

INDUKSI PROTOCORM-LIKE BODIES (PLBs) *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*

Popy Hartatie Hardjo*, Chandra Widjaja Surya Binarto, dan Wina Dian Savitri
Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya
Jln. Raya Kalirungkut, Surabaya, East Java, Indonesia

* Corresponding author : Tlp: 031-2981399, Fax: 031-2981278,
Email: poppy_hardjo@staff.ubaya.ac.id

ABSTRACT

Vanda tricolor merupakan salah satu jenis anggrek yang memiliki bunga yang besar, warna yang mencolok, dengan aroma yang harum. Penelitian ini bertujuan untuk menginduksi pembentukan protocorm-like bodies (PLBs) dari eksplan daun dan batang (mengandung meristem tunas) *Vanda tricolor* var. *pallida*. Eksplan dikulturkan pada media $\frac{1}{2}$ MS yang mengandung sukrosa 1% dengan variasi kombinasi zat pengatur tumbuh *naphtalene acetic acid* (NAA) (0,5-4,0 ppm), 6-*benzylaminopurine* (BAP) (0,5-2,0 ppm), dan thidiazuron (TDZ) (0,5-2,0 ppm) selama 8 minggu. Pembentukan PLBs pada eksplan batang lebih banyak dibanding eksplan daun pada kombinasi NAA 1,0 ppm + BAP 0.5 ppm berdasarkan waktu pembentukan PLBs dan persentase eksplan membentuk PLBs, di mana PLBs mulai terbentuk setelah 4 minggu masa kultur, dan 70% eksplan batang mampu membentuk PLBs.

Keywords: induksi PLBs, palida, *Vanda tricolor* var.

PENDAHULUAN

Perbanyakan anggrek *Vanda tricolor* umumnya dilakukan dengan cara perkecambahan biji secara *in vitro*, sehingga hasil yang diperoleh tidak seragam dan menghasilkan warna bunga yang beragam. Berbagai studi perbanyakan anggrek secara *in vitro* banyak dilakukan dengan menggunakan eksplan nodus batang, jaringan daun, dan ujung akar, tetapi seringkali sulit beregenerasi dan kecepatan multiplikasi relatif rendah. Untuk mengatasi masalah ini, dilakukan upaya perbanyakan secara *in vitro* pada kultivar yang terpilih dengan cara membentuk PLBs atau embrio somatik melalui embriogenesis somatik.

Lee *et al* (2013) berhasil membuktikan berdasarkan struktur morfologi dan perkembangannya, PLBs anggrek sebenarnya adalah sama dengan embrio somatik. Keunggulan embrio somatik yaitu jaringan meristem akar dan pucuk telah terbentuk saat embrio matang, bentuk anatomi dan sifatnya serupa dengan embrio zigotik benih biasa. Regenerasi membentuk tanaman lengkap mudah terjadi dari embrio yang matang.

PLBs dapat diperbanyak secara langsung (embriogenesis langsung) dari berbagai eksplan daun (Khoddamzadeh *et al.*, 2011), protocorm (Mahendran and Bai, 2012), *pseudostem* (Roy *et al.*, 2012), daun kondisi etiolasi (Huang *et al.*, 2014) dan tidak langsung (embriogenesis tak langsung) dengan melalui fase terbentuknya kalus dari eksplan pangkal daun urutan ke-2 dari

pucuk (Utami dkk., 2007), daun (Naing *et al.*, 2011), PLBs (Huan *et al.*, 2004; Mei *et al.*, 2012), tunas pucuk dan daun muda (Romeida *et al.*, 2016).

Keberhasilan induksi dan perbanyakkan PLBs tergantung dari jenis eksplan, media dan komposisi zat pengatur tumbuh, serta genotipe. Media dan komposisi zat pengatur tumbuh yang tidak tepat menyebabkan PLBs gagal terbentuk atau beregenerasi. Zat pengatur tumbuh merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan embriogenesis somatik, seperti auksin dan sitokinin (Chen and Chang, 2001).

Pada angrek ada beberapa metode mikropropagasi berdasarkan macam eksplan, antara lain organogenesis langsung membentuk tunas dari eksplan potongan nodus dari batang (Shiau *et al.*, 2005), induksi planlet dari embrio/biji angrek, serta pembentukan PLBs dari pucuk, ujung akar, batang, tangkai bunga (Chen *et al.*, 2002), dan protocorm (Chen and Chang, 2004) melalui embriogenesis langsung.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis zat pengatur tumbuh yang tepat untuk menginduksi PLBs pada eksplan daun dan batang *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya dari bulan Januari hingga Juni 2016. Materi penelitian menggunakan eksplan daun dan batang (mengandung meristem) dari planlet *in vitro* *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* hasil *selfing* diperoleh dari *nursery* Handoyo Orchids, Malang. Media yang digunakan adalah media dasar Murashige-Skoog (MS), dan sebagai bahan pematat digunakan Phytigel (Sigma).

Metode Kerja

Eksplan potongan daun dan batang ditanam pada media dasar ½ MS dengan sukrosa 1% yang diberi berbagai perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh seperti terlihat pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Kombinasi zat pengatur tumbuh dalam media MS

Kode	Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh
N _{0.5} B _{0.5}	NAA 0.5 ppm + BAP 0.5 ppm
N _{1.0} B _{0.5}	NAA 1.0 ppm + BAP 0.5 ppm
N _{2.5} B _{1.5}	NAA 2.5 ppm + BAP 1.5 ppm
N _{4.0} B _{2.0}	NAA 4.0 ppm + BAP 2.0 ppm
N _{0.5} T _{0.5}	NAA 0.5 ppm + TDZ 0.5 ppm
N _{1.0} T _{0.5}	NAA 1.0 ppm + TDZ 0.5 ppm
N _{2.5} T _{1.5}	NAA 2.5 ppm + TDZ 1.5 ppm

N _{4.0} T _{2.0}	NAA 4.0 ppm + TDZ 2.0 ppm
B _{0.5}	BAP 0.5 ppm
B _{1.0}	BAP 1.0 ppm
B _{1.5}	BAP 1.5 ppm
B _{2.0}	BAP 2.0 ppm
T _{0.5}	TDZ 0.5 ppm
T _{1.0}	TDZ 1.0 ppm
T _{1.5}	TDZ 1.5 ppm
T _{2.0}	TDZ 2.0 ppm

Kultur diinkubasi dalam ruang pada temperatur 25°C dengan intensitas cahaya 3000 lux selama 16 jam. Kultur dipelihara selama 6 bulan dengan subkultur sebanyak 3 kali.

Rancangan Penelitian

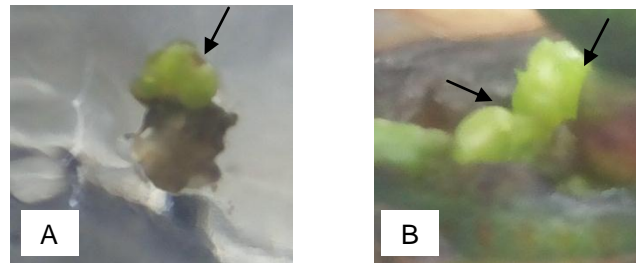
Penelitian merupakan percobaan 2 faktor yang disusun menggunakan rancangan acak lengkap. Faktor pertama macam eksplan (daun dan batang mengandung meristem) dan faktor kedua komposisi zat pengatur tumbuh (16 kombinasi zat pengatur tumbuh), dengan 20 ulangan (eksplan) setiap kombinasi perlakuan. Analisis data menggunakan ANAVA faktorial dan uji lanjut Duncan pada $\alpha=5\%$.

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah waktu terbentuknya PLBs langsung dari eksplan, persentase eksplan yang mampu membentuk PLBs, dan jumlah PLBs per eksplan. Pengamatan dilakukan setiap minggu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

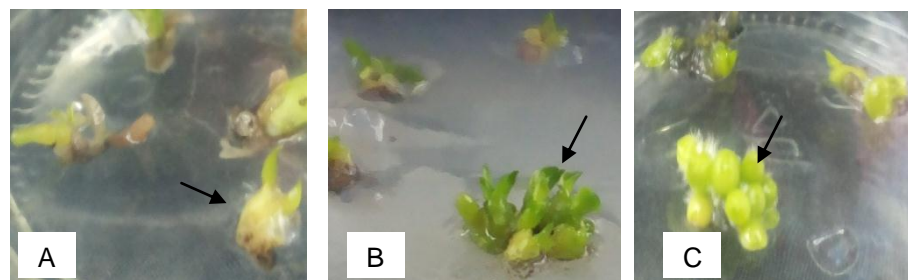
Induksi PLBs pada eksplan daun dan batang

Dari pengamatan pada seluruh perlakuan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh pada eksplan daun dan batang ternyata eksplan daun memiliki kemampuan sangat rendah membentuk PLBs, dan pada awalnya daun sangat mudah mengalami pencoklatan (Gambar 1A), kemudian baru mulai terbentuk PLBs pada 12 minggu masa kultur dan terjadi proliferasi PLBs pada NAA 1.0 ppm dikombinasi dengan BAP 0.5 ppm (Gambar 1B). Menurut Dwiyani (2012) anggrek *Vanda tricolor* L. var. *suavis* mengandung senyawa fenolik yang lebih tinggi pada jaringannya dibanding anggrek *Phalaenopsis amabilis*, sehingga memacu terjadinya pencoklatan eksplan. Pencoklatan merupakan hasil oksidasi senyawa fenolik dan menyebabkan kematian jaringan.



Gambar 1. Eksplan daun *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* yang membentuk PLBs. A. Awal pembentukan PLB 12 minggu masa kultur. B. Proliferasi PLBs 16 minggu masa kultur

Eksplan batang yang mengandung meristem mampu merespon dan lebih cepat membentuk PLBs, tanpa terjadi pencoklatan pada eksplan batang (Gambar 2A). Gambar 2B menunjukkan proliferasi PLBs dari eksplan batang pada zat pengatur tumbuh NAA 1.0 ppm dan BAP 0.5 ppm juga lebih cepat di mana dihasilkan 10 PLBs per eksplan dalam waktu 8 minggu masa kultur (Tabel 2) Setelah 20 minggu masa kultur di medium yang sama dengan dua kali subkultur, PLBs terlihat mulai beregenerasi membentuk tunas (Gambar 2C). PLBs lebih cepat terbentuk pada batang yang mengandung meristem dibanding daun, karena sel meristem merupakan sel muda dengan kecepatan pembelahan yang sangat tinggi sehingga kemampuan regenerasi lebih tinggi, sedangkan daun terdiri dari sel dewasa yang sudah terdiferensiasi sehingga lebih sulit dan butuh waktu kembali ke kondisi dediferensiasi untuk menjadi bersifat meristematik kembali.



Gambar 2. Eksplan batang *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* yang membentuk PLBs. A. Awal pembentukan PLB 4 minggu masa kultur. B. Proliferasi PLBs 8 minggu masa kultur. C. PLBs 20 minggu masa kultur.

Pengaruh zat pengatur tumbuh dalam medium tumbuh terhadap eksplan daun dan batang Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa respon batang membentuk PLBs lebih baik dari pada daun pada beberapa kombinasi jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh.

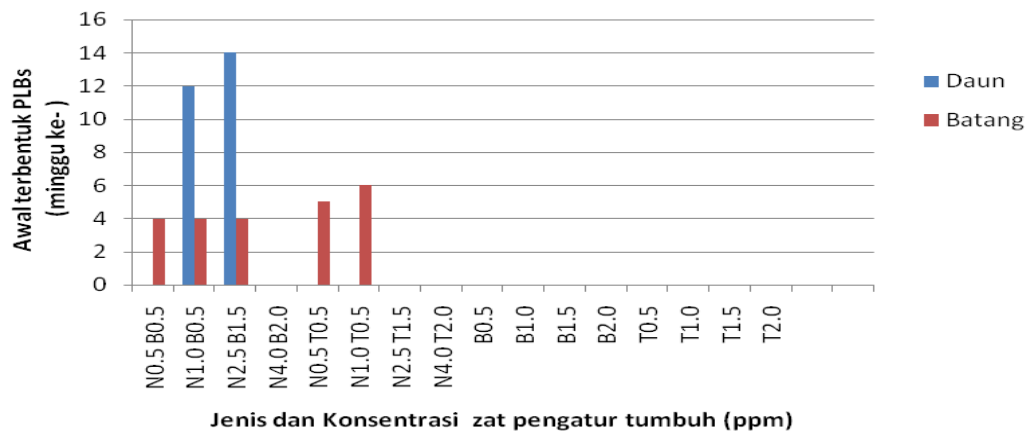
Tabel 2. Pengaruh jenis zat pengatur tumbuh pada eksplan daun dan batang terhadap persentase eksplan membentuk PLBs serta jumlah PLBs *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* 8 minggu setelah kultur

Perlakuan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ppm) dengan macam eksplan	Eksplan	Waktu awal pembentukan PLBs (minggu)	Persentase eksplan membentuk PLBs (%)	Jumlah PLBs per eksplan
0.5 ppm NAA + 0.5 ppm BAP	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	4	20 ^c (4/20)	8
1.0 ppm NAA + 0.5 ppm BAP	Daun	12	10 ^b (2/20)	1
	Batang	4	70 ^d (14/20)	10
2.5 ppm NAA + 1.5 ppm BAP	Daun	14	5 ^{ab} (1/20)	1
	Batang	4	20 ^c (4/20)	5
4.0 ppm NAA + 2.0 ppm BAP	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
0.5 ppm NAA + 0.5 ppm TDZ	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	5	10 ^b (2/20)	4
1.0 ppm NAA + 0.5 ppm TDZ	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	6	10 ^b (2/20)	3
2.5 ppm NAA + 1.5 ppm TDZ	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
4.0 ppm NAA + 2.0 ppm TDZ	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
0.5 ppm BAP	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
1.0 ppm BAP	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
1.5 ppm BAP	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
2.0 ppm BAP	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
0.5 ppm TDZ	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
1.0 ppm TDZ	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
1.5 ppm TDZ	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0
2.0 ppm TDZ	Daun	-	0 ^a	0
	Batang	-	0 ^a	0

Ket.: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama berarti berbeda nyata menurut Uji Duncan pada $\alpha=5\%$. Data persentase ditransformasi dengan $\arcsin\sqrt{x+0.5}$. Data rerata berasal dari 3 ulangan.

Media ½ MS dengan sitokinin secara tunggal tanpa auksin tidak mampu menginduksi terbentuknya PLBs baik pada eksplan daun maupun batang. Induksi PLBs secara langsung baik pada eksplan batang maupun daun *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* terjadi pada kombinasi auksin (NAA) dan sitokinin (BAP maupun TDZ), dan terbaik pada NAA 1.0 ppm dan BAP 0.5 ppm. Hal ini sejalan dengan penelitian Chen dan Chang (2006) yang menyatakan bahwa kombinasi NAA 0.01 mg/l dan TDZ 0.03 mg/l efektif menginduksi terbentuknya PLBs dari eksplan daun *Phalaenopsis amabilis*.

Eksplan batang mampu membentuk PLBs lebih awal dibanding daun seperti terlihat pada Gambar 3, dan PLBs hanya terbentuk pada medium ½ MS yang mengandung zat pengatur tumbuh kombinasi auksin dan sitokinin.



Gambar 3. Diagram pengaruh jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh pada eksplan daun dan batang *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* terhadap waktu awal terbentuk PLBs

Dari Gambar 3 terlihat saat awal pembentukan PLBs langsung dari eksplan batang terjadi mulai minggu ke-4 hingga 6 setelah kultur pada kombinasi NAA (0.5-1.0 ppm) dan BAP (0.5-1.5 ppm) atau TDZ 0.5 ppm. Sebaliknya pada eksplan daun, pembentukan PLBs baru terjadi mulai minggu ke-12 pada kombinasi NAA (1.0 dan 2.0 ppm) dan BAP (0.5 dan 1.5 ppm). Hasil penelitian Soe *et al.* (2014) menyebutkan pembentukan PLBs dari potongan PLBs terjadi pada angrek *Phalaenopsis hybrids* dan *Dendrobium hybrids* setelah 6 minggu masa kultur di medium MS yang mengandung NAA 0.1 µM dan BAP 10.0 µM. Menurut George and Sherrington (1984), jenis dan konsentrasi auksin dan sitokinin yang dibutuhkan untuk menginduksi terjadinya morfogenesis sangat beragam pada eksplan yang digunakan, baik antar genus, antar species, bahkan antar kultivar.

KESIMPULAN

Bagian batang yang mengandung meristem angrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* lebih mudah dan cepat membentuk PLBs

Kombinasi NAA 1.0 ppm dan BAP 0.5 ppm pada medium ½ MS terbaik menginduksi PLBs dari eksplan batang *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian Kompetitif LPPM Universitas Surabaya Gelombang 1 Tahun 2015 dan sebagian dari Hibah Bersaing Desentralisasi Kemenristekdikti Tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, L.R., J.T. Chen, and W.C. Chang, 2002. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 38:441-445.
- Chen, J.T. and W.C. Chang, 2001. Effect of auxin and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explant of *Oncidium 'Gower Ramsay'*. *Plant Growth Regul.*, 34:229-232.
- Chen, J.T. and W.C. Chang, 2004. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa Shimadzu. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 40:290-293.
- Chen, J.T. and W.C. Chang, 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biol Plant*, 50:169-173.
- Dwiyani, R., 2012. Mikropropagasi Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. Var. *suavis* forma Bali yang Membawa Gen *KNOTTED1-LIKE Arabidopsis thaliana (KNAT1)*. Disertasi Doktor. Program Studi Bioteknologi. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- George, E.F. and P.D. Sherrington, 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Handbook and directory of commercial laboratories. Eastern Press, England.
- Huan, L.V.T., T. Takamura, and M. Tanaka, 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*, 166:1443-1449.
- Huang, Y.W., Y.J. Tsai, T.C. Cheng, J.J. Chen, and F.C. Chen, 2014. Physical wounding and ethylene stimulated embryogenic stem cell proliferation and planlet regeneration in protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* orchids. *Genetics and Molecular Res.*, 13(4):9543-9557.
- Khoddamzadeh, A.A., U.R. Sinniah, M.A. Kadir, S.B. Kadzimin, M. Mahmood, S. Sreeramanan, 2011. In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. *Plant Growth Regul.*, 65:381-387.
- Lee, Y.I., S.T. Hsu, and E.C. Yeung, 2013. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. *American Journal of Botany*, 100(11):2121-2131.
- Mahendran, G. and V.N. Bai, 2012. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 135:40-44.
- Mei, T.A., M. Danial, M. Mahmood, and S. Subramaniam, 2012. Exquisite protocol of callus induction and protocorm-like bodies (PLBs) regeneration of *Dendrobium sonia*-28. *Australian Journal of Crop Sci.*, 6(5):793-800.
- Naing, A.H., J.D. Chung, and K.B. Lim, 2011. Plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in *Coelogyne cristata* orchid. *American Journal of Plant Sciences*, 2:262-267.

Romeida, A., D.W. Ganefianti, and Rustikawato, 2016. Embryogenic callus induction of pencil orchid (*Papilionanthe hookeriana* Rchb.f.) through in vitro culture. *Advance Science Engineering Information Technology* 6(2):196-200.

Roy, A.R., S. Sajeev, A. Pattanayak, and B.C. Deka, 2012. TDZ induced micropropagation in *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. and assessment of genetic variation in the regenerated plants. *Plant Growth Regul.*, 68:435-445.

Shiau, Y.J., S.M. Nalawade, C.N. Hsia, V. Mulabacal, and H. Tsay, 2005. In vitro propagation of Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall. Ex Lindl., from axenic nodal segments. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 41:666-670.

Soe, K.W., K.T. Myint, A.H. Naing, and C.K. Kim, 2014. Optimization of efficient protocorm-like bodies (PLB) formation of *Phalaenopsis* and *Dendrobium* hybrids. *Agriculture and Life Science*, 32(4):179-183.

Utami, E.S.W., I. Sumardi, Taryono, dan E. Semiarti, 2007. Pengaruh α -naphtaleneacetic acid (NAA) terhadap embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. *Biodiversitas*, 8(4):295-299.