

**PENGARUH *THIDIAZURON* DAN *NAPHTALENE ACETIC ACID* UNTUK
INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK DARI DAUN ANGGREK *Phalaenopsis* “Sogo
Vivien”**

Pauline Destinugrainy Kasi¹ dan Endang Semiarti²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains, Universitas Cokroaminoto Palopo

²Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

Email: pauline@uncp.ac.id

ABSTRAK

Phalaenopsis “Sogo Vivien” merupakan salah satu anggrek hibrida hasil persilangan *Phalaenopsis* “Sogo Alice” X *Phalaenopsis* “Zuma’s Pixie” dengan karakteristik morfologi berukuran mini serta memiliki bunga serta percabangan infloresensia yang banyak, sehingga dapat digunakan sebagai tanaman hias dalam pot. Embriogenesis somatik merupakan teknik mikropropagasi *in vitro* yang dapat menghasilkan anakan yang seragam dalam jumlah besar. Induksi embriogenesis somatik pada anggrek *P. “Sogo Vivien”* dapat dilakukan melalui perlakuan zat pengatur tumbuh *Thidiazuron* (TDZ) (0,5 dan 10 mg/l) yang dikombinasikan dengan *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) 1 mg/l. Eksplan yang digunakan berupa daun dari *seedling in vitro* anggrek *P. “Sogo Vivien”*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa TDZ 10 mg/l yang dikombinasikan dengan NAA 1 mg/l mampu menginduksi pembentukan embrio somatik secara langsung pada eksplan daun anggrek *P. “Sogo Vivien” in vitro*. Efisiensi pembentukan embrio somatik yang diperoleh adalah 5,7% dengan jumlah embrio somatik yang terbentuk adalah 57 embrio dari 1 eksplan daun. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa embrio somatik dapat diinduksi pada eksplan daun anggrek *P. “Sogo Vivien”* dengan menggunakan TDZ dan NAA

Kata kunci : anggrek, embriogenesis somatik, *thidiazuron*, *naphthalene-acetic-acid*.

PENDAHULUAN

Tanaman anggrek telah menjadi tanaman industri bernilai tinggi di beberapa negara seperti Thailand, Australia, Singapura, Malaysia dan Indonesia. Anggrek dipasarkan sebagai bunga potong maupun tanaman pot. Genus *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium* dan *Phalaenopsis* merupakan anggrek yang paling banyak diminati oleh pasar global (Chugh *et al.*,

2009). Di antara genus tersebut, *Phalaenopsis* merupakan anggrek yang paling populer (Griesbach, 2002). Peningkatan kualitas anggrek hibrida terutama ditujukan untuk mendapatkan warna bunga, corak bunga dan ukuran bunga yang baru. Selain itu juga diupayakan untuk mendapatkan jumlah bunga yang banyak. Lebih dari 100.000 anggrek hibrida komersial telah didaftarkan untuk memenuhi

permintaan bunga potong (*cut-flowers*) dan tanaman pot (*potted-plant*) di seluruh dunia (Vendrame *et al.*, 2007).

Permintaan akan tanaman hias dalam pot semakin meningkat dalam dekade terakhir. Perbanyakkan anggrek untuk tanaman hias dalam pot berbeda dengan bunga potong. Selain warna dan corak bunga yang menarik, habitus vegetatif tanaman juga merupakan faktor penting yang harus diperhatikan. Habitus tanaman yang kecil (mini), jumlah bunga yang banyak, percabangan infloresensia yang banyak, mudah dipelihara dan cepat berbunga adalah kriteria yang diinginkan untuk tanaman hias dalam pot (Tang and Chen, 2007). Salah satu anggrek hibrida *Phalaenopsis* yang memenuhi kriteria untuk menjadi tanaman hias dalam pot adalah *Phalaenopsis* “Sogo Vivien”. Ukuran tanaman mini dan bunga warna pink dengan pola bergaris membuat tanaman anggrek ini memiliki nilai komersial yang tinggi dan banyak diburu oleh para kolektor anggrek. Untuk menjaga keberlangsungan bisnis anggrek hibrida diperlukan kontinuitas penyediaan bibit tanaman dalam jumlah besar. Namun, informasi mengenai propagasi anggrek *P. “Sogo Vivien”* masih sedikit dan belum ada publikasi ilmiah mengenai hal tersebut.

Perbanyakkan suatu jenis anggrek tertentu umumnya dilakukan dengan teknik mikropropagasi bagian dari organ anggrek tersebut secara *in vitro*. Perbanyakkan vegetatif dengan menggunakan mata tunas dari tangkai bunga dinilai tidak efektif karena hanya menghasilkan satu tanaman dari setiap tunas (Kosir *et al.*, 2004). Produksi massal dalam waktu yang cepat, serta menghasilkan anakan anggrek yang identik dengan induknya dibutuhkan untuk memenuhi permintaan pasar. Salah satu teknik mikropropagasi *in vitro* yang dapat menghasilkan anakan yang seragam dalam jumlah besar adalah melalui embriogenesis somatik (Arnold *et al.*, 2002).

Pembentukan embrio somatik membutuhkan eksplan (bahan tanaman) yang berbeda. Penggunaan eksplan daun untuk menghasilkan embrio somatik telah dilakukan pada beberapa jenis anggrek seperti *Phalaenopsis* (Chen and Chang, 2006; Kuo *et al.*, 2005; Utami *et al.*, 2007), *Doritenopsis* (Park *et al.*, 2002), *Oncidium* (Chen *et al.*, 1999), *Dendrobium* (Martin and Madassery, 2006) dan *Paphiopedilum* (Chen *et al.*, 2004).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan komponen penting dalam proses embriogenesis somatik (Jimenez, 2001). Induksi kalus dan embriogenesis somatik

Pengaruh Thidiazuron dan Naphtalene Acetic Acid untuk Induksi Embriogenesis Somatik dari Daun Anggrek Phalaenopsis “Sogo Vivien”

pada anggrek *Phalaenopsis* dan *Doritaenopsis* dengan menggunakan senyawa auksin dan sitokinin telah banyak dilakukan, salah satunya dengan menggunakan ZPT *thidiazuron* (TDZ) dan *α -naphtaleneacetic acid* (NAA) (Park *et al.*, 2002; Tokuhara and Mii, 2001; Utami *et al.*, 2007). Pada penelitian ini ingin didapatkan metode efektif untuk perbanyak anggrek *P. “Sogo Vivien”* melalui induksi embriogenesis somatik dengan menggunakan ZPT TDZ yang dikombinasikan dengan NAA dengan menggunakan eksplan berupa daun dari *seedling in vitro* anggrek *P. “Sogo Vivien”*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi yang tepat dari TDZ yang dikombinasikan dengan NAA untuk menginduksi embriogenesis somatik *P. “Sogo Vivien”*.

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat antara lain : 1) memberikan informasi tentang teknik perbanyak klonal anggrek *P. “Sogo Vivien”* yang efektif, efisien serta aplikatif sehingga dapat mendukung peningkatan industri anggrek; 2) dapat memproduksi bibit anggrek *P. “Sogo Vivien”* secara massal.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk pembuatan medium kultur adalah timbangan analitik, labu Erlenmeyer, *magnetic stirrer*, gelas beker, botol kultur, cawan petri, mikropipet, pipet tip, kertas indikator pH, pipet, batang pengaduk, blender, penyaring dan autoclave. Alat yang digunakan dalam proses penanaman eksplan adalah *Laminar Air Flow* (LAF), pinset, scalpel, cawan petri, lampu Bunsen, labu Erlenmeyer dan gelas beker.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas bahan tanaman dan bahan kimia. Bahan tanaman berupa daun *in vitro* anggrek *P. “Sogo Vivien”*. Bahan kimia yang digunakan meliputi komponen penyusun medium New Phalaenopsis (NP) menurut Islam *et al.* (1998) (Lampiran 1), sukrosa (Merck), bahan pematik *Gellan Gum*, arang aktif (Merck), zat pengatur tumbuh *Thidiazuron* (Caisson) dan NAA (Merck) dan aluminium foil.

Cara Kerja

Pembuatan medium kultur

Medium kultur yang digunakan adalah medium NP dengan kombinasi TDZ (0, 5 atau 10) mg/L dan NAA 1 mg/L masing-masing sebanyak 250 mL. Pembuatan medium kultur secara umum adalah sebagai berikut: disiapkan akuades sebanyak 100 mL di dalam labu Erlenmeyer. Masing-

masing komponen makronutrien ditimbang sesuai dengan tabel komposisi medium (Lampiran 1), dilarutkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah semua makronutrien larut, kemudian ditambahkan berturut-turut 250 µL stok mikronutrien, 250 µL stok vitamin, 1.250 µL stok senyawa besi dan stok zat pengatur tumbuh (1,25 mL atau 2,5 mL TDZ serta 250 µL NAA). Setelah semua larut kemudian ditambahkan 37,5 mL air kelapa dan 5 g sukrosa. pH medium dibuat pH 5-6 dengan menggunakan NaOH 0,1 N atau HCl 0,1 N. Terakhir dimasukkan 0,25 g arang aktif dan 0,5 g *Gellan Gum* sebagai bahan pematid, kemudian medium dipanaskan hingga *Gellan Gum* larut. Medium selanjutnya disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit, kemudian medium dituang ke dalam cawan petri. Cawan petri berisi medium disegel dengan plastik *wrap* dan didinginkan hingga membeku.

Penanaman eksplan. Daun *in vitro* yang digunakan sebagai eksplan tidak disterilisasi. Daun yang digunakan adalah daun ketiga dari pangkal batang tanaman angrek *in vitro* berumur 2 tahun. Daun

diambil dengan cara dipotong di bagian pangkalnya. Selanjutnya daun dibagi menjadi dua bagian yaitu bagian ujung dan pangkal. Eksplan lalu ditanam pada medium kultur. Setiap cawan petri diisi 5 potongan eksplan. Cawan petri yang berisi eksplan diinkubasi dalam kondisi gelap (dibungkus dengan aluminium foil) dan diletakkan pada ruang inkubasi dengan suhu 26°C selama 8 minggu. Subkultur pada media yang sama dilakukan setiap 4 minggu. Setelah itu eksplan diinkubasikan pada ruang inkubasi dengan pencahayaan lampu TL cool-white fluorescent 18 watt (~ 40 lux), suhu (26 ± 2) °C dengan durasi pencahayaan 8 jam terang dan 16 jam gelap. Setiap minggu dilakukan pengamatan terbentuknya embrio somatik.

Eksplan yang membentuk embrio somatik kemudian dipindahkan pada medium NP tanpa penambahan ZPT. Subkultur dilakukan dengan medium baru setiap 4 minggu sekali hingga terbentuk plantlet. Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk embrio somatik}}{\text{Jumlah eksplan keseluruhan}} \times 100\%$$

Pengaruh Thidiazuron dan Naphtalene Acetic Acid untuk Induksi Embriogenesis Somatik dari Daun Anggrek Phalaenopsis “Sogo Vivien”

Sedangkan efisiensi pembentukan embrio somatik dihitung dengan menggunakan rumus : Jumlah embrio somatik yang terbentuk X persentase eksplan yang membentuk embrio somatik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi embriogenesis somatik pada daun *in vitro* anggrek *P. “Sogo Vivien”* menggunakan eksplan daun kedua dari pangkal batang plantlet anggrek *P. “Sogo Vivien” in vitro* yang berumur 2 tahun

sebagai sumber eksplan (Gambar 1A). Embrio somatik terbentuk pada eksplan daun bagian pangkal yang dikulturkan pada medium NP dengan penambahan TDZ 10 mg/L dan NAA 1 mg/L. Dari 5 eksplan yang dikulturkan, hanya 1 eksplan yang membentuk embrio somatik. Sementara pada eksplan daun bagian ujung dan pada perlakuan TDZ 0 dan 5 mg/L tidak ada eksplan yang membentuk embrio somatik (Tabel 1).

Tabel 1. Persentase pembentukan embrio somatik pada daun *in vitro* anggrek *P. “Sogo Vivien”* dengan kombinasi TDZ dan NAA, 8 minggu setelah tanam.

Media Perlakuan	Jumlah Eksplan Awal	Asal Eksplan	Jumlah Eksplan yang Membentuk Embrio Somatik	Persentase Eksplan yang Membentuk Embrio Somatik	Jumlah Embrio Somatik yang Terbentuk
T0N1	5	Pangkal	0	0 %	0
	5	Ujung	0	0 %	0
T5N1	5	Pangkal	0	0 %	0
	5	Ujung	0	0 %	0
T10N1	5	Pangkal	1	20 %	57
	5	Ujung	0	0 %	0

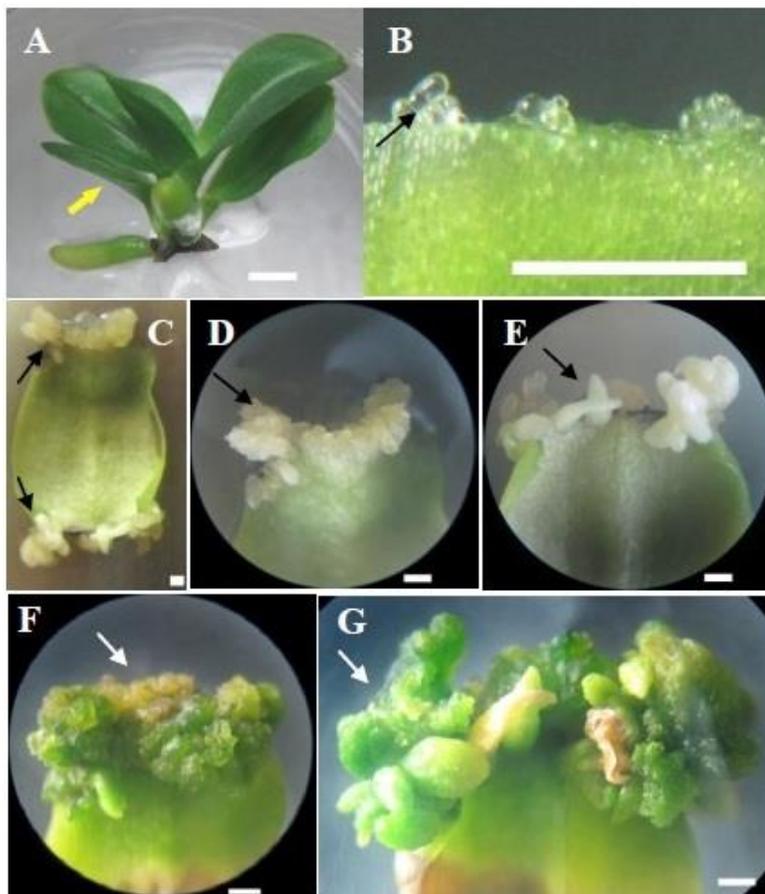
Daun pada bagian pangkal memiliki sel-sel yang secara fisiologis lebih muda dibandingkan dengan bagian ujung, sehingga terdapat lebih banyak sel yang bersifat meristematis dan dapat tumbuh menjadi embrio somatik. Utami *et al.* (2007) juga menggunakan eksplan berupa daun bagian pangkal dari tanaman anggrek *P.*

amabilis untuk mendapatkan embrio somatik.

Pada perlakuan TDZ 5 mg/L dan NAA 1 mg/L hanya terbentuk kalus namun tidak bersifat embriogenik. Kalus non embriogenik mulai terbentuk pada umur 2 minggu setelah inokulasi eksplan. Kalus non embriogenik berwarna bening transparan,

tumbuh di tepi potongan eksplan dan tidak mengalami perkembangan lebih lanjut (Gambar 1B). Eksplan yang tidak mengalami perkembangan lebih lanjut mengalami nekrosis dan kemudian mati.

Sementara pada perlakuan TDZ 10 mg/l dan NAA 1 mg/l embrio somatik terbentuk secara langsung tanpa melalui tahapan pembentukan kalus terlebih dahulu (Gambar 1C).



Gambar 1. Perkembangan embrio somatik pada daun anggrek *P. "Sogo Vivien"* secara *in vitro*. A. Sumber eksplan adalah plantlet anggrek *P. "Sogo Vivien"* *in vitro* yang berumur 2 tahun (Skala bar: 1 cm). B. Kalus non embriogenik (tanda panah) yang terbentuk pada eksplan daun dengan perlakuan TDZ 5 mg/l dan NAA 1 mg/L 2 minggu setelah inokulasi eksplan. C. Embrio somatik (tanda panah) yang terbentuk pada eksplan daun 8 minggu setelah inokulasi eksplan dengan perlakuan TDZ 10 mg/l dan NAA 1 mg/L. D, E. Embrio somatik (tanda panah) yang terbentuk berwarna putih mengkilat. F, G. Embrio somatik (tanda panah) berubah warna menjadi hijau setelah dikulturkan di ruang terang pada umur 11 minggu setelah inokulasi eksplan. (B-G. Bar: 1 mm).

Embrio terbentuk pada tepi potongan eksplan (di bagian pelukaan). Embrio

sebagian berbentuk globular (Gambar 1D) dan sebagian sudah mengalami

Pengaruh Thidiazuron dan Naphtalene Acetic Acid untuk Induksi Embriogenesis Somatik dari Daun Anggrek Phalaenopsis "Sogo Vivien"

perkembangan lebih lanjut (Gambar 1E). Embrio somatik berwarna putih mengkilat. Setelah dipindahkan ke ruang terang, embrio somatik berubah warna menjadi hijau (Gambar 1F dan 1G). Jumlah embrio somatik yang terbentuk adalah 57 embrio (Tabel 1) dengan efisiensi pembentukan embrio somatik sebesar 5,7%. Hal yang sama juga ditemukan oleh Park *et al.* (2002), pada induksi *protocorm-like bodies* (PLBs) dari kultur *in vitro* daun anggrek *Doritaenopsis* hibrida. PLBs terbentuk langsung dari eksplan daun tanpa melewati tahap pembentukan kalus. Adapun kalus yang terbentuk tidak mengalami perkembangan lebih lanjut menjadi PLBs. Eksplan yang tidak membentuk PLBs mengalami nekrosis dan mati. Pembentukan embrio somatik langsung dari jaringan eksplan tanpa melewati tahapan pembentukan kalus disebut sebagai embriogenesis somatik langsung (Indrianto, 2003). Sel-sel yang mengalami proliferasi pada eksplan akan membentuk proembrio yang selanjutnya akan membentuk embrio somatik globuler (Karami *et al.*, 2009)

Penggunaan TDZ sebagai zat pengatur tumbuh untuk menginduksi embriogenesis somatik telah banyak dilakukan. Pada penelitian ini embriogenesis somatik terbentuk pada penggunaan TDZ dengan

konsentrasi 10 mg/L. Konsentrasi ini relatif lebih tinggi jika dibandingkan dengan beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Park *et al.* (2002) menyatakan TDZ dengan konsentrasi 2 mg/L efisien untuk membentuk PLB dari eksplan daun *Doritenopsis* hibrida dengan metode *thin-section culture*. Hal yang sama juga diperoleh oleh Kuo *et al.* (2005), dimana penggunaan TDZ 1 mg/L mampu menginduksi embriogenesis somatik pada eksplan daun *P. "Little Steve"*, sementara Khoddamzadeh *et al.* (2011) menginduksi PLB dari daun anggrek *P. bellina* dengan menggunakan kombinasi ZPT TDZ 3 mg/L dan NAA 1 mg/L. Penggunaan TDZ pada konsentrasi yang lebih rendah dari 5 mg/L pada eksplan daun anggrek *P. "Sogo Vivien"* tidak menghasilkan pembentukan kalus non embriogenik maupun embrio somatik, sehingga diperlukan konsentrasi TDZ yang lebih tinggi dibandingkan anggrek lainnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat ditarik simpula bahwa perlakuan ZPT TDZ 10 mg/L yang dikombinasikan dengan NAA 1 mg/L pada medium NP + air kelapa 15% adalah perlakuan yang paling tepat untuk

menginduksi embriogenesis somatik pada eksplan daun *P. "Sogo Vivien"*. Efisiensi pembentukan embrio somatik sebesar 5,7%, dengan jumlah tunas yang dihasilkan sebanyak 57 tunas dari bagian pangkal daun.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., and Filonova, L. 2002. Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 69: 233-249.
- Chen, J.T., Chang, C., and Chang, W.C. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium 'Gower Ramsey'* and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Report* 19: 143-149
- _____. 2004. Plant regeneration through shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 76: 11-15.
- Chen, J.T. and Chang, W.C., 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum* 50: 169-173.
- Chugh, S., Guha, S., and Rao, I.U. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae* 122: 507-520.
- Griesbach, R.J. 2002. *Development of Phalaenopsis orchids for the mass market*. In: Jainick, J. and Whipkey, A (Eds.) *Trends in New Crops and New Uses*. ASHS Press. Alexandria, VA.
- Indrianto, A. 2003. *Bahan Ajar Kultur Jaringan Tumbuhan*. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.
- Islam, M.O., Ichihashi, S., and Matsui, S. 1998. Control of growth and development of protocorm like body from callus by carbon sources in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnology* 15(4): 183-187.
- Jimenez, V. M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13(2): 196-223.

Pengaruh Thidiazuron dan Naphtalene Acetic Acid untuk Induksi Embriogenesis Somatik dari Daun Anggrek Phalaenopsis "Sogo Vivien"

- Karami, O., Aghavaisi, B., and Pour, A.M. 2009. Molecular aspect of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of Chemical Biology* 2(4): 177-190.
- Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Kadir, M. A., Kadzimin, S. B., Mahmood, M., and Sreeramanan, S. 2011. *In vitro* induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. *Plant Growth Regulation* 65: 381-387.
- Kosir, P., Suzana, S., and Zlata, L. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Agriculturae Slovenica* 83:233-242.
- Kuo, H.L., Chen, J.T., and Chang, W.C. 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 41: 453-456.
- Martin, K.P. and Madassery, J.P. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants and protocorm like bodies. *Scientia Horticulturae* 108: 95-99.
- Park, S.Y., Yeung, E.C., Chakrabarty, D., and Paek, K.Y. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Reports* 21:46-51
- Tang, C. and Chen, W. 2007. *Breeding and development of new varieties in Phalaenopsis*. pp: 1-22. In: Chen, W. and Chen, H. (Eds.). *Orchid Biotechnology*. World Scientific Publishing. Singapore.
- Tokuhara, K. and Mii, M. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 37(4) : 457-461

Utami, E.S.W., Soemardi, I., Taryono dan Semiarti, E. 2007. Embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. : Struktur dan pola perkembangan. *Berkala Penelitian Hayati* 13: 33-38

Vendrame, W.A., Maguire, I., and Carvalho, V.S. 2007. In Vitro propagation and plantlet regeneration from *Doritaenopsis* Purple Gem 'Ching Hua' Flower Explants. *HortScience* 42(5): 1256 – 1258.