature on the average percentage of the explants forming shoot after 1, 2, and 3 months of incubation

periode inkubasi 1, 2, maupun 2 bulan, dengan tingkat penghambatan yang berbeda. Suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  dengan lama periode inkubasi 1, 2, dan 3 bulan memberikan penghambatan yang nyata lebih besar dibandingkan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  pada periode inkubasi yang sama.

### Persentase Eksplan Membentuk Tunas

Menurut ROUX (2004) persentase eksplan membentuk tunas digunakan untuk mengukur kemampuan regenerasi eksplan. Hasil penelitian menunjukkan kemampuan regenerasi eksplan terhambat dengan semakin meningkatnya suhu dan lama periode inkubasi. Suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  tidak memberikan pengaruh penghambatan yang nyata terhadap kemampuan regenerasi eksplan kecuali setelah periode inkubasi 3 bulan (Gambar 4), sedangkan suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  nyata menghambat sejak periode inkubasi 1 bulan. Rata-rata persentase eksplan membentuk tunas pada suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  paling rendah baik pada periode inkubasi 1, 2, maupun 3 bulan (Gambar 4). Hasil serupa diperoleh ARNOLD dan ERIKSON dalam CHALUPA (1987) yang menunjukkan bahwa induksi tunas adventif pada embrio tanaman *Picea abies* dipengaruhi oleh suhu, dimana pembentukan tunas optimum terjadi pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ . Pada suhu  $15^{\circ}\text{C}$  pembentukan tunas terhambat dan pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  embrio mati.

Tabel 2. Rekapitulasi uji F pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik purwoceng  
Table 2. F-test on the effect of incubation temperature on the growth and development of purwoceng somatic embryos

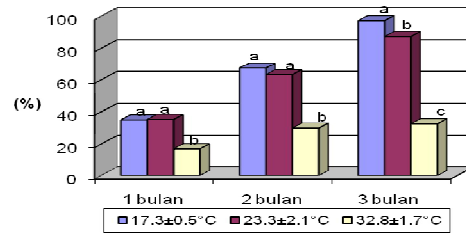
Peubah Variables	P > F		
	1 bulan 1 month	2 bulan 2 months	3 bulan 3 months
Penambahan bobot segar eksplan <i>Fresh weight increment</i>	0,0081	< 0,0001	< 0,0001
Persentase eksplan membentuk tunas <i>Percentage of explants forming shoot</i>	0,0126	< 0,0001	< 0,0001
Jumlah tunas per eksplan <i>Number of shoots per explant</i>	0,0231	< 0,0001	
Persentase eksplan hidup <i>Percentage of survival explants</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001



**Jumlah Tunas per Eksplan**

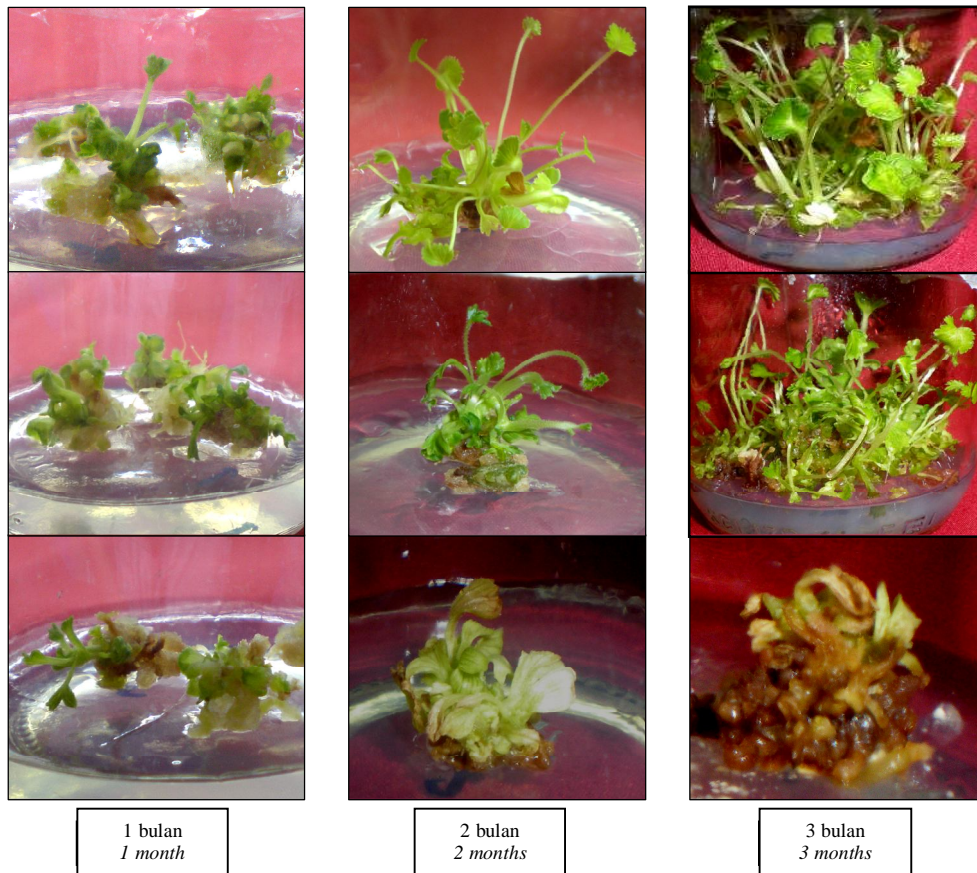
Penghambatan suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  terhadap perkembangan eksplan embrio somatik purwoceng juga tampak pada inidikator rata-rata jumlah tunas per eksplan. Suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  menunjukkan rata-rata jumlah tunas per eksplan paling rendah dan berbeda nyata dengan suhu kontrol dan  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  baik pada periode inkubasi 1 maupun 2 bulan. Sedangkan pada umur 3 bulan tidak dilakukan analisis lanjutan karena ragam di antara suhu inkubasi tidak homogen (Gambar 5). Hasil ini semakin memperjelas bagaimana cekaman suhu tinggi ( $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ ) memberikan pengaruh dan menghambat perkembangan embrio somatik purwoceng secara *in vitro*.

Gambar 6 memperlihatkan perkembangan embrio somatik purwoceng setelah periode inkubasi 1, 2, dan 3 bulan pada suhu kontrol,  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  dan  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ . Tunas yang terbentuk pada suhu kontrol dan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  menunjukkan penampilan yang vigor dan berwarna hijau, sementara tunas yang terbentuk pada suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$



Gambar 4. Pengaruh suhu inkubasi terhadap rata-rata persentase eksplan membentuk tunas setelah periode inkubasi 1, 2 dan 3 bulan  
 Figure 4. The effect of incubation temperature on the average of shoot number per explants after 1, 2, and 3 months of incubation

menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan yang terhambat dengan penampilan tunas yang tidak vigor dan berwarna hijau pucat. Menurut LOKHANDE *et al.* (2003) cekaman suhu tinggi pada tanaman Arabidopsis mengakibatkan cekaman oksidatif yang tinggi akibatnya



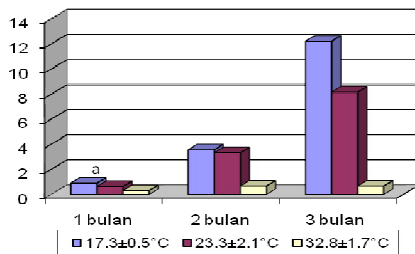
Gambar 6. Perkembangan eksplan embrio somatik purwoceng setelah periode inkubasi 1, 2, dan 3 bulan pada suhu kontrol (atas),  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  (tengah), dan  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  (bawah)  
 Figure 6. The development of purwoceng somatic embryos after 1, 2, and 3 months of incubation at control temperature (above),  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  (middle) and  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  (below)

kandungan klorofil menurun. Demikian juga hasil penelitian VAZ *et al.* (2004) menunjukkan cekaman suhu tinggi menekan pertumbuhan *in vitro* bunga matahari dan mengakibatkan berkurangnya kandungan pigmen terutama klorofil. Hasil penelitian EFEOLU dan TERZIOGHU (2009) menunjukkan adanya penghambatan akumulasi klorofil pada daun bendera tanaman gandum yang mendapat cekaman suhu tinggi.

Cekaman suhu tinggi juga menghambat pembentukan akar pada embrio somatik purwoceng. Sebagian tunas pada periode inkubasi 3 bulan yang terbentuk pada suhu kontrol dan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  telah membentuk akar (Gambar 7), sedangkan tunas yang terbentuk pada suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  tidak berakar. Menurut CHALUPA (1987) induksi akar secara *in vitro* sangat dipengaruhi oleh suhu, dimana persentase pembentukan akar yang tinggi hanya akan diperoleh pada kondisi suhu yang sesuai. Sedangkan pada kondisi suhu yang tidak sesuai pembentukan akar akan terhambat.

### Persentase Eksplan Hidup

Suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  juga memberikan penekanan yang nyata terhadap kemampuan hidup eksplan yang ditunjukkan oleh rata-rata persentase eksplan hidup yang



Gambar 5. Pengaruh suhu inkubasi terhadap rata-rata jumlah tunas per eksplan setelah periode inkubasi 1, 2 dan 3 bulan

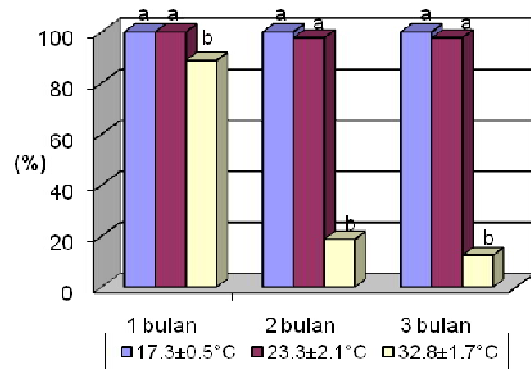
Figure 5. The effect of incubation temperature on the average of number of shoots per explant after 1, 2, and 3 months of incubation



Gambar 7. Tunas yang telah membentuk akar setelah periode inkubasi 3 bulan pada suhu kontrol (kiri) dan  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  (kanan)

Figure 7. Rooted shoots (plantlets) after 3 months of incubation at control temperature (left) and  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  (right)

hanya mencapai 88,9; 18,8; dan 12,5% berturut-turut pada periode inkubasi 1, 2, dan 3 bulan serta berbeda nyata dengan suhu kontrol dan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ . Pada suhu kontrol dan  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  rata-rata persentase hidup pada seluruh perlakuan hampir mencapai 100% baik pada periode inkubasi 1, 2, maupun 3 bulan (Gambar 8). Rata-rata persentase eksplan hidup pada suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  juga semakin menurun dengan bertambah lamanya periode inkubasi (Gambar 8). Hal ini menunjukkan suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  telah memberikan tekanan yang nyata terhadap kemampuan hidup eksplan sejak periode inkubasi 1 bulan, dan penghambatannya semakin meningkat dengan bertambah lamanya periode inkubasi.



Gambar 8. Pengaruh suhu inkubasi terhadap rata-rata persentase eksplan hidup setelah periode inkubasi 1, 2 dan 3 bulan

Figure 8. The effect of incubation temperature on the average of percentage of survive explants after 1, 2, and 3 months of incubation

Hasil penelitian ini menunjukkan suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  dengan lama periode inkubasi selama 2 dan 3 bulan telah melampaui *heat killing temperature* bagi embrio somatik purwoceng dengan persentase kematian eksplan mencapai lebih dari 80% (Gambar 8). Menurut LEVITT (1980) *heat killing temperature* adalah suhu yang mengakibatkan kematian tanaman sebesar 50%.

Pada penelitian ini suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  dengan lama periode inkubasi selama 1 dan 2 bulan tidak memberikan penghambatan yang nyata terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik purwoceng. Penghambatannya baru tampak nyata setelah periode inkubasi selama 3 bulan. Hasil penelitian ini juga menunjukkan perlakuan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  dengan periode inkubasi selama 1, 2, dan 3 bulan tidak memberikan penghambatan yang nyata terhadap kemampuan hidup eksplan yang ditunjukkan oleh rata-rata persentase hidup yang mendekati 100% dan tidak berbeda nyata dengan kontrol (Gambar 8). Pada suhu yang optimum, 3 bulan adalah waktu yang cukup untuk embrio somatik purwoceng tumbuh dan berkembang membentuk planlet.

Suhu mempengaruhi komponen dan metabolisme sel dalam spektrum yang luas. Besarnya cekaman yang ditimbulkan oleh suhu berbeda-beda tergantung dari laju perubahan suhu, intensitas dan lamanya periode cekaman (SUNG *et al.*, 2003; WAHID *et al.*, 2007). Suhu yang tinggi mempengaruhi fluiditas membran sel sehingga fungsi membran dan seluruh aktifitas metabolisme yang tergantung kepada fungsi membran menjadi terganggu (MAESTRI *et al.*, 2002). Suhu yang tinggi juga dapat menyebabkan enzim-enzim terdenaturasi dan kehilangan fungsinya (TAIZ dan ZEIGER, 2002). Hasil penelitian DEKOV *et al.* (2001) menunjukkan pada tanaman bunga matahari perlakuan suhu tinggi mengakibatkan laju fotosintesis menurun secara nyata, jumlah grana dan tilakoid berkurang, dan membran kloroplas terganggu. Hal ini diduga yang mengakibatkan terjadinya penghambatan terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan embriosomatik purwoceng pada suhu inkubasi  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  dengan periode inkubasi selama 3 bulan dan pada suhu inkubasi  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  dengan periode inkubasi 1, 2 dan 3 bulan.

Menurut LEVITT (1980), jika cekaman suhu tinggi dipertahankan dalam waktu yang cukup lama, penghambatan terhadap pertumbuhan akan digantikan oleh kerusakan dan kematian sel. Pada penelitian ini persentase kematian eksplan paling tinggi terjadi pada perlakuan suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  dengan lama periode inkubasi selama 3 dan 2 bulan. Tingginya persentase kematian eksplan ini diduga disebabkan tingginya tingkat kerusakan yang terjadi pada sel. Menurut LEVITT (1980) kebocoran ion merupakan ciri pertama terjadinya kerusakan sel akibat suhu tinggi. Kebocoran ion ini terjadi akibat adanya kerusakan pada membran sel. Hasil penelitian ISMAIL dan HALL (1999) pada tanaman *Vigna unguiculata* menunjukkan persentase kebocoran ion pada daun yang mendapat perlakuan suhu tinggi semakin meningkat dengan meningkatnya suhu dan bertambah lamanya periode perlakuan cekaman. Hasil ini sejalan dengan hasil yang diperoleh WU *et al.* (1984) pada kultur sel tanaman pir yang menunjukkan tingkat kerusakan sel akibat suhu tinggi semakin meningkat dengan meningkatnya suhu dan bertambah lamanya periode cekaman. ALSADON *et al.* (2006) menggunakan kebocoran ion sebagai indikator seleksi toleransi beberapa genotipe tomat terhadap cekaman suhu tinggi secara *in vitro*.

Suhu optimum untuk kultur jaringan tanaman berbeda-beda untuk setiap spesies. Suhu untuk kultur jaringan spesies tanaman yang biasa tumbuh di daerah panas berkisar antara  $25 - 27^{\circ}\text{C}$ , sedangkan untuk spesies tanaman dari daerah dingin lebih rendah (CHALUPA, 1987). Suhu yang selama ini digunakan untuk kultur jaringan purwoceng berkisar antara  $16 - 18^{\circ}\text{C}$ . Pada penelitian ini suhu kontrol berada pada kisaran suhu tersebut, sedangkan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  dan  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  berada di atas kisaran suhu tersebut, sehingga memberikan pengaruh cekaman terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan dengan tingkat cekaman yang berbeda. Suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$

memberikan cekaman yang lebih tinggi terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan dibandingkan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ .

Hasil penelitian ini menunjukkan seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap suhu tinggi pada tanaman purwoceng dapat dilakukan. Seleksi dapat dilakukan pada kisaran suhu antara  $23,3 - 32^{\circ}\text{C}$  dengan lama periode cekaman selama 2 atau 3 bulan. Pada kisaran suhu tersebut diharapkan diperoleh *heat killing temperature* dimana varian yang tidak tahan dan yang tahan dapat dibedakan. Varian tidak tahan diharapkan tidak dapat bertahan hidup sedangkan varian yang tahan diharapkan dapat bertahan hidup. Seleksi ketahanan terhadap suhu tinggi pada eksplan embrio somatik purwoceng tidak dapat dilakukan pada kisaran suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  dengan periode cekaman selama 3 bulan, karena kisaran suhu tersebut tidak memberikan tekanan yang berarti terhadap kemampuan hidup eksplan sehingga varian yang tahan dan tidak tahan tidak dapat dibedakan. Namun demikian masih diperlukan penelitian yang lebih lanjut untuk menentukan suhu yang optimum untuk melakukan seleksi *in vitro* purwoceng toleran dataran rendah atau menengah. Ada kemungkinan suhu optimum untuk seleksi adalah kisaran suhu yang mendekati suhu lingkungan target.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Pertumbuhan, perkembangan, dan kemampuan hidup embrio somatik purwoceng terhambat secara nyata pada suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  dengan lama periode inkubasi 1, 2, dan 3 bulan. Suhu  $32,8 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$  dengan lama periode inkubasi selama 2 dan 3 bulan telah melampaui *heat killing temperature* bagi embrio somatik purwoceng dengan persentase kematian mencapai lebih dari 80%.

Embrio somatik purwoceng masih dapat hidup, tumbuh, dan berkembang pada suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ . Pengaruh penghambatan suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  terhadap pertumbuhan dan perkembangan baru tampak nyata setelah periode inkubasi selama 3 bulan. Suhu  $23,3 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  dengan lama periode inkubasi 1, 2, dan 3 bulan tidak memberikan tekanan yang berarti terhadap kemampuan hidup eksplan.

Seleksi *in vitro* purwoceng untuk ketahanan terhadap suhu tinggi dapat dilakukan. Namun demikian masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan kisaran suhu optimum untuk seleksi yang diperkirakan berada pada kisaran suhu antara  $23,3 - 32,8^{\circ}\text{C}$  dengan periode inkubasi selama 2 atau 3 bulan.

## DAFTAR PUSTAKA

- ALSADON, A.A., M. A. WAHBALLAH, and S. O. KHALIL. 2006. *In vitro* evaluation of heat stress tolerance in some



- tomato cultivars. *J. King Saud Univ. Agric. Sci.* 19(1): 13-24.
- AMUTHA, R., S. MUTHULAKSMI, W. BABY RANI, K. INDIRA, and P. MAREESWARI. 2007. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for high temperature stress. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences.* 3(4): 245-251.
- BADAN PUSAT STATISTIK (BPS). 2006. *Statistik Perdagangan Indonesia* : Impor. Jilid ke-1. Jakarta : Biro Pusat Statistik.
- CHALUPA. 1987. Temperature. *In* Bonga, J.M. and D.J. Durzan (Eds). *Cell and Tissue Culture in Forestry. Volume I, General Principles and Biotechnology.* Dordrecht: Martinus Nijhoff Pub. p.142 - 151.
- DAS A, S.S. GOSAL, J.S. SIDHU, and H.S. DHALI WAL. 2000. Induction of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation. *Euphytica.* 114(3):205 - 209.
- DEKOV, I., T. TSONEVDA and I. YORDANOV. 2001. Effects of water stress and high-temperature stress on the structure and activity of photosynthetic apparatus of *Zea mays* and *Helianthus annuus*. *Photosynthetica.* 38(3) : 361-366.
- EFEUGLU, B. and S. TERZIOGLU. 2009. Photosynthetic responses of two wheat varieties to high temperature. *Eur. Asia J. Bio. Sci.* 3(13): 97-106.
- GOSAL, S.S., A. DAS, J. GOPAL, J.L. MINOCHA, H.R. CHOPRA, and H.S. DHALI WAL 2001. *In vitro* induction of variability through radiation for late blight resistance and heat tolerance in potato. *In : In vitro techniques for selection of radiation induced mutation adapted to adverse environmental conditions.* Proceeding of a final Research Co-ordination Meeting; Shanghai, 17-21 August 1998. Vienna : FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. p.7-13.
- HEYNE, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia.* Volume ke-3. Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan.
- ISMAIL, A.M., and A.E. HALL. 1999. Reproductive stage heat tolerance, leaf membrane thermostability, and plant morphology in cowpea. *Crop Sci.* 39: 1762-1768.
- KOTAK, S., J. LARKINDALE, U. LEE, P.VON KOSKULL-DO, E. VIERLING, and K.D. SCHARF. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology.* 10:310-316.
- LOKHANDE, S.D., K. OGAWA, A. TANAKA, and T. HARA. 2003. Effect of temperature on ascorbate peroxidase activity and flowering of *Arabidopsis thaliana* ecotypes under different light conditions. *J. Plant Physiol.* 160: 57-64.
- LEVITT, J. 1980. *Responses of Plants to Environmental Stress.* Volume ke-1, Chilling, Freezing, and High Temperature Stress. New York: Academic Press.
- LI, B. and D.J. WOLYN. 1996. Temperature and genotype affect asparagus somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant.* 32 (3) 136-139.
- MAESTRI E, N. KLUEVA, C. PERROTA, M. GULLI, H.T. NGUYEN, and N. MARMIROLI. 2002. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Molec Biol.* 48 : 667-681.
- RAHARDJO M, S. WAHYUNI, O. TRISILAWATI dan E. DJAUHARIYA 2006. Ciri agronomis, mutu dan lingkungan tumbuh tanaman obat langka purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.). *In: Supriadi, M. Januwati, R. Balfas, N. Bermawie, M. Rahardjo (Eds). Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVIII; Bogor, 15 – 16 September 2005.* Bogor: Balitro-POKJANAS TOI-Dir. Tanaman Sayuran dan Biofarmaka. p.62-71.
- ROOSTIKA I, I. DARWATI dan I. MARISKA. 2005. Micripropagation of purwoceng (*Pimpinella alpina* KDS) through organogenesis and somatic embryogenesis. Presented in Seminar on Asean Science and Technology Week; Jakarta, 5-7 August 2005.
- ROUX NS. 2004. Mutation induction in musa – a review. *In: Jain SM, and R. Swennen (Eds). Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations.* Enfield: Sci. Pub. Inc. p.21-29.
- SUNG, D.Y., F. KAPLAN, K.J. LEE, and C.L.GUY. 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends In Plant Science.* 8(4) : 179-187
- TAIZ L, ZEIGER E. 2002. *Plant Physiology.* Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- THUZAR, M., A. B. PUTEH., N. A. P. ABDULLAH, M. B. MOHD. LASSIM and K. JUSOFF. 2010. The effects of temperature stress on the quality and yield of soya bean (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Agricultural Science.* 2(1): 172-179
- VAZ, A.P.A., R.C.F. RIBEIRO and G.B. KERBAUY. 2004. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry.* 42: 411-415
- WAHID, A, S. GELANI, M. ASHRAF, and M.R. FOOLAD. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ Exp Bot* 61: 199-223.
- WU, M., S.J. WALLNER, and J.W. WADDEL. 1984. Heat stress responses in cultured plant cell. *Plant Physiol.* 74: 944 - 946.
- ZHEN, H.R. 2001. *In vitro* technique for selection of radiation induced mutants of garlic. *In: In vitro techniques for selection of radiation induced mutation adapted to adverse environmental conditions.* Proceeding of a final Research Co-ordination Meeting; Shanghai, 17-21 Agustus 1998. Vienna : FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. p.75 - 78.



