

Variasi Rasio Amonium dan Nitrat terhadap Perkembangan Embrio Somatik Bawang Putih (*Allium sativum*) secara *In Vitro*

SINGGIH TRI WARDANA

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

Abstract: This research was aimed to conduct different $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ ratios on the development of somatic embryos of garlic (*Allium sativum*) by *in vitro* technique. This research used complete random design with four levels of $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ ratios, i.e. 1:2, 1:3, 1:4, and 1:5. The cell suspension culture used MS medium with 0,25 mg l⁻¹ BAP. The results showed that the different $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ ratios resulted significant effect on the development of somatic embryos (globular, scutelar, and coleoptiler stages). 1:3 ratio of $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ was optimum to improve the development of somatic embryos.

Keywords: $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ ratios, somatic embryo, garlic, *in vitro*

1 PENDAHULUAN

Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan salah satu komoditi sayuran yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Tanaman ini mengandung vitamin A, B₁, B₂, dan C serta sejumlah mineral (sulfur, potassium, besi, iodine, fosfor dan selenium). Tanaman ini juga mengandung senyawa metabolit inulin dan allicin yang dapat dimanfaatkan sebagai antibiotik, antiparasitik, antioksidan, antimikroba antivirus, antitumor, antitrombin, menghambat penebaran dini dan menurunkan kolesterol (Schwartz dan Krishna, 1999 ; Amagase, 2006).

Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan anggota famili Liliaceae, tumbuhan ini memiliki bunga yang steril sehingga tidak dapat menghasilkan biji. Selama ini perbanyakan tanaman bawang putih dilakukan secara vegetatif, yaitu dengan menggunakan umbi (*bulbus*). Masalah yang sering dijumpai dalam perbanyakan menggunakan umbi ini adalah tanaman yang dihasilkan tidak seragam, jumlah produksi yang belum mencukupi kebutuhan, serta penyebaran virus yang tidak terkendali (Ayabe dan Sumi, 1998). Usaha untuk mengatasi kendala yang dijumpai pada perbanyakan secara konvensional tanaman bawang putih adalah dengan teknik kultur *in vitro* yaitu melalui embriogenesis somatik. Menurut Rao (1996), embriogenesis somatik secara *in vitro* merupakan pilihan perbanyakan vegetatif yang tepat, efisien dan lebih praktis untuk perbanyakan klonal, karena dapat diperoleh tanaman yang seragam dalam jumlah besar. Hal ini disebabkan embrio somatik yang dihasilkan bersifat bipolar seperti embrio zigotik, yaitu calon tunas dan calon akar terbentuk

secara bersamaan sehingga tahap perakaran tidak diperlukan.

Perbanyakan tanaman bawang putih melalui embriogenesis somatik secara *in vitro* menghasilkan bibit tanaman dalam jumlah besar dan secara genetik identik dengan induknya (Bockish *et al*, 1997 ; Ayabe dan Sumi, 1998), dapat menghasilkan bibit tanaman yang bebas virus (Ayabe dan Sumi, 2001), embrio somatik yang terbentuk selanjutnya dapat digunakan untuk membuat biji artifisial (Kim dan Park, 2002).

Embriogenesis somatik secara *in vitro* melalui dua fase utama. Pertama, diferensiasi sel-sel somatik membentuk sel embriogenik, dilanjutkan proliferasi sel embriogenik tersebut. Kedua, sel-sel embriogenik berdiferensiasi membentuk embrio somatik (Jimenez, 2001). Faktor yang mempengaruhi perkembangan sel embriogenik membentuk embrio somatik salah satunya adalah sumber nitrogen dan konsentrasi nitrogen. Di dalam medium yang digunakan untuk kultur *in vitro*, sumber nitrogen terdapat dalam bentuk nitrogen anorganik berupa amonium (NH_4) dan nitrat (NO_3), dan nitrogen organik berupa asam amino, antara lain glutamin, alanin, asam glutamat, asparagin, dan prolin (George, 1993).

Penambahan maupun pengurangan konsentrasi nitrogen berpengaruh pada embriogenesis somatik. Penambahan maupun pengurangan konsentrasi NH_4^+ dan NO_3^- pada medium dasar mengakibatkan perubahan rasio antar kedua sumber nitrogen tersebut.

Pengaruh rasio NH_4^+ dan NO_3^- terhadap embriogenesis somatik, antara lain pada *Medicago sativa*

diperlukan 12 mM NH_4^+ dan 48 mM NO_3^- atau rasio NH_4^+ dan NO_3^- adalah 1 : 4 untuk induksi sel embriogenik, sedang untuk diferensiasi sel embriogenik membentuk embrio somatik diperlukan 20 mM NH_4^+ dan 40 mM NO_3^- atau rasio NH_4^+ dan NO_3^- adalah 1 : 2 (Meijer dan Brown, 1987). Pada *Citrus sinensis* menunjukkan penambahan berat kalus embriogenik yang paling tinggi dengan perlakuan rasio NH_4^+ dan NO_3^- yaitu 1 : 3 (Niedz, 1994). Wardana (2004) melaporkan bahwa rasio NH_4^+ dan NO_3^- yaitu 1 : 3 berpengaruh positif dalam induksi kalus embriogenik pada *Allium sativum*.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan rasio ammonium dan nitrat ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$) terbaik untuk memacu perkembangan (diferensiasi) embrio somatik bawang putih (*Allium sativum* L.) secara *in vitro*.

Diharapkan hasil penelitian ini dapat sebagai informasi dasar studi embriogenesis somatik, khususnya pada *Allium sativum* L., dan sebagai alternatif metode perbanyak klonal *Allium sativum* L.

2 METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya, Palembang. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus embriogenik bawang putih hasil koleksi, Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan, termasuk kontrol (Tabel 1.). Masing-masing perlakuan dengan ulangan 20 kali.

Tabel 1. Perlakuan rasio NH_4^+ dan NO_3^- yang bervariasi (Wardana, 2004).

Perlakuan	Konsentrasi Sumber Nitrogen	Konsentrasi (mM) $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	Rasio $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	Nitrogen Total (mM)
K (kontrol)	20 mM NH_4NO_3 20 mM KNO_3	20 : 40	1 : 2	60
S1	15 mM NH_4NO_3 30 mM KNO_3	15 : 45	1 : 3	60
S2	12 mM NH_4NO_3 36 mM KNO_3	12 : 48	1 : 4	60
S3	10 mM NH_4NO_3 40 mM KNO_3	10 : 50	1 : 5	60

Penelitian ini digunakan metode kultur suspensi dengan media dasar MS.. Koleksi kalus embriogenik bawang putih sebanyak 2 g dibuat suspensi sel ke dalam 50 ml medium dasar dengan penambahan 1 mg.l⁻¹ 2,4-D, dan diperlakukan secara agitasi dengan menggunakan shaker pada kecepatan 100 rpm selama 2 – 5 jam. Kemudian kecepatan shaker diturunkan sampai 60 rpm selama 7 hari. Selanjutnya sebanyak 1,5 ml suspensi sel tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi 6 ml medium perlakuan (medium dasar MS dengan penambahan 0,25 mg.l⁻¹ BAP dengan rasio $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ yang bervariasi seperti pada Tabel 1.), dan dipelihara secara statis dalam kondisi aseptis dalam ruang inkubasi dengan suhu 25 - 26 °C, serta dalam kondisi terang, selama 3 minggu. Dilakukan pengamatan dan subkultur setiap 7 hari sekali. Pengamatan dan penghitungan jumlah embrio somatik digunakan *haemocytometer* dan *hand counter* di bawah mikroskop cahaya. Data kuantitatif dianalisis dengan sidik ragam pada taraf 5 %, jika ada perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf 5 %. Data yang bersifat kualitatif dianalisis secara deskriptif.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan embrio somatik pada penelitian ini serupa dengan perkembangan embrio zigotik pada tanaman monokotil secara umum, yaitu berturut-turut dari stadium globuler, skutelar, dan koleoptiler. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA), perlakuan rasio NH_4^+ dan NO_3^- berpengaruh nyata terhadap perkembangan embrio somatik, baik pada stadium globuler, skutelar, dan koleoptiler. Kedua hal tersebut di atas menunjukkan bahwa nitrogen dalam bentuk NH_4^+ dan NO_3^- berperan penting dalam embriogenesis somatik pada *Allium sativum* L., dan rasio NH_4^+ dan NO_3^- sangat menentukan perkembangan embrio somatik pada *Allium sativum* L. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Singh *et al.* (1999) yang menyatakan bahwa senyawa nitrogen berfungsi sebagai karier, katalis, transporter, atau molekul pengatur lain dalam proses aktivasi sistem sinyal transduksi yang dapat merubah struktur kromatin, transkripsi atau jalur lain, sehingga gen yang mengkode pembentukan embrio somatik mampu diekspresikan.

Hasil penelitian variasi rasio amonium dan nitrat terhadap perkembangan embrio somatik bawang

putih disajikan pada Tabel 2. berikut ini.

Tabel 2. Pengaruh rasio NH_4^+ dan NO_3^- terhadap rerata jumlah embrio somatik pada tiap stadium perkembangan embrio.

Perlakuan	Rasio $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	Stadium Perkembangan Embrio (embrio/ml suspensi)		
		Globuler	Skutelar	Koleoptiler
K (kontrol)	1 : 2	$4,24 \cdot 10^5$ a	$6,64 \cdot 10^5$ a	$6,48 \cdot 10^5$ a
S1	1 : 3	$4,84 \cdot 10^5$ a	$6,86 \cdot 10^5$ a	$8,24 \cdot 10^5$ b
S2	1 : 4	$2,68 \cdot 10^5$ b	$2,24 \cdot 10^5$ b	$2,04 \cdot 10^5$ c
S3	1 : 5	$1,26 \cdot 10^5$ c	$0,48 \cdot 10^5$ c	$0,24 \cdot 10^5$ d

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada uji LSD 5%.

Rasio NH_4^+ dan NO_3^- yaitu 1 : 2 dan 1 : 3 terjadi peningkatan jumlah embrio somatik yang lebih baik bila dibandingkan dengan rasio 1 : 4 dan 1 : 5. Pada rasio NH_4^+ dan NO_3^- 1 : 4, walaupun embrio somatik yang terbentuk mengalami perkembangan sampai pada stadium koleoptiler, tetapi jumlah embrio somatik tiap-tiap stadium perkembangan lebih rendah dibanding pada rasio 1 : 2 dan 1 : 3. Hal ini diduga pada rasio 1 : 4, penyerapan NH_4^+ dan NO_3^- oleh sel embrio somatik mulai terhambat. Penghambatan penyerapan NH_4^+ dan NO_3^- terutama terjadi pada rasio 1 : 5. Penghambatan penyerapan NH_4^+ dan NO_3^- ini terjadi karena terjadi peningkatan pH medium yang menjadi lebih alkalis (basa). Perubahan pH medium menjadi lebih alkalis karena konsentrasi NO_3^- jauh lebih tinggi dari konsentrasi NH_4^+ . Rendahnya NH_4^+ dan NO_3^- yang terserap oleh sel menyebabkan rendahnya inkorporasi NH_4^+ dan NO_3^- dalam membentuk senyawa yang lebih kompleks yang berperan dalam embriogenesis somatik, sehingga perkembangan embrio somatik terhambat.

NH_4^+ dan NO_3^- pada rasio 1 : 2 dan 1 : 3, embrio somatik berkembang dengan baik, terutama pada rasio 1 : 3, dimana jumlah embrio somatik pada tiap-tiap stadium lebih tinggi dibanding rasio 1 : 2. Hal tersebut menunjukkan NH_4^+ dan NO_3^- terserap dengan baik oleh sel, sehingga dapat berinkorporasi membentuk senyawa yang lebih kompleks yang berperan dalam embriogenesis somatik. Perubahan pH medium pada rasio 1 : 2 maupun 1 : 3 diduga tetap pada kisaran netral, sehingga penyerapan NH_4^+ dan NO_3^- maupun komponen medium lainnya tidak terhambat. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Niedz (1994) bahwa perbandingan NH_4^+ dan NO_3^- pada rasio 1 : 3 menyebabkan perubahan pH pada kisaran netral, dan terjadi peningkatan berat basah kalus embriogenik, serta diferensiasi embrio somatik.

Penyerapan NH_4^+ dan NO_3^- serta inkorporasinya dalam membentuk senyawa yang lebih kompleks da-

pat dijelaskan oleh pendapat Stasolla *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa NH_4^+ yang diserap langsung oleh sel maupun NH_4^+ hasil reduksi NO_3^- akan segera dimetabolisir membentuk asam amino glutamin, asam glutamat dan arginin. Thorpe dan Stasolla (2001) menambahkan bahwa akumulasi glutamin di dalam sel akan meningkatkan sintesis asam amino triptofan sebagai prekursor auksin endogen (IAA). IAA (*indole acetic acid*) berperan dalam mengaktivasi sinyal transduksi sehingga sel dapat mengadakan pemrograman kembali ekspresi gen dan menginduksi pembelahan sel ke arah embriogenesis somatik.

Joy *et al.* (1997) melalui studi spektroskopik ^{15}N NMR, menjelaskan bahwa setelah masuk ke dalam sel, maka NH_4^+ dan NO_3^- dapat mengadakan inkorporasi membentuk asam amino glutamin, asam glutamat dan alanin. Selanjutnya pada perkembangan embrio dapat dideteksi terbentuk arginin dan poliamin sebagai hasil inkorporasi glutamin, asam glutamat dan alanin. Santanen dan Simola (1994) menambahkan bahwa pada kalus embriogenik, konsentrasi S-adenosil metionin (SAM) dekarboksilase lebih tinggi dibanding pada kalus non embriogenik. SAM berfungsi antara lain untuk biosintesis poliamin yang diperlukan dalam pengaturan dan perkembangan embrio somatik.

Berdasarkan pada tersebut diatas, maka pengaruh rasio NH_4^+ dan NO_3^- yang berbeda terhadap perkembangan embrio somatik pada penelitian ini, terutama berhubungan dengan 3 hal pokok, yaitu : 1) penyerapan NH_4^+ dan NO_3^- , 2) perubahan pH medium kultur, dan 3) inkorporasi NH_4^+ dan NO_3^- membentuk senyawa yang lebih kompleks yang berperan dalam embriogenesis somatik.

4 SIMPULAN

Rasio NH_4^+ dan NO_3^- berpengaruh nyata terhadap perkembangan embrio somatik bawang putih secara *in vitro*, baik pada stadium globuler, skutelar, dan

koleoptiler. Perkembangan embrio somatik paling optimal pada rasio NH_4^+ dan NO_3^- 1 : 3.

REFERENSI

- [1] Amagase H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.* 136: 716-725.
- [2] Ayabe M. & Sumi S. 1998. Establishment of novel tissue culture method stem-disc culture and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 17: 773-779.
- [3] Ayabe M. & Sumi, S. 2001. A novel and efficient tissue culture method – “stem-disc dome culture” – for producing virus free garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 503-507.
- [4] Bockish T, Saranga Y, Altman. 1997. A Garlic micropropagation by somatic embryogenesis. *Acta Hort.* 447: 241-242.
- [5] George EF. 1993. *Plant propagation by tissue culture: The Technology, Part 1 2nd edition*. Exegetic Limited, London. England.
- [6] Jimenez VM. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.* vol. 13, no. 2:196-223.
- [7] Joy IVRW., Vogel HJ & Thorpe TA. 1997. Inorganic nitrogen metabolism in embryogenic white spruce cultures :A nitrogen 14 – 15 NMR study. *J. Plant Physiol.* 151 : 306 – 315.
- [8] Kim MA & Park JK. 2002. High frequency plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) calli immobilized in calcium alginate gel. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 206-211.
- [9] Meijer EGM & Brown DCW. 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 10:11-19.
- [10] Niedz RP. 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrat to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39 : 1-5.
- [11] Rao KS. 1996. Embryogenesis in flowering plants: recent approaches and prospects. *Journal of Biosciences.* Vol.21, No.6: 827-841.
- [12] Santanen A & Simola LK. 1994. Catabolism of putrescine and spermidine in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Picea abies*. *Physiologia Plantarum.* 90 : 125 – 129.
- [13] Schwartz HF & Krishna SM. 1999. *Compendium of Onion and Garlic Diseases*, the American Phytopathological Society, St. Paul, USA.
- [14] Singh RP, Murch SJ & Saxena PK. 1999. *Role of nitrogen in morphogenesis in vitro*. Science Publisher Inc. USA.
- [15] Stasolla C, Yeung EY & Thorpe TA. 2003. *Somatic embryogenesis in white spruce : physiology and biochemistry*. Dalam : Bhojwani, S.S. dan W.Y. Soh (eds). *Agrobiotechnology and plant tissue culture*. Science Publ. Inc. Enfield, NH, USA.
- [16] Thorpe TA & Stasolla C. 2001. *Somatic embryogenesis*. Dalam : Bhojwani, S.S. dan W.Y. Soh (eds). *Current trends in the embryology of angiosperm*. Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands.
- [17] Wardana ST. 2004. Induksi kalus embriogenik bawang putih (*Allium sativum* L.) dengan rasio NH_4^+ : NO_3^- yang bervariasi. *Jurnal Penelitian Sains.* 16 : 88 – 96. _____