

Pengaruh Kombinasi Naphthalene Acetic Acid (NAA) –Benzyl Amino Purine (BAP) dan Jenis Eksplan pada Mikropropagasi Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*

AYU INDAH WIDAYANTI, RINDANG DWIYANI,
DAN HESTIN YUSWANTI

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
JL. PB Sudirman Denpasar 80362 Bali, Telp. 0361222450
Email : ertanianayu@yahoo.co.id

ABSTRACTS

The Effect of Combination of BAP-NAA and Explant Types on Micropropagation of Orchid of *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* The objectives of the research was to investigate the effect of combination of NAA–BAP, type of explant and their interactions on shoot initiation in micropropagation of *Vanda tricolor* L. var. *suavis*. The factorial experiment consisted of two factors that was arranged by completely randomized design (CRD) with three replications. The first factor was combination of NAA-BAP i.e. M0= MS medium without any plant growth regulator; M1= MS + 0,1 mgL⁻¹ NAA + 0 mgL⁻¹ BAP; M2= MS + 0,1 mgL⁻¹ NAA + 0,1 mgL⁻¹ BAP; M3= MS + 0,1 mgL⁻¹ NAA + 1 mgL⁻¹ BAP; and M4= MS + 0,1 mgL⁻¹ NAA + 10 mgL⁻¹ BAP. The second factor was explant type i.e. shoot tip (B1) and shoot base (B2). The results showed that there was no interaction between factors for all variable observed. Medium M0 (MS medium without any plat growth regulator) and explant of B1 (shoot tip) gave the highest number of the percentage of explants producing shoots and the highest number of shoots per explant.

Keywords: micropropagation, NAA -BAP, *V. tricolor* Lindl. var. *suavis*, shoot initiation, explant types

PENDAHULUAN

Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* merupakan anggrek yang memiliki karakteristik tersendiri dibandingkan dengan anggrek lainnya. Dasar bunganya berwarna putih dengan totol-totol dan *labellum* berwarna ungu kemerahan, serta memiliki aroma yang harum. Anggrek ini juga memiliki kelebihan lain yaitu *flower longevity* (lamanya bunga mekar dalam tandan), yakni sekitar 30 hari, oleh sebab itu anggrek *V. tricolor* L. var. *suavis* sering digunakan sebagai induk persilangan untuk menghasilkan anggrek vanda hibrid (Dwiyani, 2012)

Gardiner (2007) melaporkan bahwa anggrek *V. tricolor* L. langka di habitat asalnya karena kerusakan hutan akibat *overgathering* dan bencana alam. Keberadaan anggrek alam ini perlu dijaga melalui upaya konservasi, baik secara *ex-situ* dan *in-situ*. Perbanyakan *ex-situ* merupakan perbanyakan yang dilakukan di luar habitat asalnya, sedangkan perbanyakan *in-situ* merupakan perbanyakan yang langsung dilakukan pada habitat asalnya.

Penelitian ini merupakan upaya konservasi anggrek secara *ex-situ* melalui teknik mikropropagasi. Mikropropagasi adalah metode

perbanyak secara vegetatif yang dilakukan secara *in vitro* di laboratorium (Dwiyani, 2014). Regenerasi tanaman melalui mikropropagasi dapat dilakukan melalui organogenesis dan embryogenesis (Dwiyani, 2014). Organogenesis merupakan proses yang menginduksi pembentukan sel, kalus, ataupun jaringan menjadi tunas dan tanaman sempurna yang masih memiliki hubungan sistem pembuluh (*vascular system*) dengan jaringan eksplan asalnya. Organogenesis dapat terjadi secara tidak langsung atau melewati fase kalus maupun secara langsung tanpa melalui fase kalus.

Regenerasi eksplan dalam teknik mikropropagasi, selain dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (ZPT) juga dipengaruhi oleh jenis / macam irisan organ yang digunakan sebagai eksplan. Hasil penelitian Dwiyani (2013) mendapatkan bahwa eksplan irisan batang memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan eksplan irisan daun untuk pembentukan kalus pada angrek *V. tricolor* L. var. *suavis*. Penelitian mengenai penggunaan irisan organ sebagai eksplan pada spesies angrek var. *suavis* sangat sedikit dilaporkan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji kombinasi perlakuan konsentrasi BAP-NAA serta tipe eksplan yang terbaik untuk menginduksi tunas angrek *V. tricolor* L. var. *suavis* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2013 sampai dengan Januari 2014, bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian, Universitas Udayana, Jalan Pulau Moyo, Denpasar.

Bahan tanam adalah bibit angrek *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* yang berumur 12 bulan setelah semai. Biji diambil dari buah (biji ada di dalam buah) hasil *selfing* tanaman *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* yang berasal dari Bedugul, Kabupaten Tabanan, propinsi Bali. Selain itu juga digunakan bahan lainnya yaitu: NAA, BAP, media dasar Murashige dan Skoog (MS), bio agar, gula, larutan

stok vit. C, alkohol 70 %, kertas label, pH indikator, aluminium foil, aquades dan tisu steril. Peralatan yang digunakan adalah *hot plate magnetic stirrer*, timbangan analitik, *timer*, autoklaf, kompor, panci, saringan, pinset, *blade* dan *scalpel*, *laminar air flow cabinet* (LAFB), lampu spiritus, mikro pipet, pisau, gunting, pensil, *spatula*, cawan petri, botol kultur, dan gelas ukur.

Penelitian ini dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari dua faktor dan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 30 unit percobaan dan setiap unit ditanami 3 eksplan. Faktor yang pertama, yaitu kombinasi konsentrasi ZPT (M): M0 = MS tanpa penambahan ZPT; M1 = MS + 0,1 mgL⁻¹ NAA + 0 mgL⁻¹ BAP; M2 = MS + 0,1 mgL⁻¹ NAA + 0,1 mgL⁻¹ BAP; M3 = MS + 0,1 mgL⁻¹ NAA + 1 mgL⁻¹ BAP; dan M4 = MS + 0,1 mgL⁻¹ NAA + 10 mgL⁻¹ BAP. Faktor yang kedua, yaitu jenis eksplan (B): B1 = Ujung Batang, dan B2 = Pangkal Batang

Pengamatan dilakukan setiap minggu hingga sepuluh minggu setelah tanam (MST) terhadap peubah: persentase rata-rata jumlah eksplan hidup (%); persentase rata-rata *browning*/pencoklatan (%); Saat munculnya tunas (hari setelah tanam/HST); persentase rata-rata eksplan yang tumbuh tunas (%); dan rata-rata jumlah tunas per eksplan. Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji F pada taraf 5%. Apabila terdapat perbedaan yang nyata pada interaksi, maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan's taraf 5%, sedangkan untuk data yang tidak signifikan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tidak didapatkan pengaruh interaksi antar faktor untuk semua peubah yang diamati, sehingga dalam bahasan berikut akan dibahas pengaruh faktor tunggal.

Persentase Rata-rata Eksplan Hidup.

Persentase rata-rata eksplan hidup dihitung pada umur 4 minggu setelah tanam (MST) dapat

dilihat pada Tabel 1. Eksplan B1 (ujung batang) memberikan persentase rata-rata eksplan hidup sebesar 48,9% dan eksplan B2 (pangkal batang) sebesar 22,2%. Persentase rata-rata eksplan hidup tertinggi dicapai pada perlakuan media M2 sebesar 50,0% dan terendah pada perlakuan M0 dan M1 sebesar 22,2%. Jenis eksplan dalam penelitian ini berpengaruh nyata pada peubah persentase rata-rata jumlah eksplan hidup. Hal tersebut diduga karena eksplan B1 (ujung batang) merupakan eksplan yang umur fisiologisnya lebih muda, sehingga memiliki kemampuan regenerasi yang lebih tinggi. Jaringan tanaman yang masih muda bersifat meristematis atau sel-selnya masih aktif untuk membelah. Jaringan meristematis apikal seperti ujung batang merupakan tempat sintesis hormon auksin endogen. Auksin merupakan sekelompok senyawa yang berfungsi untuk meningkatkan pembelahan sel, pemanjangan sel, dan pembentukan akar adventif (Pierik, 1997). Proses pembelahan sel akan menentukan dasar untuk terjadinya pertumbuhan (Djelantik, 1995).

Eksplan B1 dan B2 memiliki peluang yang sama untuk mengalami stress akibat pemotongan, yang menyebabkan eksplan menjadi coklat, kering, dan pada akhirnya mati. Eksplan B1 memiliki tingkat regenerasi sel yang lebih baik dibandingkan dengan B2. Tingkat regenerasi sel yang lebih baik pada B1 diduga menghasilkan adaptasi eksplan terhadap media menjadi lebih baik.

Persentase Rata-rata Pencoklatan (%)

Persentase rata-rata pencoklatan dihitung pada umur 4 MST (Tabel 1). Perlakuan media M4 menunjukkan persentase rata-rata pencoklatan sebesar 5,6% , sedangkan pada media lain tidak terjadi pencoklatan. Perlakuan jenis eksplan B1 menunjukkan persentase rata-rata pencoklatan tertinggi sebesar 2,2% dan terendah pada perlakuan B2 sebesar 0,0%. Pencoklatan dimulai dengan munculnya warna coklat atau hitam di bagian tepi eksplan (bagian yang mengalami pelukaan saat pengirisan eksplan)

hingga akhirnya seluruh bagian eksplan tampak berwarna coklat. Pencoklatan tersebut sering membuat pertumbuhan dan perkembangan eksplan terhambat. Hal ini sesuai dengan pendapat Hutami (2008), dimana pencoklatan merupakan peristiwa alamiah yang bisa terjadi pada sistem biologi, yaitu proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat pengaruh fisik dan biokimia.

Proses pencoklatan juga sering terjadi karena rangsangan kimia, seperti aktivitas enzim pengoksidasi yang mengandung tembaga (Cu^{2+}) seperti polifenol oksidase dan tirosinase (Hutami, 2008). Polifenol oksidase mengkatalisis reaksi oksidasi yang menggunakan molekul oksigen sebagai co-substrat. Reaksi ini tidak hanya tergantung pada adanya oksigen, tetapi juga pada pH. Santoso dan Fatimah (2001) menyatakan bahwa enzim polifenol oksidase optimalnya pada pH 6,5 dan menurun seiring dengan turunnya pH. Hal inilah yang menyebabkan pada saat pembuatan media kultur harus dikondisikan pada pH 5,8.

Daisy (1994) menyatakan bahwa pencoklatan merupakan hasil oksidasi dari senyawa fenolik dan menyebabkan kematian jaringan. Terbentuknya senyawa fenolik, salah satunya dipengaruhi oleh spesies tanaman (Ozyigit et al., 2007). Anggrek *V. tricolor* L. var. *suavis* mengandung senyawa fenolik yang lebih tinggi pada jaringannya dibandingkan anggrek *Phalaenopsis amabilis*, sehingga memacu terjadinya pencoklatan (Dwiyani, 2012). Hal ini sejalan dengan pernyataan George dan Sherrington (1984) yang menyatakan bahwa tanaman tropika mempunyai kandungan senyawa fenolik yang tinggi dan akan teroksidasi apabila terjadi pelukaan. Dalam penelitian ini, pencoklatan diduga disebabkan karena senyawa fenol yang teroksidasi berubah menjadi senyawa aktif quinon dan senyawa lain (polimerase) yang bersifat racun dan mengarahkan eksplan mengalami kematian.

Proses pencoklatan menurut George dan Sherrington (1984) dapat ditanggulangi dengan beberapa cara, antara lain: 1) menghilangkan senyawa fenolik melalui subkultur eksplan ke media

baru, penambahan arang aktif dengan dosis 2 gr/L, dan penggunaan PVP (*polivenolpirolidon*); 2) memodifikasi potensial redoks dengan penambahan asam askorbat ($C_6H_8O_6$) pada media kultur; 3) menghambat aktivasi enzim fenol oksidase dengan penambahan EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) pada media kultur; serta 4) menurunkan aktivitas fenolase dan ketersediaan substrat dengan penggunaan asam askorbat yang mampu menurunkan pH dan penggelapan selama 14 hari.

Saat Munculnya Tunas (HST), Persentase rata-rata eksplan yang tumbuh tunas (%), dan Rata-rata jumlah tunas per eksplan (buah)

Saat munculnya tunas diamati setiap dua hari sekali dan diamati hari saat tunas muncul. Saat munculnya tunas paling cepat dicapai pada media M1 dan M4 (umur 3 HST), sedangkan munculnya tunas paling lama pada media M0 (umur 12 HST). Jenis eksplan B2 menghasilkan saat munculnya tunas paling cepat (umur 5 HST), sedangkan paling lama pada perlakuan B1 (umur 8 HST), namun secara statistic berbeda tidak nyata (Tabel 2).

Persentase rata-rata eksplan yang tumbuh tunas dihitung pada umur 5 MST. Persentase rata-

rata eksplan yang tumbuh tunas tertinggi pada perlakuan media terdapat pada level M0 dan perlakuan jenis eksplan terdapat pada level B1 (masing-masing 44,4% dan 26,6%). Persentase rata-rata eksplan yang tumbuh tunas terendah pada perlakuan media terdapat pada level M1 dan M4 yaitu 16,7% dan pada perlakuan jenis eksplan pada level B2 sebesar 22,2% (Tabel 2). Rata-rata jumlah tunas per eksplan tertinggi (1,33) pada media M0 dan terendah pada media M4 (0,50). Perlakuan jenis eksplan B1 memberikan rata-rata jumlah tunas per eksplan tertinggi sebesar 0,9 buah dan terendah pada eksplan B2 sebesar 0,7 buah, namun berbeda tidak nyata (Tabel 2)

Persentase rata-rata eksplan yang tumbuh tunas dan rata-rata jumlah tunas per eksplan cenderung tinggi pada media tanpa penambahan ZPT (M0) dan pada eksplan B1. Hal tersebut menunjukkan bahwa, apabila konsentrasi auksin dan sitokinin yang ditambahkan pada media terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Pada dasarnya eksplan mempunyai kandungan hormon endogen yang berbeda seperti yang dinyatakan oleh Abidin (1990). Menurut Kyte (1983) dan Torres (1989) jenis serta konsentrasi auksin dan sitokinin yang

Tabel 1. Pengaruh Perlakuan Media (M) dan Jenis Eksplan (B) terhadap Persentase Rata-rata Jumlah Eksplan Hidup (%) dan Persentase Rata-rata Pencoklatan (%)

Perlakuan	Persentase Rata-rata Jumlah Eksplan Hidup (%)	Persentase Rata-rata Pencoklatan (%)
Level Media		
M0	22,2 a	0,0 a
M1	22,2 a	0,0 a
M2	50,0 a	0,0 a
M3	44,5 a	0,0 a
M4	38,9 a	5,6 a
Level Jenis Eksplan		
B1	48,9 a	2,2 a
B2	22,2 b	0,0 a

Keterangan : Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom untuk faktor perlakuan yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada uji Duncan's taraf 5%.

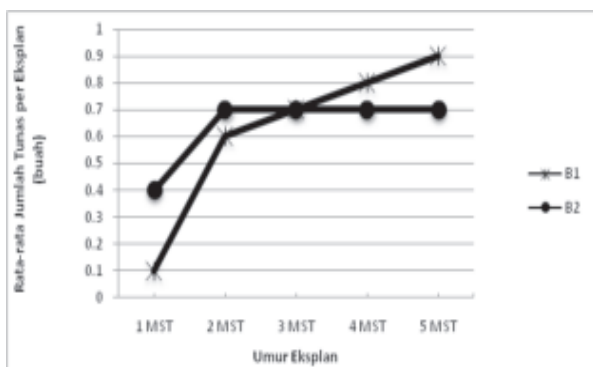
Tabel 2. Pengaruh Perlakuan Media (M) dan Jenis Eksplan (B) terhadap Saat Munculnya Tunas (HST), Persentase Rata-rata Eksplan yang Tumbuh Tunas (%), dan Rata-rata Jumlah Tunas per Eksplan (buah)

Perlakuan	Saat munculnya tunas (HST)	Persentase Rata-rata eksplan yang tumbuh tunas (%)	Rata-rata jumlah tunas per eksplan (buah)
Level Media			
M0	12 a	44,4 a	1,33 a
M1	3 a	16,7 a	0,83 a
M2	8 a	22,2 a	0,67 a
M3	8 a	22,2 a	0,67 a
M4	3 a	16,7 a	0,50 a
Level Jenis Eksplan			
B1	8 a	26,6 a	0,9 a
B2	5 a	22,2 a	0,7 a

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom untuk faktor perlakuan yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada uji Duncan's taraf 5%.

dibutuhkan untuk menginduksi terjadinya morfogenesis sangat beragam pada eksplan yang akan digunakan, baik antar genus, antar spesies, bahkan antar kultivar. Hal ini juga sejalan dengan pendapat Hartman *et al.* (1990) yang menyatakan bahwa tanaman yang berbeda dapat merespon ZPT (auksin dan sitokinin) dalam berbagai konsentrasi secara berbeda

Rata-rata jumlah tunas per eksplan pada eksplan B1 cenderung meningkat pada setiap umur pengamatan, sedangkan pada eksplan B2 cenderung meningkat pada umur 2 MST dan



Gambar 1. Grafik Nilai Rerata Jumlah Tunas per Eksplan pada Perlakuan Jenis Eksplan

mengalami stagnansi pada umur berikutnya (Gambar 1). Hal ini diduga karena adanya auksin dan sitokinin endogen yang terdapat pada jaringan eksplan. Penambahan sitokinin eksogen yang tinggi mempunyai efek negatif terhadap pertumbuhan jaringan tanaman (Wattimena, 1998). Ketersediaan sitokinin endogen pada eksplan diduga telah cukup untuk pertumbuhannya, sehingga tanpa pemberian sitokinin eksogen eksplan dapat melakukan pertumbuhan dan perkembangan. Hal ini sangat terkait dengan fungsi sitokinin, yaitu untuk meningkatkan pembelahan sel, dominansi apikal, dan diferensiasi tunas (Abbas, 2011).

Penanaman eksplan dalam penelitian ini sudah mampu menginduksi terbentuknya propagul, baik berupa tunas maupun struktur pembengkakan yang berwarna hijau. Dalam penelitian ini, propagul tersebut tumbuh menjadi tunas dan pada akhirnya membentuk planlet. Eksplan rata-rata menghasilkan satu buah tunas. Meskipun demikian, penelitian ini sudah memberikan informasi yang berharga untuk penelitian selanjutnya dalam upaya konservasi anggrek alam seperti *V. tricolor* Lindl. var. *suavis*

SIMPULAN

1. Tidak diperoleh pengaruh interaksi antar faktor perlakuan untuk semua peubah yang diamati.
2. Media kultur tanpa penambahan ZPT menunjukkan hasil terbaik terhadap peubah persentase rata-rata pencoklatan (0,0%), jumlah eksplan yang tumbuh tunas (44,4%), dan rata-rata jumlah tunas per eksplan (1,33 buah) pada induksi tunas anggrek *V. tricolor* Lindl. var. *suavis*.
3. Eksplan ujung batang menunjukkan kecenderungan hasil terbaik terhadap peubah persentase rata-rata jumlah eksplan hidup (48,9%), jumlah eksplan yang tumbuh tunas (26,6%), dan rata-rata jumlah tunas per eksplan (0,9 buah) pada induksi tunas anggrek *V. tricolor* Lindl. var. *suavis*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan sebagian dari penelitian Hibah Bersaing Desentralisasi Tahun 2013 yang dibiayai Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia. Untuk itu penulis mengucapkan terimakasih yang setinggi tingginya. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Udayana yang telah memfasilitasi pengadaan dana tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, B. 2011. *Prinsip Dasar Teknik Kultur Jaringan*. CV. Alfabeta, Bandung.
- Abidin, Z. 1990. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Angkasa, Bandung.
- Daisy, P., S. Hendaryono, dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta
- Dwiyani, R. 2012. Mikropropagasi Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali yang Membawa Gen *KNOTTED1- LIKE Arabidopsis thaliana* (*KNATI*). Disertasi Doktor. Program Studi Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Dwiyani, R. 2013. Induksi Kalus pada Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*, Upaya Penyediaan Target Transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrotropika*, 18(2): 73-76.
- Dwiyani, R. 2014. *Anggrek Vanda tricolor Lindl. var. suavis*. Udayana University Press, Denpasar. 74h.
- Djelantik, S. 1995. Buku Ajar '*Dasar-dasar Agronomi*'. Fakultas Pertanian, Universitas Udayana.
- Gardiner, L. M. 2007. *Vanda tricolor* Lindl. Conservation in Java, Indonesia: Genetic and Geographic Structure and History. *Lankesteriana* 7: 272-280.
- George, E.F. and P.D. Sherrington 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Hand book and directory of comercial laboratories. Eastern Press, England.
- Hartman, H.T., D.E. Kester, and F.T. Davis-Jr. 1990. *Plant Propagation: Principles and Practice*, Fifth Edition. Prentice-Hall International, Inc., USA. 647 p.
- Hutami, S. 2008. Ulasan 'Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan'. *AgroBiogen*, 4(2): 83-88.
- Kyte, L. 1983. *Plant From Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*. Oregon: Timber Press, Portland.
- Ozyigit, I.I., M.V. Kahraman, and O. Ercan. 2007. Relation between Explant Age, Total Phenols and Regeneration Response in Tissue Cultured Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African J. Biotechnol*, 6(1): 3-8.
- Pierik, R.L.M. 1997. In Vitro Culture of Higher Plants *In Zulkarnain*. Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyakkan Tanaman Budi Daya. PT. Bumi Aksara. Jakarta.
- Santoso, U. dan N. Fatimah. 2001. *Kultur Jaringan Tanaman*. UMM Press, Malang.
- Torres, K. C. 1989. *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Wattimena, G.A. 1998. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman Laboratorium*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor.