

Analisis Tahapan Perkembangan Mikrospora *Citrus hystrix*

An Analysis of the Developmental Stages Microspores in *Citrus hystrix*

Devi Bunga Pagalla^{1)*}, Jusna Ahmad¹⁾, Ramlah²⁾

¹⁾ Prodi Biologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Gorontalo

²⁾ Prodi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sulawesi Barat

*Email: devibungapagalla@ung.ac.id

diterima : 28 Oktober 2024; dipublikasi : 31 Maret 2025

DOI: 10.32528/bioma.v10i1.2592

ABSTRAK

Setiap mikrospora berpeluang untuk berkembang menjadi individu baru apabila dikulturkan dalam medium yang sesuai karena setiap sel tersebut memiliki sifat totipotensi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis tahap perkembangan mikrospora berdasarkan panjang kuncup bunga tanaman jeruk purut yang beragam. Tahap ini merupakan langkah awal yang sangat penting sebelum memulai program pemuliaan tanaman menggunakan teknik kultur antera atau mikrospora. Dalam penelitian ini, tahap perkembangan mikrospora diamati pada 13 kuncup bunga yang telah diukur panjangnya. Mikrospora diamati dengan metode sederhana, yaitu menghancurkan dua antera dalam cawan petri berisi lima tetes air steril, kemudian campuran tersebut dipindahkan ke kaca preparat untuk pengamatan mikroskopis. Selain itu, dilakukan juga pengamatan morfologi antera, penghitungan jumlah antera, dan kelopak bunga pada setiap kuncup bunga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa di antara 13 kuncup bunga yang diamati, tidak semua tahap perkembangan mikrospora teramati. Tahap serbuk sari matang (*mature pollen*) lebih sering teramati. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk mengoptimalkan proses identifikasi kondisi morfologi kuncup bunga jeruk purut yang mengandung mikrospora untuk memulai kultur mikrospora.

Kata kunci: Perkembangan, Mikrospora, *Citrus hystrix*

ABSTRACT

Microspores have the potential to develop into new individuals when cultured in an appropriate medium, as each of these cells possesses totipotency. This study aims to analyze the developmental stages of microspores in the flower buds of kaffir lime (*Citrus hystrix*) plants of varying sizes. This stage is a crucial initial step before initiating a plant breeding program using anther or microspore culture techniques. In this study, the developmental stages of microspores were observed in 13 flower buds measured for length. Microspores were examined using a simple method: two anthers were crushed in a petri dish containing five drops of sterile water, and the mixture was then transferred to a glass slide for microscopic observation. Additionally, morphological observations of the anthers were conducted, along with counts of the number of anthers and petals in each flower bud. The results showed that among the 13 flower buds observed, not all stages of microspore development were found. The mature pollen stage was more frequently observed. These findings can serve as a reference to optimize the identification process of kaffir lime flower bud morphology that contains microspores as an initial step for initiating microspore culture.

Keywords: Developmental Stages, Microspores, *Citrus hystrix*

PENDAHULUAN

Benang sari (*stamen*) adalah organ reproduksi jantan pada tanaman berbunga, terdiri atas antera dan filamen. Antera berfungsi sebagai tempat pembentukan serbuk sari (*pollen*), yaitu unit utama dalam penyebaran materi genetik, sedangkan filamen berperan sebagai penyangga antera dan jalur suplai air serta nutrisi bagi perkembangan serbuk sari (Scott *et al.*, 2004). Di dalam antera, mikrospora sebagai tahap awal gamet jantan terbentuk melalui proses meiosis dari mikrosporosit. Mikrospora yang haploid ini kemudian berkembang menjadi serbuk sari matang yang mampu membuahi sel telur (Touraev *et al.*, 1997). Perkembangan gamet jantan meliputi dua fase utama: mikrosporogenesis dan mikrogametogenesis (Bhojwani dan Bhatnagar, 1999). Mikrosporogenesis dimulai dari pembentukan mikrosporosit, yang mengalami meiosis menghasilkan empat mikrospora haploid dalam bentuk tetrad. Tetrad kemudian terpisah menjadi mikrospora muda melalui enzim dari tapetum yaitu lapisan penyedia nutrisi penting dalam antera (Scott *et al.*, 2004). Fase selanjutnya, mikrogametogenesis, mencakup transformasi morfologi mikrospora yang melibatkan pembesaran vakuola, polarisasi inti sel, serta pembelahan asimetris menjadi dua sel: vegetatif (penyedia nutrisi) dan generatif (pembentuk gamet jantan) (Bhojwani dan Bhatnagar, 1999; Borg *et al.*, 2008).

Mikrospora merupakan sel perkembangbiakan jantan yang dihasilkan didalam antera. Antera berada di dalam kuncup bunga dan ukurannya bervariasi pada setiap tanaman (Browne *et al.*, 2018). Kultur mikrospora merupakan teknik penting dalam pemuliaan tanaman modern, karena memungkinkan produksi tanaman homozigot dalam waktu singkat. Teknik ini mengubah jalur perkembangan mikrospora dari gametofitik menjadi sporofitik, sehingga mikrospora dapat berkembang menjadi embrio atau kalus haploid. Embrio tersebut kemudian diregenerasi menjadi tanaman melalui pembentukan tunas dan akar, menghasilkan tanaman haploid ganda dengan sifat homozigot (Ferrie dan Keller, 1995).

Embriogenesis mikrospora atau androgenesis biasanya dipicu oleh perlakuan stres yang memicu dediferensiasi dan pengalihan jalur perkembangan mikrospora menjadi embriogenik (Soriano *et al.*, 2013). Keberhasilan proses ini dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti genotipe tanaman, tahap perkembangan mikrospora, media kultur, konsentrasi zat pengatur tumbuh, serta perlakuan awal seperti stres atau pre-treatment (Irikova *et al.*, 2016). Salah satu aspek penting adalah keterkaitan antara ukuran kuncup bunga dan tahap perkembangan mikrospora, yang menentukan waktu optimal untuk induksi androgenesis. Beberapa penelitian telah menegaskan bahwa hanya tahap tertentu dalam perkembangan mikrospora yang penting bagi keberhasilan induksi (Yin *et al.*, 1982; Salas *et al.*, 2011; Pratama, 2015). Menurut Cardoso *et al.* (2014) kultur antera pada jeruk manis (*Citrus sinensis*) memiliki tingkat keberhasilan yang rendah, namun beberapa genotipe, terutama jeruk manis seperti Tarocco, Moro, dan Sanguinelli, mampu membentuk kalus embriogenik. Perkembangan mikrospora dari jalur gametofitik ke sporofitik berhasil diamati, namun kalus yang dihasilkan sebagian besar bersifat heterozigot. Sebaliknya, jeruk hibrida *C. clementina* × *C. sinensis* menunjukkan respons yang lebih baik dengan menghasilkan kalus embriogenik trihaploid dan embrio homozigot, hal ini menegaskan bahwa *C. clementina* lebih responsif terhadap embriogenesis mikrospora melalui kultur antera. Dalam penelitian ini berfokus pada analisis tahap perkembangan mikrospora berdasarkan panjang kuncup bunga *Citrus hystrix* yang berbeda. Analisis ini penting dilakukan sebelum proses kultur

mikrospora, guna mengidentifikasi ukuran kuncup bunga yang sesuai dengan tahap perkembangan mikrospora yang optimal. Informasi ini diperlukan untuk mendukung optimalisasi teknik perbanyakan *Citrus hystrix* melalui pendekatan kultur mikrospora.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2024 di Laboratorium Botani, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Gorontalo. Sumber eksplan adalah bunga *Citrus hystrix* yang masih kuncup hingga bunga yang telah mekar (Gambar 1). Eksplan dipilih secara acak (random). Sebelum dilakukan pengamatan terhadap mikrospora dari setiap kuncup bunga, terlebih dahulu dilakukan pengukuran panjang kuncup bunga, perhitungan jumlah antera per kuncup, serta perhitungan jumlah kelopak bunga per kuncup. Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini mencakup data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif meliputi panjang kuncup bunga, jumlah antera, dan jumlah kelopak bunga, sementara data kualitatif mencakup tahap perkembangan mikrospora yang diamati pada 13 kuncup bunga yang berbeda. Pengamatan tahap perkembangan mikrospora menggunakan mikroskop binokuler (NIKON). Pengambilan gambar menggunakan kamera *handphone* (Vivo X70 Pro) pada perbesaran 1x.

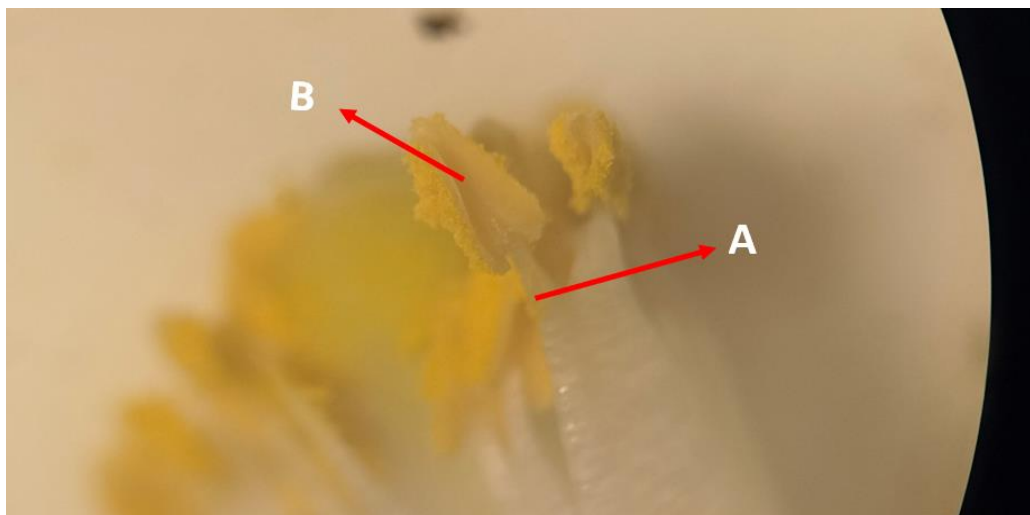
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kuncup bunga merupakan salah satu sumber eksplan yang umum digunakan dalam teknik kultur mikrospora maupun kultur antera. Di dalam kuncup bunga terdapat antera, yang menjadi fokus dalam metode kultur antera. Kultur antera sendiri merupakan salah satu teknik bioteknologi yang memungkinkan produksi tanaman homozigot hanya dalam satu tahap. Sedangkan kultur mikrospora bertujuan untuk mengarahkan mikrospora yaitu gamet jantan yang belum matang beralih dari jalur perkembangan gametofitik ke jalur sporofitik. Proses ini membutuhkan pemberian stres tertentu, seperti suhu ekstrem, kekurangan nutrisi, atau paparan medan magnet. Stres ini bisa diberikan pada tanaman donor, kuncup bunga, antera, atau mikrospora yang diisolasi, baik sebelum maupun selama kultur (Chiancone dan Germana, 2016). Yahyaoui dan Germana (2021) menjelaskan bahwa embriogenesis mikrospora memungkinkan gamet jantan yang belum matang diarahkan ke jalur sporofitik, sehingga menghasilkan embrio atau tanaman yang bersifat homozigot.

Tahap perkembangan mikrospora diamati pada 13 kuncup bunga *Citrus hystrix* yang dipetik secara acak. Morfologi 13 bunga *Citrus hystrix* dapat dilihat pada Gambar 1. Beberapa bunga memiliki panjang kuncup bunga yang sama dimana, bunga 1: 0.4 cm; 2-4: 0.5 cm; 5-7: 0.6 cm; 8-9: 0.7 cm; 10: 0.8 cm; 11: 0.9 cm; dan bunga 12-13 adalah bunga yang telah mekar.



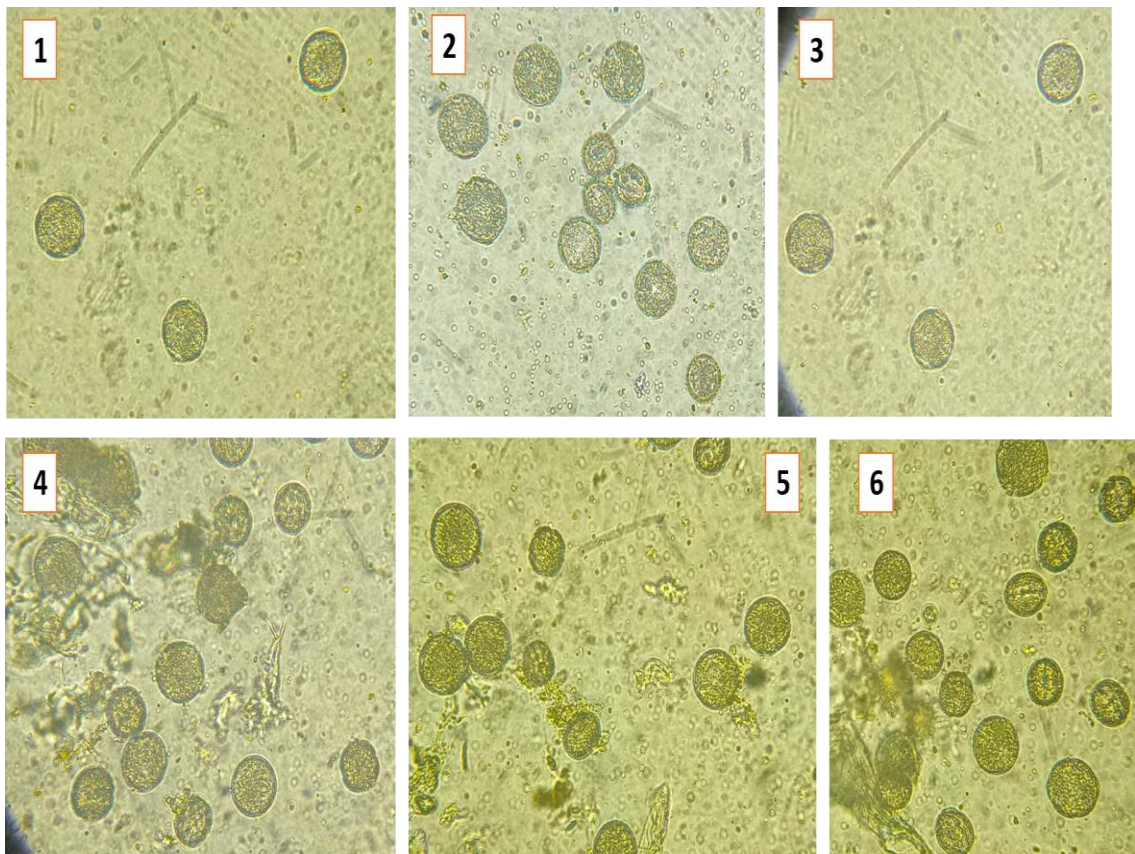
Gambar 1. Kuncup bunga *Citrus hystrix* berbagai ukuran (Bar 10 mm).

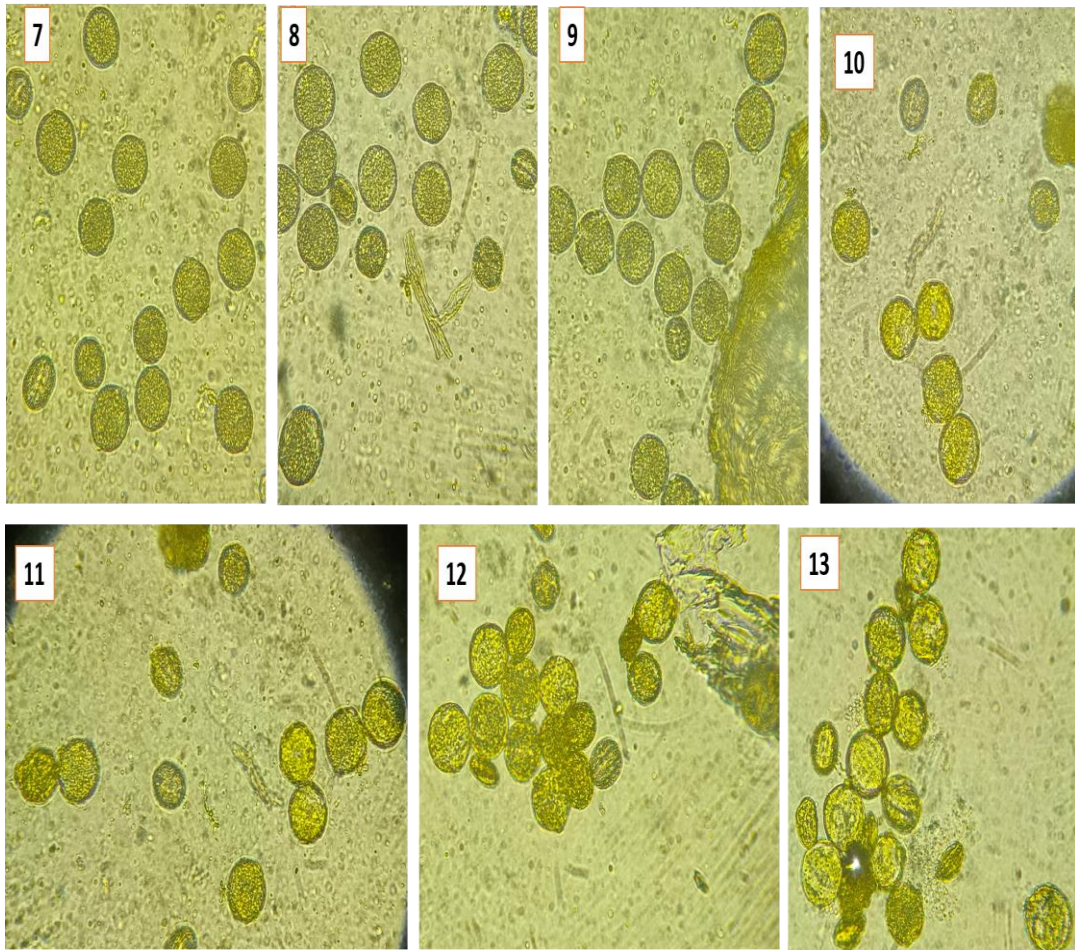


Gambar 2. Morfologi antera pada bunga *Citrus hystrix* yang telah mekar. A) Filamen, B) Kepala sari

Kepala sari mengandung butiran serbuk sari berwarna kuning pada bunga yang telah mekar (Gambar 2). Tahap perkembangan mikrospora yang teramati pada 13 kuncup bunga (Gambar 3) secara keseluruhan merupakan tahap uninukleat akhir (*late uninucleate*) sampai *pollen* matang (*mature pollen/MP*) dimana mengandung amilum (pati) berbentuk butiran hitam yang memenuhi ruang sel mikrospora. Pada panjang kuncup bunga 0.4 – 0.7 cm ditemukan dominan *pollen* matang, sehingga belum dapat ditentukan panjang kuncup bunga tertentu yang mengandung *vacuolated microspore* ataupun *young bicellular pollen* yang memiliki peluang besar untuk diinduksi membentuk mikrospora yang embriogenik. Dalam penelitian Salas *et al.*, (2012) dikemukakan bahwa terdapat tujuh tahap mikrospora yaitu mikrospora tetrad, muda (*young microspore/YM*), tengah, (*mid-microspore/MM*), dan akhir (*late/vacuolate microspore/VM*), dan polen muda (*young pollen*), tengah (*mid pollen*), akhir (*late pollen*), dan polen dewasa (*mature pollen*) yang dibentuk berdasarkan kriteria morfologi seperti ukuran dan bentuk sel, jumlah, tipe dan posisi nukleus.

Menurut Chiancone dan Germana (2016), mikrospora pada tahap belum matang merupakan mikrospora yang dapat diberi perlakuan *stress* untuk membelokkan arah perkembangannya dari gametofitik menjadi sporofitik. Dalam penelitian Pagalla *et al.*, (2020), menggunakan kuncup bunga terong yang mengandung mikrospora *vacuolated microspore* (VM) dan *young bicellular pollen* (YBP) dengan persentase yang tinggi untuk diinduksi membentuk mikrospora yang embriogenik. Penelitian Salas *et al.*, (2012) mengungkapkan bahwa kuncup bunga terong yang mengandung stadium mikrospora uninukleat akhir dan binukleat awal sekitar 70 % adalah fase yang tepat untuk induksi androgenesis. Pada penelitian Kurtar *et al.* (2023) ditemukan bahwa tahap *late* uninukleat hingga *early* binukleat adalah tahap paling cocok untuk induksi embriogenesis dalam kultur antera *citron watermelon*. Kuncup bunga *Citrus hystrix* yang digunakan dalam penelitian ini tidak disimpan pada suhu 4°C sebelumnya atau tidak diberi perlakuan stres suhu sehingga mikrospora yang teramati merupakan mikrospora pada perkembangan normal.





Gambar 3. Mikrospora yang teramati pada 13 kuncup bunga *Citrus hystrix*, perbesaran 40x

Berdasarkan data pada Tabel 1. ditemukan 15-20 antera dalam satu kuncup bunga, dan umumnya bunga *Citrus hystrix* memiliki 3-5 kelopak bunga. Panjang kuncup bunga tidak memiliki korelasi terhadap jumlah antera dan jumlah kelopak bunga. Menurut penelitian Pagalla *et al.* (2020), panjang antera merupakan indikator yang memiliki korelasi yang tinggi terhadap tahap perkembangan mikrospora. Namun dalam penelitian ini belum dilakukan pengukuran panjang antera sebagai indikator untuk melihat korelasinya terhadap tahap perkembangan mikrospora pada *Citrus hystrix*. Menurut Segui-Simarro dan Nuez (2005) perbedaan tahap perkembangan mikrospora diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi mikrosporogenesis dan mikrogametogenesis. Kurtar *et al.* (2023) mengungkapkan bahwa terdapat korelasi yang kuat dan signifikan antara diameter mikrospora dengan ukuran kuncup bunga, indeks kuncup, posisi sepal, dan warna petal kuncup bunga semangka (*Citrullus lanatus* var. Citroides). Kuncup bunga ideal berada pada panjang 10–11 mm dan lebar 6–7 mm, indeks kuncup sekitar 0,66 dimana Sepal pada tahap ini masih lebih panjang dari petal.

Tabel 1. Hasil pengukuran panjang kuncup bunga, jumlah antera dan jumlah kelopak

No	Panjang kuncup bunga (cm)	Jumlah antera/bunga	Jumlah Kelopak/bunga
1	0.4	17	5
2	0.5	18	4
3	0.5	20	5
4	0.5	19	4
5	0.6	16	4
6	0.6	15	4
7	0.6	18	5
8	0.7	15	4
9	0.7	17	5
10	0.8	15	3
11	1.00	17	4
12	Bunga Mekar	-	3
13	Bunga Mekar	-	4

KESIMPULAN DAN SARAN

Morfologi panjang kuncup bunga *Citrus hystrix* tidak menunjukkan korelasi yang jelas terhadap tahap perkembangan mikrospora. Hal ini dapat dilihat pada mikrospora matang (*mature pollen*) ditemukan pada berbagai ukuran panjang kuncup bunga, sehingga panjang kuncup bunga kurang dapat diandalkan sebagai indikator menentukan tahap perkembangan mikrospora. Pengukuran panjang antera sebaiknya dipertimbangkan sebagai parameter alternatif, karena pada berbagai spesies tanaman, panjang antera terbukti memiliki korelasi yang lebih konsisten dengan tahap perkembangan mikrospora.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani, S.S., and Bhatnagar, S.P. 1999. *The Embryology of Angiosperm, 4th Revised and Enlarged Edition*. Vika's Publishing House PVT LTD. New Delhi: P16-28.
- Borg, M., Brownfield, L., and Twell, D. 2008. Review Paper: Male Gametophyte Development: a Molecular Perspective. *Journal of Experimental Botany*. 60 (5):1465-1478.
- Browne, R.G., Lacuone, S., Li, F.S., Dolferus, R., and Parish, R.W. 2018. Anther Morphological Development and Stage Determination in *Triticum aestivum* *Front. Plant Sci.* 9:228.
- Cardoso, J.C., Martinelli, A.P., Germanà, M.A., & Latado, R.R. 2014. In vitro anther culture of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) genotypes and of a C.
- Devi Bunga Pagalla *et al.*, Studi Tahap...

- clementina* × *C. sinensis* ‘Hamlin’ hybrid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **117**, 455–464. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0456-x>
- Chiancone, B., and Germana, M.A. 2016. Microspore Embryogenesis Through Anther Culture in Citrus *clementina* Hort. ex Tan. In: Maria Antonietta Germanà and Maurizio Lambardi (eds.), *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology. Springer Science+Business Media: New York*. 1359.
- Ferrie, A.M.R., and Keller, W.A. 1995. Microspore Culture for Haploid Plant Production. O. L. Gamborg *et al.* (eds.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 155-164.
- Irikova, P., Kintzios, S., S. Grozeva, and Rodeva, V. 2016. Pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture: fundamental research and practical applications Teodora. *Turk J Biol* 40: 719-726. <https://doi.org/10.3906/biy-1506-79>
- Kurtar, E.S., Seymen, M., Alan, A.R., Toprak, F.C., Atakul, Z., Metin, D., Lachin, A. R., & Yirmibes, B. 2023. Determination of the Microspore Development Concerning Floral Morphology for Improving Drought Tolerant Citron Watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) Rootstocks Via Androgenesis. *Ann Agric Crop Sci*.8(2): 1130.
- Pagalla, D.B., Indrianto, A., Maryani, and Semiarti, E. 2020. Induction of Microspore Embryogenesis of Eggplant (*Solanum melongena* L.)”Gelatik”. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology (JTBB)*, 5(2):124.131. <https://doi.org/10.22146/jtbb.53677>
- Pratama, S.Y., 2015. Responsivitas dan Kapasitas Androgenesis beberapa Genotipe Cabai dan Terong dalam Kultur Antera pada Media Dua-Lapis. Institut Pertanian Bogor.
- Salas P., Prohens, J., and Segui,S.J.M .2011. Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. *Euphytica*. 182:261–274.
- Salas,P., Rivas-Sendra, A., Prohens, J., and Segui’-Simarro, J.M. 2012. Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica*. 184:235–250.
- Scott, R.J., Spielman, M., and Dickinson, H.G. 2004. Stamen Structure and Function. *The Plant Cell*. 16:S46-S60.
- Segui-Simarro, J.M., and Nuez, F. 2005. Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* Vol.27: 675-685.
- Soriano, M.,Li, H., and Boutilier, K. 2013. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod*. 26 :181–196.
- Touraev, A., O.Vicente, and E.Heberle-Bors. 1997. Initiation of Microspore Embryogenesis by Stress. *Trends Plant Sci*. 2 (8):297-302.
- Yahyaoui, E., and Germana, M.A. 2021. Microspore Embryogenesis in Citrus. *Methods Mol Biol* 2289:149-166. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_10
- Yin, G.C., Li, X.Z., Xu, Z., Chen, L., Zhu, Z.Y., and Bi, F.Y. 1982. Studies on Induction of Pollen Plant and their Adrogenesis in *Glycine Max* (L.).Merr. *Soybean Science*. 1(1):69-76.