

A SIALIDASE FROM HORSE LIVER WAS CO-PURIFIED WITH β -GALACTOSIDASE AND CARBOXYPEPTIDASE A

Sialidase Hati Kuda Terdapat sebagai Enzim Kompleks dengan β -Galaktosidase dan Carboxypeptidase A

Krishna Purnawan Candra

Chemistry and Biochemistry Laboratory of Agricultural Product Technology Department, Agricultural Faculty of Mulawarman University, Jl.Tanah Grogot Kampus UNMUL Gunung Kelua, Samarinda 75123

Received 4 April 2007 accepted 29 May 2007

ABSTRACT

The solubilized sialidase was purified using anion-exchange chromatography on Fractogel EMD TMAE-650 (M) followed by affinity chromatography on *p*-aminophenyl thio- β -D-galactopyranoside-agarose and chromatofocusing on PBE 94 with a factor and yield of about 18 and 0.2 %, respectively. The enzyme was found to be associated with β -galactosidase and carboxypeptidase A. The purified enzyme liberated sialic acid residues from sialooligosaccharides (α 2,3- was preferred than α 2,6-sialyllactose), sialoglycoprotein and ganglioside such as GM3 and GD1a, however, the GM2 and GD1b are not suitable substrates for the sialidase as were also shown for BSM and guinea pig serum. The Neu2en5Ac is a strong competitive inhibitor with K_i of 47.5 μ M.

Key words: Horse liver, sialidase, β -galactosidase, carboxypeptidase A, O-acetylated sialic acid.

INTRODUCTION

The interest in studying enzymes concerning sialic acids metabolism from animal-rich *O*-acetylated sialic acid has attracted much attention by the fact that little is known in the *O*-acetylated mechanism of sialic acid (Iwersen *et al.*, 1998; Tiralongo *et al.*, 2000; Shen dan Schauer, 2000). However, the catabolism of 4-*O*-acetylated neuraminic acid, which blocked most of sialidase activity, was first elucidated as esterase was found in horse liver and demonstrated that it involved in the 4-*O*-acetylated neuraminic acid. The esterase was first modified the acetyl at C-4 allowing the sialidase to hydrolyze the normal sialic acid from sialoglycoconjugate (Schauer *et al.*, 1988).

Previously, we have partially purified a sialidase from horse liver (Candra *et al.*, 2005). In the present study, we describe purification and characterization of sialidase from horse liver, which is distinct to the first sialidase we have isolated earlier. β -Galactosidase and carboxypeptidase A were co-purified during the purification.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Fresh horse liver was obtained from a local slaughterhouse. The liver was excised and stored at -20 °C until used. Fractogel EMD TMAE-650 (M) was purchased from Merck. *p*-Aminophenyl thio- β -D-galactopyranoside agarose and D-galactonic acid γ -lactone (γ -galactonolactone) were obtained from Sigma Chemical Ltd. Polybuffer exchanger 94 and Polybuffer 74 were from Pharmacia LKB. Sialyl-methylumbelliferyl α -glycoside (MU-Neu5Ac) was from Toronto Research Center (Toronto, Canada). α 2,3-sialyllactose and α 2,6-sialyllactose were obtained from our lab. GD1a and GD1b were purchased from Matreya Inc. (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Germany). NaCl was obtained from Reidel de Hæn (Seelze, Germany). All other reagents used were of analytical grade from Sigma Chemical Ltd. (Deisenhofen, Germany), Serva (Heidelberg, Germany) and Merck (Darmstadt, Germany). Triton X-100 was supplied by Biomol (Hamburg, Germany).

Enzyme assays

Sialidase and β -galactosidase activity were assayed using MU-Neu5Ac and MU-Gal respectively as described in (Candra *et al.*, 2000). For natural substrates, the free sialic acid released on sialidase activity assay was determined using thiobarbituric acid method (Warren, 1959). For sialidase assay on *O*-acetylated neuraminic acid using guinea pig serum and bovine submandibular mucin, the free neuraminic acid was detected using Fluorimetric-HPLC (Reuter dan Schauer, 1994). Carboxypeptidase A was assayed in a final volume of 100 μ l, 10 μ l of enzyme preparation was incubated in 80 mM potassium phosphate buffer pH 5.8 containing 1 mM *N*-CBZ-Phe-Leu 42 °C. After 30 minutes, 200 μ l ninhydrin reagen was added to the reaction. The mixture was vortexed and then boiled for 10 minutes. The reaction was cooled on ice for 2 min, and then 700 μ l of 50 % ethanol was added. Absorbance of the organic phase at the upper side following centrifugation was read at 570 nm.

Purification of sialidase

All purification processes were carried out at 4 °C. Frozen horse liver (65 g) was homogenized in 240 mL of cold distilled water with ultra turrax 3 times, each 1 min, and centrifuged at 100,000 g for 60 min. The Pellet was then solubilized in about 400 mL of 0.1 M phosphate buffer pH 5.5 containing 0.15 M NaCl, 0.5 % Triton X-100 and 0.25 M sucrose with Potter-Elvehjem apparatus for 10 strokes. After centrifugation at 100,000 g for 60 min, the supernatant (solubilisate) was diluted in order to achieved a buffer condition of 0.25 M phosphate buffer pH 5.5 containing 0.05 M NaCl, 0.125 % Triton X-100 and 0.25 M sucrose (buffer A). The diluted solubilisate was then applied to a 50 mL Fractogel EMD TMAE-650 (M) column (3.5x5.2 cm), which has been equilibrated with buffer A, at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The column was washed with buffer A and the sialidase was eluted with NaCl gradient in buffer A between 50 and 1000 mM (400 mL). The sialidase fraction from Fractogel was dialysed against buffer A and then applied to a 7 mL of

PATG-agarose column (1.4x6.4 cm) equilibrated with buffer A, at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Bound enzymes were eluted with 1 M γ -galactonolactone in the buffer A. The affinity-purified enzyme was dialyzed against 0.1 M piperazine buffer pH 5.5 containing 0.15 M NaCl, 0.1 % Triton X-100 and 0.25 M sucrose (buffer B). The dialysate was then applied at flow rate of 0.5 mL min⁻¹ to 10 mL PBE 94 column (0.48x14 cm), which has been equilibrated with buffer C by first running on 5 mL of eluent (PB 74 diluted 1:10 containing 0.05 M NaCl, 0.05 % Triton X-100 and 0.25 M sucrose, adjusted to pH 4.0) and then switching back to eluent again.

Analytical methods

The protein content was determined using spectrophotometer at 280 nm or by the Bradford method (Bradford, 1976) using Bio-Rad reagen with bovine serum albumin as the standard. SDS-PAGE was performed according to the procedure described in Laemmli (1970) using 10-16 % gradient gel. Gels were stained for protein with silver nitrate.

RESULTS

Some different characteristics of sialidase were observed between the sialidase isolated in this present study and the sialidase isolated earlier (Candra *et al.*, 2005). The sialidase in the present study needed at least 50 mM NaCl to be maintained in soluble form as well as detergent in the purification steps, as the two conditions was not needed for the sialidase isolated earlier. The sialidase activity could not be activated by incubating at 37 °C in acidic pH at range of 4.8 to 6.0 (data not shown), however, a decrease of activity was observed during the incubation. It also did not bind to the *N*-(*p*-aminophenyl)-oxamic acid agarose as in case of the earlier isolated sialidase.

Purification of sialidase

β -Galactosidase activity, which optimally at pH 4.0, was found to co-elute with sialidase activity following anion-exchange chromatography on Fractogel EMD TMAE-650 (M) (Figure 1).

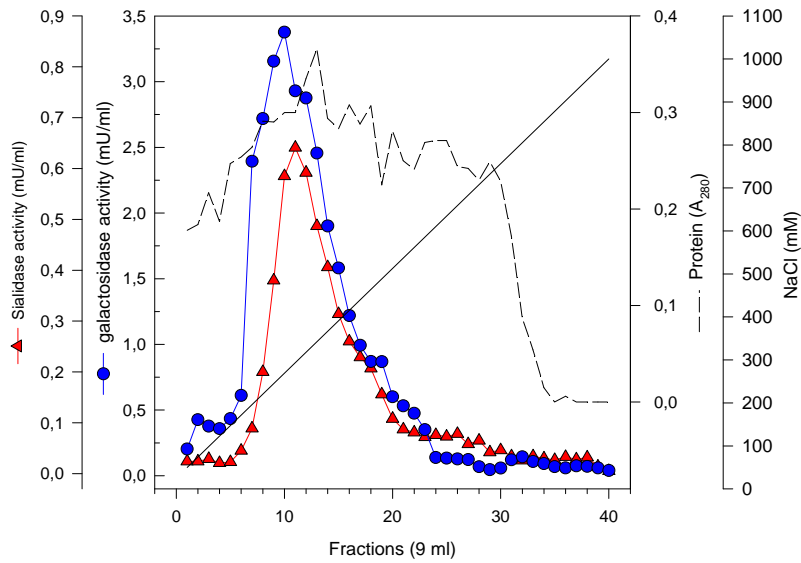


Figure 1. Chromatogram of sialidase and β -galactosidase activities following anion-exchange chromatography on Fractogel EMD TMAE-650 (M). The sample was applied at flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Sialidase activity was assayed using MU-Neu5Ac as substrate at pH 4.5; β -Galactosidase activity was assayed using MU-Gal as substrate at pH 4.0.

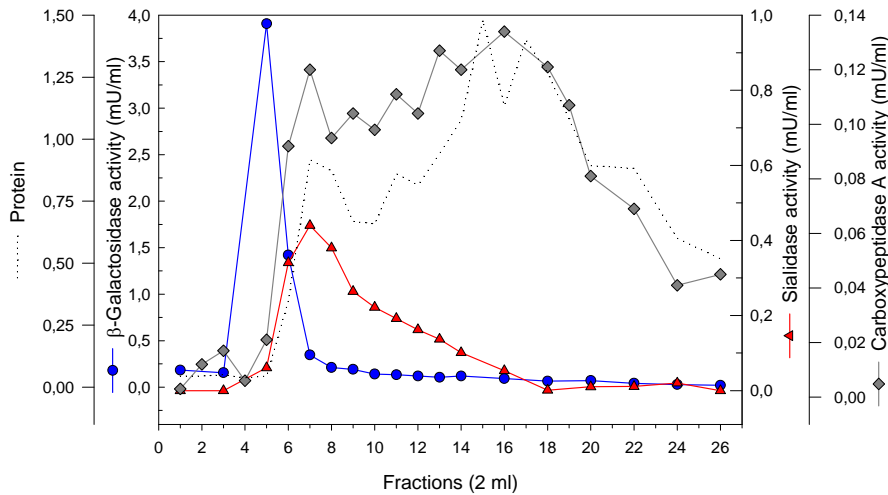


Figure 2. Chromatogram of sialidase, β -galactosidase and carboxypeptidase A activities following affinity chromatography on PATG-agarose. The sample was applied to PATG-agarose column ($1.4 \times 6.4 \text{ cm}$) at flow rate of 0.5 mL min^{-1} , which was equilibrated with 25 mM phosphate buffer containing 50 mM NaCl, 0.25 M sucrose and 0.125% Titon X-100. The column was eluted with 1 M γ -galactonolactone in the equilibration buffer, and 2 mL fractions were collected. Sialidase and β -galactosidase activity were assayed as described in Figure 1, while carboxypeptidase was assayed at pH 5.8, 42°C for 30 minutes.

With the expectation that the sialidase isolated was occurred as enzyme-complex with β -galactosidase and carboxypeptidase A, a specific affinity medium for β -galactosidase, PATG-agarose, was used in the purification following anion-exchange on Fractogel EMD TMAE-650 (M). Following this affinity chromatography (Figure 2), the sialidase was purified about 9-fold with a yield of 0.6 %.

The sialidase was bound very tightly to the PATG-agarose and could only be eluted with high concentrated γ -galactonolactone. It started to elute when 0.5 M of γ -galactonolactone was applied and an optimum elution was when 1.0 M of the γ -galactonolactone used.

After this step, the expectation whether the sialidase isolated occurred as an enzyme-complex with β -galactosidase and carboxypeptidase A, as usually found for lysosomal sialidase was enhanced because the peak of carboxypeptidase A was also found in the same fraction where sialidase-activity peak

was found. This explanation can also be seen in further purification step with chromatofocusing on PBE 94 (Figure 3). Following this step sialidase activity was purified by about 18-fold with a yield of 0.2 %. The β -galactosidase and carboxypeptidase were co-purified by factor of about 291-fold with yield of 6.5 % and 32-fold with yield of 0.4 % respectively (Table 1).

SDS-PAGE

The final preparation of sialidase was subjected to SDS-PAGE to investigate the sub-unit compositions of the enzymes. The SDS-PAGE under reducing condition of the enzyme preparation exhibits four bands (72, 78, 85 and 105 kD (data not shown). The protein band of 105 kD is predicted to be correspond to β -galactosidase activity, this 105 kD and 85 kD protein bands were disappeared in the SDS-PAGE under reducing condition giving a protein band with molecular weight over 200 kD.

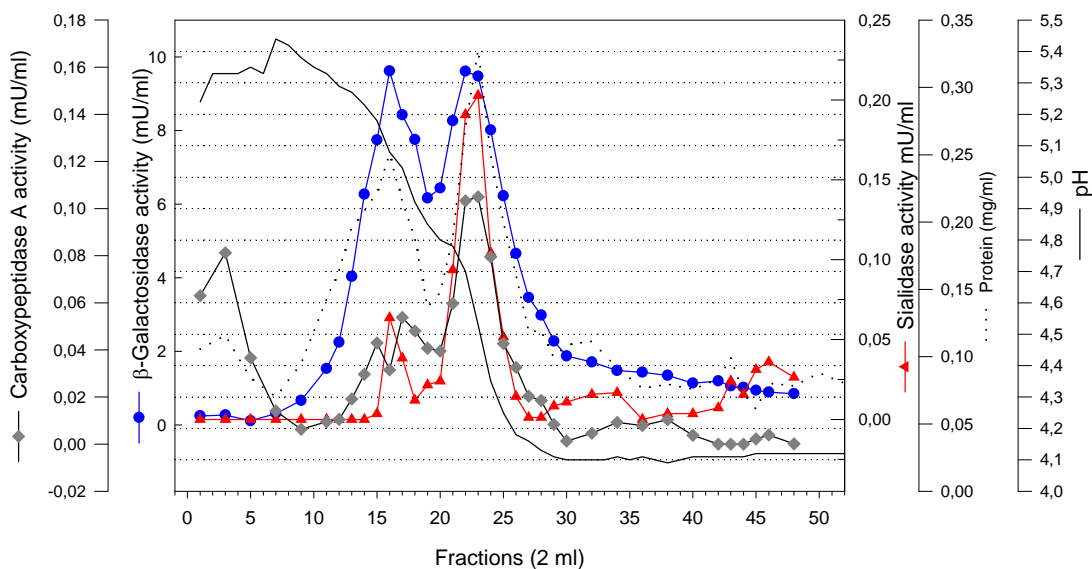


Figure 3. Chromatogram of sialidase, β -galactosidase and carboxypeptidase A activity following chromatofocusing with PBE 94. The sample was applied at flow rate of 0.5 mL min^{-1} , and 2 mL fractions were collected.

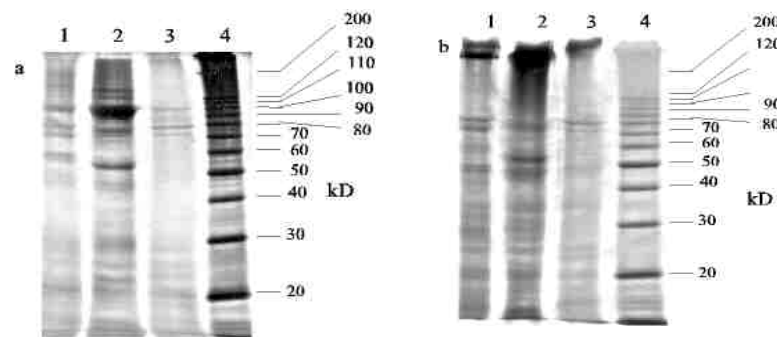


Figure 4. SDS-PAGE on a gradient gel between 10 and 16 % at reducing (a) and non-reducing (b) condition of sialidase pool at each step of purification. Lane 1, Fractogel EMD TMAE-650 (M) pool; Lane 2, PATG-agarose pool; Lane 3, PBE 94 pool; Lane 4, Molecular mass standard.

Table 1. Purification of sialidase from horse liver.

Fractions	Protein (mg)	Specific activity ($\mu\text{U mg}^{-1}$)			Yield (%)			Purification factor		
		Sial	β -Gal	CarbA	Sial	β -Gal	CarbA	Sial	β -Gal	CarbA
Homogenate	13,822.8	82	231	26	100.0	100.0	100.0	1.0	1.0	1.0
Supernatant	8,663.8	77	219	33	58.9	59.3	79.0	0.9	1.0	1.3
Fractogel	975.3	84	1,431	38	7.2	43.7	10.3	1.0	6.2	1.5
PATG-agarose	9.3	752	25,802	743	0.6	7.5	1.9	9.2	111.7	28.6
Chromatofocusing	1.4	1,500	67,423	851	0.2	6.5	0.4	18.3	291.9	32.7

Note: Sial = sialidase, β -Gal = β -galactosidase, CarbA = carboxypeptidase A

Properties of the purified sialidase

Temperature- and pH optimum

The effects of temperature and pH on the activities of the sialidase were determined in acetate or phosphate buffer using MU-Neu5Ac. As shown in Figure 5, the temperature and pH optimum for the sialidase are 42-46 °C and 4.5, respectively.

pH stability

The stability of the sialidase at various pHs was determined by keeping the enzymes in 0.1 M acetate or phosphate buffers ranging in pH from 3.5 to 7.0 at 37 °C prior to standard assaying at pH 4.5 (Figure 6a). The sialidase was stable at pH 4.5, 5.0 and 6.0, however rapidly lost its activity at pH 4.0 or 7.0. At 4 °C, the sialidase was quite stable in all of the pH-range tested except at pH 4.0 with a rapid lost of activity (data not shown).

Freeze-thaw effects

The sialidase was also stable to the effects of freeze-thawing (Figure 6b). Following 4 freeze-thaw cycles, sialidase in 25 mM piperazine buffer pH 5.5 containing 0.25 M sucrose, 0.05 M NaCl and 0.01 % Triton, only lost approximately 14 % of its activity.

Influence of oligovalent cations and inhibitors to the sialidase activity

The Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} in chloride form between 0.25 and 10 mM had an inhibitory about 5 to 40 % of sialidase activity (data not shown). On the other hand, sialidase activity could be increased by about 20 % with the addition of 0.5 mM aluminium chloride. However, at higher concentration AlCl_3 was inhibitory (Figure 7a). The activation of sialidase activity by aluminum chloride disappeared when 1 mM EDTA was added (Figure 7b).

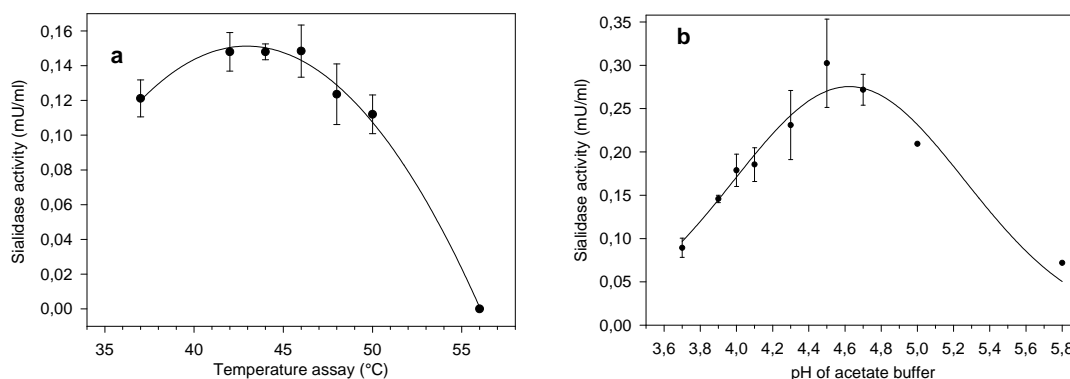


Figure 5. Influence of pH and temperature to the sialidase activity. (a) Temperature experiment was performed in 70 mM acetate buffer pH 4.5 containing 0.1 mM MU-Neu5Ac, (b) pH Experiment was performed in 70 mM acetate and phosphate buffer for pH 3.7-5.0 and 6.0 containing 0.1 mM MU-Neu5Ac respectively at 46 °C.

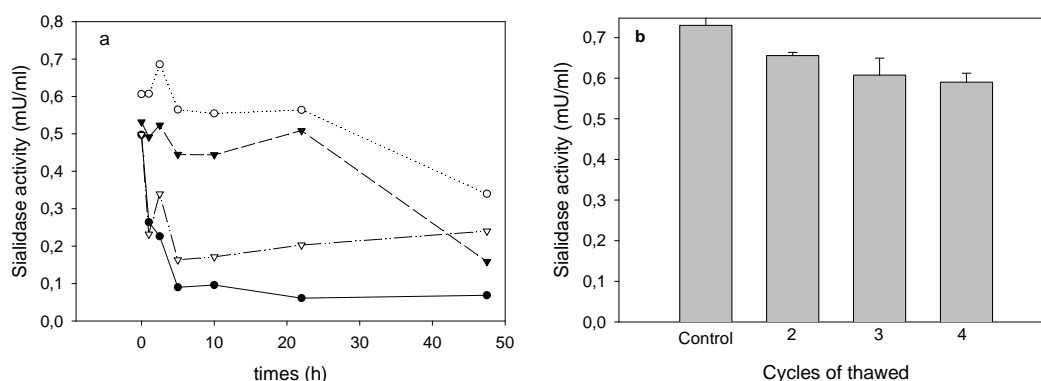


Figure 6. Effect of pH on the stability of sialidase activity. (a) The enzyme was placed in 0.1 M acetate buffer or phosphate buffer ranging in pH between 4.0 and 7.0 at 37 °C, and then the sialidase activity was measured with MU-Neu5Ac substrate at pH 4.5. ● pH 4.0; ○ pH 5.0; ▲ pH 6.0; △ pH 7.0. (b) The enzyme was thawed from -80 °C in piperazine buffer pH 5.5 containing 0.05 M NaCl, 0.25 M sucrose and 0.1 % Triton X-100.

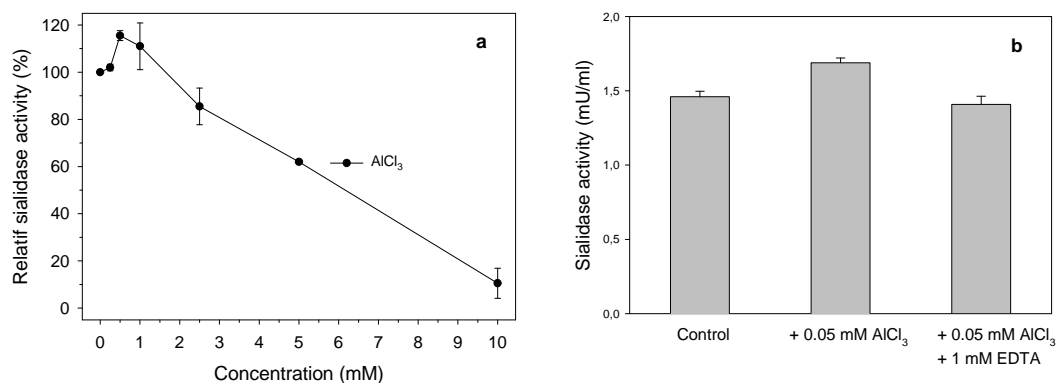


Figure 7. Influence of Al³⁺ to sialidase activity. (a) Influence of different concentrations of Al³⁺ on sialidase activity, (b) Influence of Al³⁺ at concentration of 0.5 mM with and without EDTA on sialidase activity.

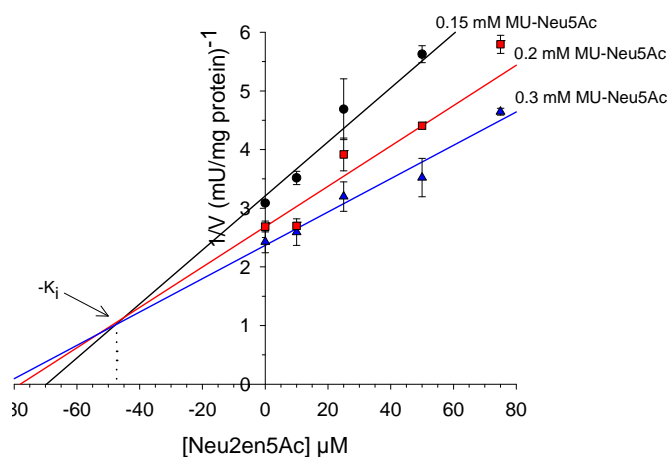


Figure 8. Dixon plot for the inhibition of sialidase activity by Neu2en5Ac. The sialidase activity was assayed in 60 mM acetate buffer pH 4.5 containing Neu5,2en between 0 and 70 μ M for each MU-Neu5Ac concentration used at 46°C for 60 minutes. ●, 0.15 mM MU-Neu5Ac; ■, 0.20 mM MU-Neu5Ac; ▲, 0.3 mM MU-Neu5Ac.

Inhibition of the sialidase

Neu5Ac and *N*-(*p*-aminophenyl)-oxamic acid up to concentration of 1 mM showed no inhibitory effects on sialidase activity. However, a light inhibitory effect of about 20 % was showed at concentration of 5 mM. On the other hand, Neu2en5Ac was a strong competitive inhibitor for the sialidase with K_i of 47.5 μ M (Figure 8).

Substrate specificity of sialidase

Sialyllactose, fetuin and the gangliosides, GM3 and GD1a, were found to act as substrates for the purified enzyme, however GD1b and GM2 were not (Table 2). The enzyme showed very high activity toward α 2,3-sialyllactose compared to α 2,6-sialyllactose or ganglioside mixture from bovine brain. The apparent Michaelis constants for some substrate show that the enzyme has high affinity towards α 2,3-sialyllactose (Table 3).

Table 2. Substrate specificity of sialidase from horse liver

Substrates	Concentration (μ M)	Sialidase activity (μ U/mg protein)
GM3	3.9	98.5
GD1a	6.8	522.3
Fetuin	9.2	42.6
GM2	4.6	0.0
GD1b	4.5	0.0
BSM		0.0
Guinea pig serum		0.0

Table 3. The K_m and V_{max} values for various sialidase substrates

Substrates	K_m (μM)	V_{max} ($\mu U/mg$ protein)
MU-Neu5Ac	117.3	520.5
2,3-sialyllactose	338.9	680.0
2,6-sialyllactose	132.1	207.8
Gangliosides mixture from bovine brain	50.0	228.0

DISCUSSION

Following a previous report, we have purified horse liver sialidase with another purification method with the application of a specific affinity media for β -galactosidase, PATG-agarose. A large amount of β -galactosidase was obtained during the purification on PATG-agarose. However, most of the β -galactosidase activity was removed by applying chromatofocusing on PBE 94. The purification of sialidase using PATG-agarose were successfully applied in the case that the sialidase was occurred as enzyme-complex with other tow enzymes, β -galactosidase and carboxypeptidase A (Verheijen *et al.*, 1982; Verheijen *et al.*, 1987; Hiraiwa *et al.*, 1996; Hiraiwa *et al.*, 1997). The expectation that the sialidase isolated is an enzyme-complex with the two other enzymes was raised because the carboxypeptidase A activity was detected in the enzyme preparation following purification on PATG-agarose, and the activities of the three enzymes were again detected in the same fractions. This evidence shows that the sialidase isolated in this present study was distinct to the sialidase reported at previous study because β -galactosidase could be completely removed from the last sialidase following affinity chromatography on *N*-(*p*-aminophenyl)-oxamic acid-agarose (Candra *et al.*, 2005). Activation of sialidase activity by incubating the enzyme preparation (solubilisate) in acidic pH-condition at 37°C for 90 min was also different. The sialidase activity from the present study decreased following the incubation, as not in case of the sialidase from the previous study. This result is, unfortunately, very difficult to explain. One possible explanation is that the livers were

obtained from different breeds of horses, however the exact breed of the horses is unknown.

Taking the consideration that eucaryotic sialidasases have molecular weight around 50 kD or more (Vinogradova *et al.*, 1998; van der Spoel *et al.*, 1998; Potier *et al.*, 1990; Hata *et al.*, 1998; Fronda *et al.*, 1999; Miyagi dan Tsuiki, 1995), it appears probably that the protein band at approximately 72 kD could be the sialidase, since this band was only observed in the sialidase-positive fractions and not in other fractions. Experiments to resolve this puzzle using Blue native-PAGE (BN-PAGE) (Schägger dan von Jagow (1991) were unfortunately unsuccessful, possibly because the sialidase was unstable or the enzyme-complex conformation was disturbed, which gave negative effects to the sialidase activity. Hiraiwa *et al.* (1996) demonstrated that sialidase, which occurred as enzyme-complex with β -galactosidase and carboxypeptidase A, could be dissociated by incubation in pH 7.5 and its activity was irreversibly inactivated even following reconstitution of the complex.

As our interest in the catabolism of *O*-acetylated sialic acid, particularly 4-*O*-acetylated sialic acid, experiments using blood serum of guinea pig, which contained about 32 % of 4-*O*-acetylated sialic acid, was performed using thiobarbituric acid test or fluorimetric-HPLC. The purified enzyme could not release sialic acids from the guinea pig blood serum, as well as from BSM. Some sialidasases were also reported that BSM was not suitable for their substrate (Hata *et al.*, 1998; Hiraiwa *et al.*, 1988)

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would thank to Roland Schauer, Director of Biochemistry Institute of Kiel University, for his kindness doing research in his Laboratory and the financial assistance of the German Academic Exchange Service (DAAD).

REFERENCES

- Iwersen M, Vandamme-Feldhaus V, Schauer R (1998) Enzymatic 4-O-acetylation of N-acetylneuraminic acid in guinea-pig liver. *Glycoconj J* 15: 895-904.
- Tiralongo J, Schmid H, Thun R, Iwersen R, Schauer R (2000) Enzymatic sialate-O-acetylation in bovine and equine submandibular glands. Abstract 20th Int. Carbohydrate Symp. LCI Publisher GmbH, Hamburg. p 331.
- Shen YQ, Schauer R (2000) Characterization of enzymatic sialate-7(9)-O-acetyltransferase in human colonic tissue. Abstract 20th Int. Carbohydrate Symp. Thiem J. LCI Publisher GmbH, Hamburg. p 331.
- Schauer R, Reuter G, Stoll S (1988) Sialate O-acetyltransferases: key enzymes in sialic acid catabolism. *Biochimie* 70: 1511-1519.
- Candra KP, Roggentin P, Schauer R (2005) Solubilization, activation and partial purification of a sialidase from horse liver. *Hayati* 12(3):
- Warren L (1959) Thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 234: 1971-1975.
- Reuter G, Schauer R (1994) Determination of sialic acids. *Methods Enzymol* 230: 168-199.
- Bradford M (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Verheijen FW, Brossmer R, Galjaard H (1982) Purification of acid β -galactosidase and acid neuraminidase from bovine testis: evidence for an enzyme complex. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 868-875.
- Verheijen FW, Palmeri S, Galjaard H (1987) Purification and partial characterization of lysosomal neuraminidase from human placenta. *Eur J Biochem* 162: 63-67.
- Hiraiwa M, Saitoh M, Uda Y, Azuma N, Martin BM, Kishimoto Y, O'Brien JS (1996) A sialidase complex from chicken liver: Characterization of a multienzyme complex with β -galactosidase and carboxypeptidase A. *Comp. Biochem Physiol* 115B: 541-546.
- Hiraiwa M, Saitoh M, Arai N, Shiraiishi T, Odani S, Uda Y, Ono T, O'Brien JS (1997) Protective protein in the bovine lysosomal β -galactosidase complex. *Biochim Biophys Acta*. 1341: 189-199.
- Vinogradova MV, Michaud L, Mezentsev AV, Lukong KE, El-Alfy M, Morales CR, Potier M, Pshezhetsky AV (1998) Molecular mechanism of lysosomal sialidase deficiency in galactosialidosis involves its rapid degradation. *Biochem J* 330 (Pt 2): 641-650.
- van der Spoel A, Bonten E, Azzo A (1998) Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A. *EMBO J* 17: 1588-1597.
- Potier M, Michaud L, Tranchemontagne J, Thauvette L (1990) Structure of the lysosomal neuraminidase- β -galactosidase-carboxypeptidase multienzymic complex. *Biochem J* 267: 197-202.
- Hata K, Wada T, Hasegawa A, Kiso M, Miyagi T (1998) Purification and characterization of a membrane-associated ganglioside sialidase from bovine brain. *J Biochem* 123: 899-905.

- Fronza CL, Zeng G, Gao L, Yu RK (1999) Molecular cloning and expression of mouse brain sialidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 727-731.
- Miyagi T, Tsuiki S (1985) Purification and characterization of cytosolic sialidase from rat liver. *J Biol Chem* 260: 6710-6716.
- Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199: 223-231.
- Hiraiwa M, Nishizawa M, Uda Y, Nakajima T, Miyatake T (1988) Human placental sialidase: further purification and characterization. *J Biochem* 103: 86-90.

KEUNTUNGAN PROSES WET DEGUMMING DIBANDING DRY DEGUMMING PADA PEMURNIAN MINYAK SAWIT KASAR

Advantage of Wet Degumming Compared to Dry Degumming Process in Crude Palm Oil Purification

Deny Sumarna

Post harvest and Packaging Laboratory Study Program of Agricultural Product Tecnology, Faculty of Agriculture, Mulawarman University, Jalan Tanah Grogot Kampus Gunung Kelua, Samarinda 75123

Recieved 6 July 2006 accepted 25 July 2007

ABSTRACT

Crude palm oil yielded from mesocarp of palm fruit, in any case, still contain non lipid fraction like colloid, which is removed in the first step of purification. Degumming followed by bleaching is the first step of crude palm oil purification. Degummed bleached palm oil yielded by wet degumming process has better quality according to FFA number, peroxide number, fraction not soaped, iodine number, and phosphor content. However wet degumming process has a lower yield compared to dry degumming process.

Keyword : degumming, phosphatide, CPO, purification

PENDAHULUAN

Minyak sawit kasar (CPO) yang dihasilkan dari bagian mesocarp buah sawit masih mengandung fraksi non trigliserida baik yang larut dalam minyak seperti fosfat, maupun yang tidak larut dalam minyak seperti suspensi koloid. Dalam proses pemurnian menjadi minyak goreng, tahap awal pemurnian CPO adalah *degumming* yang kemudian dilanjutkan dengan pemucatan (*bleaching*), deodorisasi, kristalisasi, dan fraksinasi (Ketaren, 1986). *Degumming* adalah proses pemisahan gum, yaitu proses pemisahan getah atau lendir yang terdiri dari fosfolipid, protein, residu, karbohidrat, air dan resin (Lin *et al.*, 1998).

Beberapa cara yang dapat dilakukan untuk proses pemisahan gum antara lain adalah pemanasan, penambahan asam (H_3PO_4 , H_2SO_4 dan HCl) atau basa ($NaOH$), pemisahan gum dengan cara hidrasi dan pemisahan gum dengan menggunakan garam seperti natrium khlorida dan natrium fosfat.

Degumming biasanya dilakukan dengan cara dehidrasi gum agar bahan non trigliserida tersebut lebih mudah terpisah dari minyak, kemudian disusul dengan proses pemisahan yang dapat dilakukan dengan cara

sentrifusi (Ketaren, 1986). Sedangkan fosfatida dipisahkan dengan cara menyalurkan uap panas ke dalam CPO sehingga terpisah dari minyak, sedangkan fosfatida yang tidak larut air dapat dipisahkan dengan penambahan asam fosfat (Lin *et al.*, 1998). Asam fosfat ini dapat menginisiasi terbentuknya gumpalan sehingga mempermudah pengendapan kotoran, selain itu penggunaannya dapat menurunkan bilangan peroksida minyak yang telah dipucatkan dan dapat meningkatkan kestabilan warna, akan tetapi semakin tinggi kadar asam fosfat yang digunakan maka bilangan peroksida dari minyak yang telah dipucatkan akan semakin meningkat (Lin *et al.*, 1998). *Degumming* yang menggunakan uap panas disamping asam fosfat disebut sebagai *wet degumming*, sedangkan bila dilakukan tanpa menggunakan air dinamakan *dry degumming* (Hui, 1996).

Minyak sawit kasar mengandung berbagai jenis fosfatida seperti *phosphatidyl choline* (PC), *phosphatidyl inositol* (PI), *phosphatidyl ethanolamine* (PE), *phosphatidic acid* (PA) dan *phytosphingolipids*. Adalah menarik untuk melihat efisiensi penghilangan berbagai jenis fosfatida dalam

minyak sawit kasar dengan membandingkan efisiensi penghilangan fraksi non trigliserida dari dua metode degumming, yaitu *wet degumming* dan *dry degumming*. Selain itu dipelajari pula kualitas minyak sawit hasil degumming dengan kedua cara tersebut setelah sebelumnya dilakukan *bleaching* (*Degummed Bleached Palm Oil*, DBPO).

METODE PENELITIAN

Bahan utama yang digunakan adalah CPO yang diperoleh dari PTPN VII Lampung, sedangkan bahan-bahan kimia seperti asam fosfat, kalsium karbonat, bentonit, NaOH, KOH, KI, HCl, Na₂S₂O₃, H₂SO₄, HNO₃, etanol, indikator *phenolphthalein*, asam asetat glasial, khloroform, sikloheksan, larutan Wijs, amilum, larutan katalis dan petroleum eter.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan percobaan faktorial 2x3 dalam Rancangan Acak Lengkap. Faktor pertama adalah jenis metode degumming yang terdiri dari 2 perlakuan, yaitu, *wet degumming* dan *dry degumming*. Sedangkan faktor kedua adalah tingkat jumlah asam fosfat 85 % yang terdiri dari tiga taraf perlakuan yaitu 0,05; 0,07; dan 0,09 % (v/w) asam fosfat 85 %. Masing-masing kombinasi perlakuan diulang sebanyak 2 kali. Perlakuan dan interaksinya yang menunjukkan perbedaan secara statistik pada taraf 5 % dilanjutkan dengan uji BNJ pada taraf 5 % untuk melihat tingkat perbedaan antar perlakuan dan interaksinya.

Untuk metode *wet degumming*, 200 g CPO dipanaskan pada suhu 80-90 °C sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan larutan asam fosfat 85 % sebanyak 0,05; 0,07 atau 0,09 persen (v/w) dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian campuran minyak tersebut dimasukkan ke dalam corong pemisah, ditambahkan air panas (80-90 °C) sebanyak 5 persen (v/v) dengan cara disemprotkan merata diatas permukaan CPO, kemudian didiamkan kembali sampai gum dan air terpisah dari minyak. Gum yang terdapat pada bagian bawah corong pemisah dipisahkan dengan membuka klep pada bagian bawah dan dicek apakah air pencucian sudah netral atau belum (dengan

menggunakan kertas lakmus). Jika air pencucian pada saat pemisahan gum belum netral, maka air ditambahkan lagi sampai air pencucian netral. Metode *dry degumming* dikerjakan sama dengan *wet degumming* tetapi tanpa penambahan air panas.

Minyak yang telah melewati proses *degumming* kemudian dipucatkan dalam tangki pemucat, yaitu dipanaskan sambil diaduk pada suhu sekitar 90 °C pada tekanan 45 mBar selama 15 menit. Kemudian ke dalamnya ditambahkan CaCO₃ sebanyak 0,064 % (v/w) dan adsorben (bentonit) sebanyak 2,4 % (w/w). Pemanasan dilanjutkan pada suhu 90-110 °C selama 30 menit dengan terus diaduk. Setelah itu suhu diturunkan semapai 80 °C dan minyak disaring.

Rendemen didapat dengan menghitung persentase dari hasil pembagian volume minyak sebelum proses *degumming-bleaching* dengan volume minyak sesudah proses *degumming-bleaching*. Untuk mengetahui mutu minyak yang dihasilkan pada penelitian ini dilakukan karakterisasi sifat fisiko kimia minyak meliputi kadar FFA (SNI 01-3555-1998), Kadar fosfor (AOCS, 1995), fraksi tak tersabunkan (AOAC, 1995), bilangan peroksida ((SNI 01-3555-1998), bilangan iod (SNI 01-3555-1998), dan bilangan penyabunan (SNI 01-3555-1998). Analisis yang sama dilakukan terhadap CPO sebagai kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen serta karakteristik dari *degummed bleached palm oil* (DBPO) yang dihasilkan dari metode *wet degumming* dan *dry degumming* disajikan pada Tabel 1.

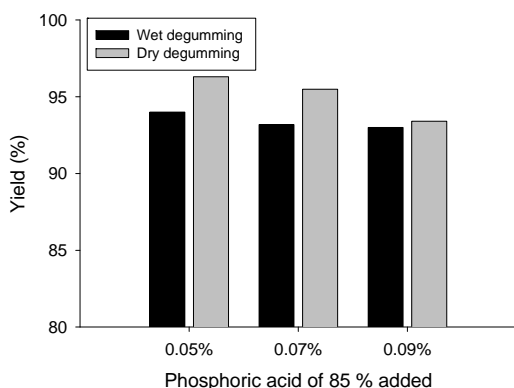
Rendemen

Metode *degumming* yang digunakan dan kadar asam fosfat yang diberikan pada proses *degumming* memberikan pengaruh nyata pada rendemen (DBPO) yang dihasilkan (Tabel 1.). Pengaruh metode degumming dan kadar asam fosfat yang digunakan pada proses *degumming* tersebut terhadap rendemen DBPO dari CPO dalam bentuk grafik disajikan pada Gambar 1.

Table 1. Characteristic of CPO (Crude Palm Oil) and DBPO (Degummed Bleached Palm Oil) processed from the CPO by wet degumming and dry degumming

Parameters	Crude Palm Oil (CPO)	Degummed Bleached Palm Oil (DBPO)					
		% of phosphoric acid added in wet degumming ¹⁾			% of phosphoric acid added in dry degumming ¹⁾		
		0.05	0.07	0.09	0.05	0.07	0.09
Yield (%)	-	93.99	93.19	92.99	96.30	95.49	93.40
FFA number (%)	4.22	2.95	2.85	2.84	3.79	3.72	3.79
Peroxide number (mg O/100g)	1.70	0.38	0.26	0.24	0.66	0.62	0.47
Iodine number	53.21	52.66	52.75	52.85	52.42	52.45	52.66
Unsaponified fraction (%)	1.22	1.10	1.05	1.03	1.16	1.15	1.12
Phosphor content (ppm)	28.8	6.87	6.67	5.96	17.87	15.27	10.87

Notes: 1). Phosphoric acid of 85 % was added in the degumming process. Data continued by the same alphabet are not significantly different by Honestly Significant Difference test at α of 0.05.

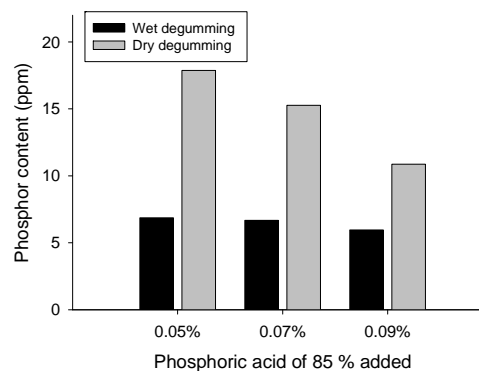
**Figure 1. Effect of phosphoric acid addition in different degumming process on the yield of DBPO.**

Metode *dry degumming* menghasilkan rendemen DBPO yang lebih tinggi dibandingkan metode *wet degumming*, disamping itu peningkatan kadar fosfat yang digunakan pada degumming akan menurunkan rendemen DBPO. Hal ini disebabkan karena pada metode *wet degumming*, komponen-komponen minyak seperti zat warna, sedikit logam, asam lemak bebas dan fosfatida yang dapat terhidrasi (*hydratable phosphatide*) ikut terbuang bersama air pencucian, sehingga mengurangi rendemen minyak. Alasan lain adalah asam fosfat dapat terbentuknya jembatan hidrogen, sehingga semakin tinggi kadar asam fosfat yang digunakan akan menyebabkan semakin banyak jembatan hidrogen yang terbentuk akibatnya fosfatida semakin banyak yang bersifat *hydratable* (Torrey, 1983). Rendemen DBPO menjadi berkurang karena

semakin banyak fosfatida yang dapat dipisahkan dari minyak.

Kadar Fosfor

Metode *degumming* yang digunakan dan kadar asam fosfat yang diberikan pada proses *degumming* serta interaksi keduanya memberikan pengaruh nyata pada kadar fosfor dari DBPO yang dihasilkan (Tabel 1.). Kadar Fosfor pada CPO sebelum di perlakuan (CPO) mengalami penurunan yaitu dari 28,8 ppm menjadi 6,87-17,87 ppm setelah perlakuan. Pengaruh metode *degumming* dan kadar asam fosfat yang digunakan pada proses *degumming* tersebut terhadap kadar fosfor DBPO disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 2.

**Figure 2. Effect of phosphoric acid addition in different degumming process on phosphor content of DBPO**

Metode *wet degumming* menghasilkan DBPO dengan kadar fosfatida (diukur sebagai P) yang lebih rendah dibanding DBPO yang dihasilkan dengan metode *dry degumming* karena pada metode *wet degumming*, gum yang sebagian terdiri dari fosfatida terlebih dahulu dibuang melalui pencucian dengan air panas sebelum dilakukan proses pemucatan minyak. Metode *wet degumming* dengan penambahan asam fosfat 85 % sebanyak 0,09 % menghasilkan DBPO dengan kadar P terendah.

Fraksi Tidak Tersabunkan (FTT)

Warna merupakan salah satu fraksi tidak tersabunkan dalam minyak. Pada pemurnian minyak sawit, warna dari CPO yang didominasi oleh β -karoten dapat dihilangkan dengan tahap pemucatan dan deodorisasi. Tahap deodorisasi adalah tahap yang paling efektif untuk mengurangi FTT ini. Pada penelitian ini dipelajari pengaruh tahap pemucatan terhadap efektifitas pengurangan kadar FTT dari DBPO yang berasal dari CPO.

Metode *degumming* yang digunakan dan kadar asam fosfat yang diberikan serta interaksi keduanya memberikan pengaruh nyata pada FTT dari DBPO yang dihasilkan (Tabel 1.). Pengaruh metode *degumming* dan kadar asam fosfat yang digunakan pada proses *degumming* tersebut terhadap FTT DBPO dari CPO dalam bentuk grafik disajikan pada Gambar 3. Kadar FTT CPO sebelum perlakuan adalah 1,22 %, dan mengalami penurunan antara 1,03-1,15 % setelah dilakukan perlakuan.

Metode *wet degumming* menghasilkan DBPO dengan kadar FTT yang lebih rendah dibanding DBPO yang dihasilkan dengan metode *dry degumming*, dan semakin tinggi jumlah asam fosfat yang digunakan maka cenderung menurunkan kadar FTT. Pada metode *wet degumming*, gum yang sebagian terdiri dari fosfatida terlebih dahulu dibuang melalui pencucian dengan air panas sebelum dilakukan proses pemucatan minyak. Kadar fosfatida yang rendah dari minyak hasil *degumming* dengan metode *wet degumming* memberikan efektifitas pengurangan yang lebih tinggi karena fosfatida tidak mengganggu daya serap dari adsorben terhadap FTT (Ketaren, 1986).

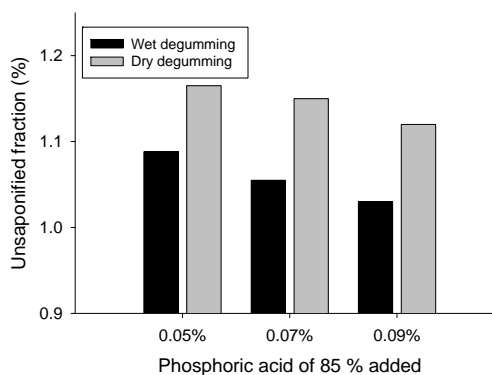


Figure 3. Effect of phosphoric acid addition in different degumming process on unsaponified fraction of DBPO.

Pada metode baik *dry degumming* maupun *wet degumming* dengan penggunaan asam fosfat yang konsentrasinya makin tinggi akan meningkatkan hidrasi dari fosfatida sehingga lebih mudah dipisahkan, hal ini mengakibatkan adsorben lebih efektif mengadsorb warna minyak karena fosfatida yang dapat menutupi pori-porinya dapat ditekan jumlahnya. Metode *wet degumming* dengan penambahan asam fosfat 85 % sebanyak 0,09 % menghasilkan DBPO dengan kadar FTT terendah.

Kadar Asam Lemak Bebas (FFA)

Metode *degumming* yang digunakan memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar FFA, tetapi tidak demikian dengan kadar asam fosfat yang tidak memberikan pengaruh pada kadar FFA (Tabel 1.). Pengaruh metode *degumming* dan kadar asam fosfat yang digunakan pada proses *degumming* tersebut terhadap kadar FFA DBPO disajikan pada Gambar 4. Kadar FTT CPO sebelum perlakuan adalah 4,22 %, dan mengalami penurunan antara 2,95-3,79 % setelah dilakukan perlakuan.

Metode *wet degumming* menghasilkan DBPO dengan kadar FFA yang lebih rendah dibandingkan DBPO yang dihasilkan dengan metode *dry degumming*. Hal ini disebabkan karena pada metode *wet degumming*, gum-gum telah terbuang pada proses pencucian sehingga adsorben lebih efektif dalam proses pemucatan minyak. Salah satu fungsi dari adsorben adalah untuk menyerap produk degradasi minyak seperti asam lemak bebas

(FFA). Disamping itu sebagian asam lemak bebas dalam minyak ikut tercuci pada proses pencucian. Sedangkan pada proses *dry degumming* sebagian gum masih tertinggal dalam minyak sehingga mengurangi keefektifan adsorben dalam menyerap asam lemak bebas, hal ini dapat dilihat dari kandungan fosfatida (Phosphat) yang masih tinggi pada metode *dry degumming* (10,87-17,87 ppm) dibandingkan dengan metode *wet degumming* (5,96-6,67 ppm). Naibaho (1983) menyatakan bahwa zat warna dalam minyak akan diserap oleh permukaan adsorben. Adsorben itu juga akan menyerap suspensi koloid (gum dan resin). Ditambahkan oleh Ketaren (1986), fungsi dari adsorben adalah menyerap kotoran-kotoran yang tidak diinginkan seperti sedikit logam, kadar air, karoten, disamping produk degradasi minyak, fosfatida, dan kelebihan asam fosfat yang ada setelah proses degumming.

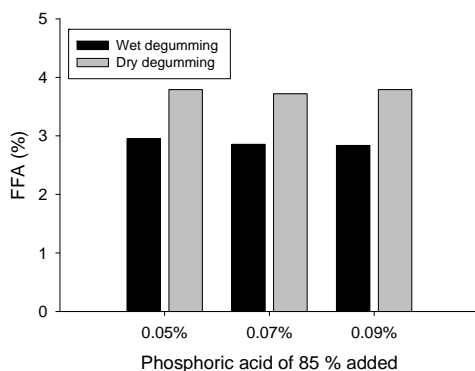


Figure 4. Effect of phosphoric acid addition in different degumming process on FFA content of DBPO.

Bilangan Peroksida

Tidak seperti kadar FFA, bilangan peroksida dari DBPO yang dihasilkan dipengaruhi secara nyata oleh baik metode *degumming* maupun kadar asam fosfat yang diberikan saat proses *degumming* (Tabel 1.). Pengaruh metode *degumming* dan kadar asam fosfat yang digunakan pada proses *degumming* tersebut terhadap bilangan peroksida DBPO disajikan pada Gambar 5. Bilangan Peroksida CPO sebelum perlakuan adalah 1,70 dan mengalami penurunan antara 0,24-0,66 setelah dilakukan perlakuan.

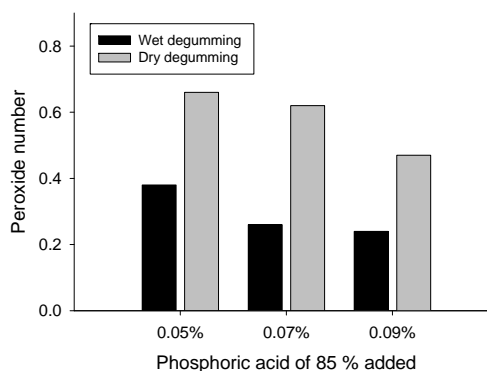


Figure 5. Effect of phosphoric acid addition in different degumming process on peroxide number of DBPO.

Metode *wet degumming* menghasilkan bilangan peroksida yang lebih rendah dibandingkan dengan metode *dry degumming*. Hal ini disebabkan karena pada metode *wet degumming* sebagian logam akan ikut tercuci sehingga kadar logam dalam minyak lebih sedikit. Logam yang terdapat dalam minyak merupakan katalis proses oksidasi dalam minyak yang merupakan inisiator terbentuknya peroksida (Hamilton dan Rossel, 1987). Dibandingkan dengan syarat mutu minyak goreng (SNI-013741-1995), bilangan peroksida dengan menggunakan metode dan penambahan asam fosfat menghasilkan nilai yang lebih rendah yaitu antara 0,24-0,66 mg O/100 g sedangkan syarat mutu minyak goreng (SNI-013741-1995) dengan bilangan peroksida 1 mg O/100 g.

Peningkatan konsentrasi asam fosfat akan meningkatkan hidrasi dari fosfatida sehingga lebih mudah dipisahkan. Hal ini mempengaruhi keefektifan adsorben pada proses pemucatan minyak dalam menyerap komponen non trigliserida termasuk peroksida sehingga jumlah peroksida berkurang setelah proses pemucatan (Ketaren, 1986).

Bilangan Iod

Metode *degumming* yang digunakan dan kadar asam fosfat yang diberikan pada proses *degumming* serta interaksi keduanya memberikan pengaruh nyata pada bilangan iod dari DBPO yang dihasilkan (Tabel 1.). Pengaruh metode *degumming* dan kadar

asam fosfat yang digunakan pada proses *degumming* tersebut terhadap bilangan iod dari DBPO disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 6. Bilangan Iod CPO sebelum perlakuan adalah 53.21 dan mengalami penurunan antara 52,45-52,85 setelah dilakukan perlakuan.

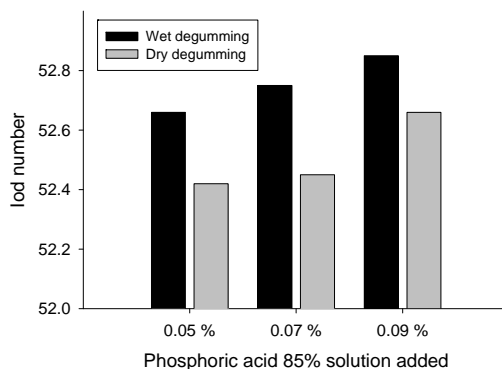


Figure 6. Effect of phosphoric acid addition in different degumming process on iodine number of DBPO.

Metode *wet degumming* menghasilkan DBPO dengan bilangan iod yang lebih tinggi dibandingkan DBPO yang dihasilkan dengan metode *dry degumming*. Ikatan rangkap sangat sensitif terhadap oksidasi, yang salah satunya dapat disebabkan oleh penggunaan suhu tinggi dan kondisi asam (Hui, 1996). Pada metode *dry degumming* tidak digunakan proses pencucian, sehingga pada proses selanjutnya (pemucatan) masih berlangsung pada kondisi asam. Hal ini dapat memicu terjadinya proses oksidasi yang selanjutnya dapat menurunkan jumlah ikatan rangkap atau menurunkan bilangan iod dari DBPO hasil *dry degumming*. Berdasarkan syarat mutu minyak goreng (SNI 01-0018-1998), bilangan Iod minimal 56 g iod/100g, sedangkan dengan metode pada penelitian ini bilangan iod belum memenuhi syarat untuk minyak goreng.

KESIMPULAN

Semua perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap nilai rendemen, kadar Fosfor, FFA dan bilangan peroksida dan bilangan iod dari DBPO. Bilangan iod dan fraksi tidak tersabunkan pada interaksi perlakuan tidak menunjukkan hasil yang

berbeda. Perlakuan metode wet degumming bleaching menghasilkan mutu yang lebih baik dibandingkan dengan metode dry degumming bleaching kecuali pada pengaruh rendemen. Perlakuan metode wet degumming bleaching dengan konsentrasi asam fosfat 0,05 % memberikan nilai mutu DBPO yang baik yaitu FFA (2,95 %), bilangan peroksida (0,38 mg O/100 g), bilangan iod (52,66), FTT (1,098 %), kandungan fosfor (6,87 ppm).

DAFTAR PUSTAKA

- BPS (2001). Statistik Perkebunan Indonesia. Badan Pusat Statistik, Jakarta.
- Hamilton RJ, Rossel JB (1986) Analysis of Oil and Fats. Elsevier Applied Science. New York.
- Hui YH (1996). Bailey's Industrial Oil and Fat Product. Vol. I-V. John Wiley and Sons Inc, New York.
- Ketaren S (1986). Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan. UI Press, Jakarta.
- Loebis B (1998). Produksi Sawit Sebagai Bahan Industri. Buletin Perkebunan 18 (1): 17-20
- Lin L, Rhee KC, Koseoglu SS (1998) Recent Progress in Membrane Degumming of Crude Vegetable Oils on a Pilot-Plant Scale. Food Protein R&D Center, Texas A&M University, USA
- Naibaho PM (1983) Pemisahan Karoten (Provitamin A) dari minyak sawit dengan Metode Adsorpsi. Disertasi. Fakultas Pasca Sarjana, IPB, Bogor.
- Torrey S (1983) Edible Oils and Fats. Noyes Data Corporation, New Jersey.
- Williams KA (1966) Oils, Fats and Fatty Foods. Churchill Ltd, London.
- Winarno FG (1988) Kimia Pangan dan Gizi. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

PRODUKSI PLANLET DARI EMBRIO SOMATIK KACANG TANAH

Planlets Production Derived from Peanut Somatic Embryos

Ellok Dwi Sulichantini

Laboratorium Bioteknologi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman Jl. Tanah Grogot,
Kampus Gunung Kelua, Samarinda 75123

Received 4 April 2006 accepted 29 July 2007

ABSTRACT

Somatic embryos induction used embryonic leaflets derive from mature embryos were dissected from 2 days old seedling from dry peanut seeds. The embryonic leaflets were culture on Murashige and Skoog (MS) tissue culture medium containing various concentrations of Picloram of 4, 8, 12, 16, and 20 μM , were used to induce somatic embryos. Approximately 50 explants were culture on the respective medium. The culture were incubated in the dark at 25-28 °C day and night temperature. Result of the experiments indicated that Picloram was able to induce formation of somatic embryos. The best concentration of Picloram induced peanut somatic embryos was in the range of 8 to 20 μM . The increasing of Picloram concentration was able to increase percentage of somatic embryos formation. Result of the experiment indicated that sucrose concentration effected somatic embryos production such as number, size, color, and duration time of maturation of somatic embryos produced. Somatic embryos were successfully converted to planlet using germination medium which consist of basal medium Murashige and Skoog (MS) containing activated charcoal and sucrose, each of 0.2 %.

Key word: planlet, somatic embryo, picloram, peanut

PENDAHULUAN

Pada umumnya perbanyakan secara *in vitro* dengan metode kultur jaringan kacang tanah digunakan untuk menghasilkan tanaman bebas virus, mengatasi inkompatibilitas seksual, hibridisasi somatik, perbaikan genetik, menghasilkan tanaman haploid, triploid dan poliploid, seleksi mutan tahan garam tinggi, kekeringan, herbisida, bebas hama dan penyakit (Bajaj, 1983). Beberapa metode perbanyakan secara *in vitro* yang dapat dilakukan antara lain, melalui multiplikasi tunas dari mata tunas aksilar dan pembentukan tunas adventif atau embrio somatik secara langsung atau tidak langsung (Pierik, 1987).

Embriogenesis somatik adalah suatu proses berkembangnya sel somatik menjadi suatu tumbuhan tanpa melalui fusi gamet (William dan Maheswaran, 1986). Menurut Pierik (1987), embriogenesis somatik biasa terjadi secara tidak langsung yaitu pembentukan embrio somatik terjadi setelah melalui pembentukan kalus (pada kalus, suspensi sel) maupun secara langsung

pembentukan embrio somatik terjadi langsung dari bagian jaringan eksplan (pada eksplan).

Embriogenesis langsung terjadi pada sel-sel *pre embryogenic determine cell* (PEDC), sedangkan embriogenesis tak langsung terjadi pada sel-sel *induced embryogenic determine cell* (IEDC). Sel-sel PEDC tersebut memerlukan zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk membentuk embrio somatik sedangkan sel-sel IEDC memerlukan zat pengatur tumbuh untuk membelah diri dan kembali ke status embriogenik. Embriogenesis tak langsung terjadi pada sel-sel yang telah mengalami dediferensiasi, pembelahan sel, dan transformasi menjadi sel embriogenik. Sel-sel embriogenik yang akan menjadi embrio adalah sel-sel yang berukuran kecil, sitoplasmanya padat, nukleusnya besar dengan nucleolus yang besar, vakuolanya kecil dan butir-butir patinya sangat banyak (William dan Maheswaran 1986).

Pada umumnya ZPT yang digunakan untuk menginduksi embrio somatik adalah

auksin. Kiyosuke *et al.* (1983), menyatakan bahwa konsentrasi auksin yang diperlukan untuk menginduksi sel yang embriogenik sangat tinggi dibandingkan keperluan auksin pada pertumbuhan sel normal.

Pemindahan kultur ke media tanpa auksin (Pierik, 1987) atau media dengan auksin dan sitokinin yang sangat rendah (Ammirato, 1984) akan menginduksi pembentukan embrio bipolar yang selanjutnya akan berkembang membentuk planlet. Kalus yang dikulturkan tetap pada media dengan auksin tinggi biasanya perkembangan pro-embrio akan terhambat atau kemampuan sel-sel embriogeniknya akan hilang (Bojwani dan Razdan, 1983). Embrio yang berasal dari sel somatik mampu berkembang menjadi planlet muda melalui beberapa perubahan morfologi, yaitu pro-embrio berupa kelompok kecil sel-sel meristematik; fase globular berupa kelompok sel yang membesar; fase hati yang memiliki ciri berupa tiga buah cuping dan bentuk torpedo yang merupakan pembesaran embrio bentuk hati (George dan Sherrington, 1984). Embriogenesis somatik mempunyai kelebihan yaitu fase pembentukan tunas dan pengakaran dapat tumbuh dalam media yang sama (Bojwani dan Razdan, 1983).

Beberapa peneliti melaporkan bahwa penambahan arang aktif pada media berguna untuk pertumbuhan embrio somatik, seperti pada kacang tanah (Eapen dan George, 1993), kelapa sawit (Teixeria *et al.*, 1993), kentang (Tiainen, 1992, Calleberg dan Johanson, 1993). Penambahan arang aktif sebanyak 1 % pada kultur anther *Nicotiana tabacum* dapat meningkatkan pembentukan embrio dari 15 % menjadi 45 % (Johanson *et al.*, 1982). Arang aktif berfungsi untuk menyerap senyawa yang menghambat pertumbuhan dan zat pengatur tumbuh yang berlebihan, mengabsorpsi senyawa fenolik dari jaringan yang terluka (Fridborg *et al.*, 1978), dan dari degradasi sukrosa pada proses sterilisasi (Druart dan De Wulf, 1993), mencegah pertumbuhan kalus abnormal dan merangsang terjadinya pemasakan embrio (George dan Sherrington, 1984). Arang aktif

juga menyerap asam absisic (Johansson *et al.*, 1982, vitamin, auksin dan sitokinin (Fridborg *et al.*, 1978; Teixeira *et al.*, 1993). Pemberian arang aktif sebanyak 1 % pada media juga dapat meningkatkan hidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa pada waktu sterilisasi.

Gula merupakan sumber energi (sumber karbon) yang paling sering digunakan di dalam media kultur jaringan. Sukrosa merupakan sumber karbon dalam media kultur jaringan (Gunawan, 1988). Sumber karbon lain dapat juga digunakan seperti glukosa, fruktosa, maltosa, dan galaktosa untuk tujuan tertentu (Gamborg dan Shyluk, 1981).

Tulisan ini melaporkan pengaruh konsentrasi zat pengatur tumbuh picloram, dan sukrosa terhadap pembentukan embrio dan faktor-faktor yang mempengaruhi terbentuknya *planlet*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah benih kacang tanah, zat pengatur tumbuh Picloram, media dasar Murashige dan Skoog (MS), Tween-20, sabun cair, Bayclin, alkohol 90 %, agar, sukrosa, akuades, dan spirtus.

Alat yang digunakan adalah *Laminar Air Flow Cabinet*, timbangan analitik, pH meter, autoklaf, oven, *hot plate*, lampu spirtus, lemari pendingin, gelas ukur, botol kultur, pipit ukur, cawan petri, gelas pengaduk, erlenmeyer, pinset, scalpel, gunting, karet hisap, hand sprayer, botol kultur, aluminium foil, karet gelang, dan pot pengecambahan.

Pembuatan Media

Media yang dibuat ada 4 macam, yaitu media untuk pengecambahan benih, media induksi embriogenesis, media pematangan embrio, dan media pengecambahan. Komposisi media tersebut disajikan pada Tabel 1.

Table 1. Culture media composition

No.	Type of media	Composition
1.	Seed sprout media	MS + agar 0.6 % + sucrose 3 %
2.	Somatic embryo induction media	MS + agar 0.6 % + sucrose 2 % + Picloram by variety of concentrations (4, 8, 12, 16, dan 20 μ M)
3.	Somatic embryo maturation media	MS + agar 0.6 % + sukrosa 4 % + Picloram by variety of concentrations (4, 8, 12, 16, dan 20 μ M)
4.	Somatic embryo sprout media	MS + agar 0.6 % + sucrose 2 % + activated carbon 2 %

Induksi Embrio Somatik

Penyiapan Bahan Tanaman

Benih kacang tanah yang digunakan disterilkan dengan larutan 30 % Bayclin selama 20 menit. Kedalam larutan tersebut ditambahkan dua tetes Tween 20 sebagai surfaktan. Benih yang telah disterilkan dibilas dua kali dengan air steril. Benih tersebut selanjutnya ditanam dalam media perkecambahan selama 2 hari.

Penanaman dan pemeliharaan eksplan

Leaflet yang berasal dari biji kacang tanah yang telah dikecambahkan pada media induksi embrio somatik yang terdiri dari lima konsentrasi Picloram (4, 8, 12, 16, dan 20 mg L⁻¹). Subkultur dilakukan setiap dua minggu dengan menggunakan media yang sama dengan masing-masing perlakuan. Subkultur dilakukan sampai akhir pengamatan.

Kultur diletakkan pada ruang inkubasi dengan suhu ruang berkisar antara 25 °C sampai 28 °C di ruang gelap. Disekitar kultur disterilkan dengan menggunakan alcohol 70 % setiap hari. Ruang inkubasi selalu dipelihara agar bersih dan steril.

Pengamatan dilakukan terhadap morfogenesis eksplan seperti terbentuknya kalus, terbentuknya embrio somatik primer, terbentuknya embrio somatik sekunder, fenotipe kalus, fenotipe embrio somatik, dan jumlah embrio somatik yang terbentuk.

Pematangan Embrio Somatik

Embrio somatik yang dihasilkan pada media induksi selanjutnya dipindahkan pada media pematangan embrio somatik sesuai dengan masing-masing perlakuan (Tabel 1). Subkultur dilakukan setiap dua minggu

dengan menggunakan media yang sama dengan masing-masing perlakuan.

Kultur diletakkan pada ruang inkubasi dengan suhu ruang berkisar antara 25 °C sampai 28 °C di ruang gelap. Disekitar kultur disterilkan dengan menggunakan alcohol 70 % setiap hari. Ruang inkubasi selalu dipelihara agar bersih dan steril.

Pengecambahan Embrio Somatik

Embrio somatik yang dihasilkan selanjutnya dikecambahkan pada media pengecambahan (Tabel 1). Subkultur dilakukan setiap tiga minggu dengan menggunakan media yang sama untuk masing-masing perlakuan. Subkultur dilakukan sampai akhir pengamatan.

Kultur diletakkan pada ruang inkubasi dengan suhu ruang berkisar antara 25 °C sampai 28 °C di ruang dengan pencahayaan yang berasal dari lampu TL 40 watt. Disekitar kultur disterilkan dengan menggunakan alcohol 70 % setiap hari. Ruang inkubasi selalu dipelihara agar bersih dan steril.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peningkatan konsentrasi cenderung akan meningkatkan persentase pembentukan embrio somatik. Pada konsentrasi Picloram sebesar 4-8 μ M, embrio somatik yang terbentuk sedikit tetapi ukurannya relatif besar. Sebaliknya pada konsentrasi Picloram sebesar 12-20 μ M, embrio somatik yang terbentuk relatif banyak tetapi berukuran lebih kecil. Bertambahnya umur kultur akan meningkatkan persentase eksplan yang membentuk embrio somatik (Tabel 2). Kecenderungan meningkatnya pembentukan

embrio somatik karena meningkatnya konsentrasi ZPT disajikan pada Gambar 1. Sedangkan performa embrio somatik pada umur 16 minggu disajikan pada Gambar 2.

Selain itu embrio somatik yang telah terbentuk akan berkembang ke tahap perkembangan embrio selanjutnya, misalnya dari bentuk globular menjadi hati sedangkan yang telah berada pada fase hati selanjutnya membentuk torpedo.

Tabel 2. Influence of Picloram on percentage of somatic embryos formation

Picloram (µM)	% of somatic embryos formation at different of age (weeks)				
	4	8	12	16	20
4	11	44	50	62	78
8	27	78	86	100	100
12	43	91	100	100	100
16	58	97	100	100	100
20	63	96	100	100	100

Perkembangan embrio ada empat fase yaitu fase 0, 1, 2, dan 3. Pada fase 0, satu sel akan membentuk kelompok sel embriogenik pada fase 1. Pada fase 1-3, kelompok sel yang berasal dari satu sel akan berkembang menjadi embrio somatik (Komamine, 1991).

Menurut Toonen dan de Vries (1996), tahap-tahap perkembangan embrio somatik, seperti munculnya bentuk-bentuk globular, hati, dan torpedo yang sangat mirip dengan tahap perkembangan embrio sigotik. Sel-sel kompeten dapat dipicu menjadi sel-sel embrionik dengan menggunakan berbagai perlakuan seperti pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT), perlakuan pH (*pH shock*), perlakuan panas (*heat shock*) dan perlakuan dengan zat-zat kimia.

Pada umumnya ZPT yang digunakan untuk menginduksi embrio somatik adalah auksin. Kiyosuke *et al.* (1983), menyatakan bahwa konsentrasi auksin yang diperlukan untuk menginduksi sel embriogenik sangat tinggi dibandingkan keperluan auksin pada pertumbuhan sel normal.

Peningkatan konsentrasi Picloram seiring dengan meningkatnya jumlah embrio somatik yang dihasilkan. Bersamaan dengan berkembangnya embrio somatik yang sudah terbentuk maka terbentuk juga embrio-

embrio barupada bagian-bagian eksplan yang lain. Embrio somatik sekunder juga terbentuk diatas bagian embrio somatik primer pada berbagai fase perkembangan.

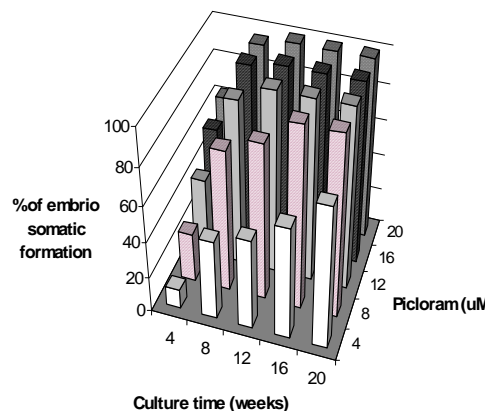


Figure 1. Influence of Picloram and culture time on somatic embryo formation

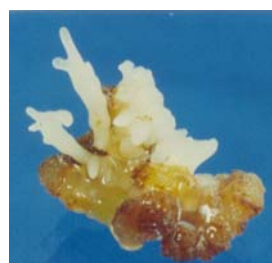


Figure 2. Culture of somatic embryo at 16 weeks

Tabel 3. Number of somatic embryo per explant produced by the culture at 20 weeks

Picloram (µM)	Number of somatic embryo per explant
4	70.00 ± 8,16
8	75.71 ± 11,78
12	110.00 ± 8,16
16	135.00 ± 48,22
20	166.60 ± 18,86

Murthy *et al.* (1995), menginduksi embrio somatik dengan menggunakan TDZ. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi TDZ akan meningkatkan jumlah embrio somatik per eksplan dan persentase embrio somatik

Table 4. Influence of sucrose concentration on somatic embryos phenotype

Phenotype of somatic embryos	Sucrose concentration (%)	
	2	4
Embryos production	Many (70-187)	Rare (< 10)
Embryos color	White, vitrous	Light yellow
Maturation time	Long (16-20 minggu)	Short (4 - 8 weeks)
Embryos position	Bertumpuk	Single
Formed embryos	Primer and secondary somatic embryo	Primer somatic embryo
Embryos size	Small (< 5 mm)	Big (> 5 mm)
Form of somatic embryos	Vary (globular, heart shape and torpedo was in the same explan)	Not vary

Karbohidrat terutama gula merupakan komponen yang selalu ada dalam media tumbuh. Gula merupakan sumber energi yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan kultur (Gunawan, 1988).

Selain sebagai sumber energi, gula juga berfungsi sebagai tekanan osmotik media. Hasil penelitian Gautheret mendapatkan bahwa sukrosa adalah yang paling baik diikuti oleh glukosa, maltosa, dan rafinosa. Fruktosa dan galaktosa kurang efektif sedangkan manosa dan laktosa merupakan karbohidrat yang tidak efektif. Konsentrasi optimum sukrosa tergantung dari jenis kultur. Dalam kultur kalus dan pucuk, konsentrasi optimum antara 2-4 %, namun dalam kultur embrio konsentrasi gula dapat

mencapai 12 % (George dan Sherrington, 1984). Chengalrayan, *et al* (1995) menggunakan sukrosa sebanyak 6 % pada media induksi embryogenesis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa yang diberikan mempengaruhi jumlah embrio somatic per eksplan yang dihasilkan dimana konsentrasi 4 % menghasilkan jumlah embrio somatic yang lebih rendah tetapi memperpendek waktu pematangan embrio sehingga mempercepat waktu terbentuknya *planlet*. Bentuk *planlet* yang berasal dari embrio somatik tunggal maupun yang berasal dari embrio somatik gabungan disajikan pada Gambar 3.

Table 5. Conversion of sprouted somatic embryos form and produced planlet

Picloram (μM)	Form of somatic embrio	Number of sprouted embrio	Normal planlet	Abnormal planlet
4	Single	5	5	0
	Mixture	7	0	7
8	Single	3	3	0
	Mixture	5	0	5
12	Single	6	6	0
	Mixture	15	0	15
16	Single	7	7	0
	Mixture	8	0	8
20	Single	2	2	0
	Mixture	3	0	3



Figure 3. Planlet from (a) single somatic embryo, and (b) mixture somatic embryo

Embrio somatik yang telah matang selanjutnya dikecambahkan dalam media pengekambahan yang tersusun dari media dasar MS ditambah dengan 2 % sukrosa dan 2 % arang aktif. Arang aktif berfungsi untuk menyerap senyawa yang menghambat pertumbuhan dan zat pengatur tumbuh yang berlebihan, mengabsorpsi senyawa fenolik dari jaringan yang terluka (fridborg et al., 1978), dan dari degradasi sukrosa pada proses sterilisasi (Druart dan De Wulf, 1993), mencegah pertumbuhan kalus abnormal dan merangsang terjadinya pemasakan embrio (George dan Sherrington, 1984).

Semua embrio somatik yang dikecambahkan berhasil menjadi *planlet*. Bentuk *planlet* yang dihasilkan tergantung dari bentuk embrio somatik yang dikecambahkan apabila yang dikecambahkan berupa embrio somatik tunggal maka *planlet* yang terjadi merupakan *planlet* yang normal dengan bentuk seperti tanaman yang berasal dari embrio zigotik tetapi bila yang dikecambahkan adalah embrio gabungan yang terdiri lebih dari satu embrio yang saling melekat diberbagai bagiannya maka *planlet* yang terbentuk merupakan *planlet* yang abnormal (bentuknya tidak serupa dengan tanaman yang berasal dari embrio zigotik). *Planlet* yang normal maupun yang abnormal mampu tumbuh dengan baik dan dapat dipindahkan dalam media aklimatisasi.

KESIMPULAN

Leaflets kacang tanah yang berasal dari kecambah umur 2 hari mampu diinduksi embrio somatiknya dengan menggunakan zat pengatur tumbuh picloram dari konsentrasi 4-20 μM . Peningkatan konsentrasi Picloram dapat meningkatkan persentase embrio somatik yang terbentuk, jumlah embrio somatik yang terbentuk per eksplan, dan

waktu induksi embrio somatik. Peningkatan konsentrasi glukosa mampu memperpendek waktu pematangan embrio somatik tetapi menurunkan jumlah embrio somatik yang terbentuk. Embrio somatik yang telah matang mampu dikecambahkan dalam media pengekambahan dan dapat berkembang menjadi *planlet* yang normal. Bentuk *planlet* tergantung dari bentuk embrio somatik yang dikecambahkan. Embrio somatik gabungan akan menjadi *planlet* gabungan / *planlet* yang abnormal sedangkan embrio somatik tunggal akan menjadi *planlet* tunggal.

DAFTAR PUSTAKA

- Ammirato PV (1984) Induction, maintenance, and manipulation of development in embryogenic cell suspension culture. *Dalam*: Vasil IK (ed) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Volume 1: Laboratory Applications. Academic Press Inc. Orlando, Florida.
- Bajaj YPS (1983) Peanut. *Dalam*: Evans D, Sharp WR, Ammirato P, Yamada (ed). Hand Book of Plant Cell. Macmillan Pub, New York, USA.
- Bojwani SS, Razdan MK (1983) Plant Tissue Culture: Theory and Practice: Develop. *Dalam*: Crop Science 5. Elsevier, Tokyo.
- Calleberg EK, Johansson L (1993) The effect of starch and incubation temperature in anther culture of potato. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 32: 27-34.
- Chengalrayan K, Mhaske VB, Hazra S (1995) In vitro regulation of morphogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Science* 110: 259-268.
- Druart P, de Wulf O (1993). Activated charcoal catalysis sucrose hydrolysis during autoclaving. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 97-99.
- Eapen S, George L (1993) Somatic embryogenesis in peanut: influence of growth regulators and sugar. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35(4): 151-156.

- Fridborg O, Pedersen M, Landstrom LE, Erikson T (1978) The effects of activated charcoal on tissue cultures: absorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiologia Plantarum* 43: 104-106.
- Gamborg OL, Shyluk JP (1981) Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue culture. *Dalam*: Thorpe TA (ed). *Methods and Applications in Agriculture*. Acad Press, New York.
- George EF, Sherrington PD (1984) *Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd, London.
- Gunawan LW (1988) *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, IPB-Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Depdikbud.
- Johansson L, Anderson B, Erikson (1982) Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physil Plant Copenhagen* 54: 24-30.
- Kiyosue S, Satoh S, Kamada H, Harada H (1993) Somatic embryogenesis in higher plants. *J Plant Res Special Issue* 3: 75-82.
- Komamine A, Kawahara A, Tsukahara M (1991) Mechanisme of somatic embryogenesis in culture: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology *In Vitro Cell*.
- Murthy BNS, Susan, Saxena PK (1995) Thidiazuron induced somatic embryogenesis in intact seedling of peanut (*Arachis hypogaea* L.): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledon. *Physiologia Plantarum* 94: 267-268.
- Pierik RLM (1987) *In Vitro Culture Higher Plant*. Martinus Nijhoff, Netherlands.
- Teixera JB, Sondahl MR, Ireland RJ (1984) Amino acids metabolism in pea leaves. *Plant Physiol* 74: 822-826.
- Tiainen T (1992) The influence of culture conditions on anther culture respons of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 30: 211-219.
- Toonen MAJ, de Vries SC (1996) Initiation of somatic embryos from single cells. *Dalam*: Wang TU, Cumming A (ed). *Embryogenesis the generation of a plant*. Bios Scientific Publishers Ltd, United Kingdom.
- William EG, Maheswaran G (1986) Somatic Embryogenesis: Factor Influencing Coordinated Behavior of Cell as an Group. *Ann. Bot.* 57: 443-462.