

PENGARUH *Benzyl Adenin* DAN MEDIA DASAR PADA PERBANYAKAN EMBRIO ANGGREK SECARA *In Vitro*

Caecilia Puspita C.P.A, Sudiarso dan Tatik Wardiyati

Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya Malang

Abstract

In Indonesia, orchid is one of advanced crop. Crop multiplication of orchids usually produce with seed culture. Each embryo from seed culture can be multiplied by mericlone. The objective of this research is determine the type of media benzyl adenine concentration for growing and embryo's proliferation of *Phalaenopsis amabilis*. The research used complete randomized design factorial consist of 2 factors with 3 replications. First factor is type of media consist of 3 levels which are 1/2 Murashige and Skoog (1/2 MS), Vacin and Went (VW), New Phalaenopsis (NP). Second factor is *Benzyl adenine* concentration consist of 4 levels which are 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm and 1.5 ppm. Each bottle are inoculated by 5 embryos/PLB of white *Phalaenopsis amabilis*. Data had been analyzed with F test in 5% level. The highest number of embryos per explants are shown from combination between 1/2 MS media with 0.5ppm BA. The results showed that highest number of leaves and roots per explants are from NP media. Media without benzyl adenine produced the highest number of leaves and roots. The highest number of diameter is produced by VW media which combine with 1.5 ppm benzyl adenine.

Key words: embryo/PLB of Phalaenopsis amabilis, basic media, benzyl adenine, in vitro

Pendahuluan

Permintaan pasar akan bunga anggrek khususnya jenis *Phalaenopsis* didalam maupun luar negeri sangat banyak, sementara hanya sebagian kecil pihak yang mampu melakukan pengembangan dan pemanfaatan anggrek bulan. Pada tahun 2000 permintaan bunga anggrek mencapai 1,598 juta tanaman (Anonymous, 2011). Tetapi para pengusaha di Indonesia belum sanggup memenuhi permintaan tersebut. Tidak dipungkiri bahwa metode terbaik hingga saat ini dalam perbanyakan anggrek ialah dengan kultur jaringan, karena melalui kultur jaringan banyak hal yang menguntungkan dibandingkan dengan metode konvensional, misalnya dapat dihasilkan dalam jumlah besar dan bebas penyakit (Kalimuthu, *et al.*, 2006; Sivaprasad dan Soluchana, 2001). Katuuk

(1989) menuliskan, biji anggrek perlu dikulturkan karena bijinya sangat halus dan mengandung sangat sedikit cadangan makanan, sehingga dapat mudah terbang dan kekurangan makanan cadangan dalam biji tidak mampu untuk mempertahankan hidup. Hendaryono (2000) menambahkan, biji anggrek di alam dapat tumbuh (walaupun dalam persentase yang sangat kecil) karena adanya bahan – bahan organik yang disuplai oleh jamur *Micoriza* yang bersimbiosis dengan biji anggrek.

Keberhasilan kultur jaringan dipengaruhi berbagai macam faktor, antara lain media yang digunakan, jenis *explant*, lingkungan kerja dan jenis zat pengatur tumbuh yang diberikan (Wardiyati, 1998; Suarez dan Peter, 2008). Pemilihan jenis media dan pemberian zat

pengatur tumbuh yang kurang tepat dapat mengakibatkan kegagalan pertumbuhan pada *explant* yang ditanam. Gunawan (1988) menambahkan, bahwa zat pengatur tumbuh yang sangat penting dalam kultur jaringan ialah auksin dan sitokinin. Kedua zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan dan organ. Mineo (1990) menjelaskan, perbedaan konsentrasi auksin dan sitokinin yang diberikan serta hormon yang diproduksi oleh sel secara endogen akan menentukan arah perkembangan hasil kultur. Salah satu zat pengatur tumbuh dari golongan auksin ialah NAA (*Naphtalene Acetic Acid*), dan dari golongan sitokinin ialah BA (*Benzyl Adenine*). Hendaryono dan Wijayani (1994) menambahkan, bahwa NAA dan 2,4 D merupakan golongan auksin sintesis yang mempunyai sifat lebih stabil dibanding IAA, karena tidak mudah terurai oleh enzim – enzim yang dikeluarkan oleh sel atau pemanasan pada proses sterilisasi. Kombinasi unsur makro, mikro dan zat pengatur tumbuh tertentu sangat berpengaruh pada perbanyakan tanaman secara *in vitro* (Anggraeny, 2004; Tokuhara dan Masahiro, 2003).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan jenis media, konsentrasi zat pengatur tumbuh *Benzyl Adenine* (BA) dan kombinasinya yang terbaik untuk pertumbuhan dan perbanyakan embrio atau *protocorm like bodies* (PLB) anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis*).

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan di Nursery "Venus Orchid", Jl. Supiturang Dukuh Kraguman Desa Tegalweru, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juli 2010 sampai Februari 2011.

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, oven, aquadestilator, lemari es, autoklaf, pH meter, kompor gas, sendok plastik, penggaris, tabung volumetrik, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, botol kultur, pipet, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), scalpel, gunting, pinset, petridish, bunsen, kamera digital, lampu TL 40 watt, AC dan timer. Bahan yang digunakan adalah embrio/protocorm like bodies (PLB) *Phalaenopsis amabilis* warna putih, media $\frac{1}{2}$ MS, media VW dan media NP. Pada masing – masing media dasar ditambahkan zat pengatur tumbuh *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) 0.5 ppm.

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan 2 faktor dan diulang sebanyak 3 kali. Faktor pertama adalah media dengan 3 level yaitu $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS), Vacin and Went (VW) dan New Phalaenopsis (NP). Faktor kedua adalah konsentrasi *Benzyl Adenin* yang terdiri dari 4 level yaitu 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm dan 1.5 ppm. Masing – masing botol berisi 5 embrio/protocorm like bodies (PLB) *Phalaenopsis amabilis* warna putih.

Pengamatan dilakukan setelah inokulasi yang didasarkan pada pengamatan secara visual meliputi: persentase hidup *explant*; saat inisiasi embrio/PLB baru, tunas dan akar; jumlah *explant* yang membentuk embrio/PLB, tunas dan akar diamati pada 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 dan 56 hari setelah subkultur; jumlah embrio/PLB, tunas dan akar pada 56 hari setelah subkultur; diameter dan panjang akar pada 56 hari setelah subkultur.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji F pada taraf 5%. Apabila terdapat pengaruh yang nyata, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil pengamatan didapat bahwa jenis media dan konsentrasi *Benzyl Adenin* yang ditambahkan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap saat inisiasi embrio, tunas dan akar yang dihasilkan oleh *explant*. Jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada berbagai umur pengamatan dan panjang akar pada 56 hss juga tidak dipengaruhi oleh kedua faktor tersebut. Konsentrasi BA yang ditambahkan mempengaruhi jumlah *explant* yang membentuk embrio pada berbagai umur pengamatan dan jumlah *explant* yang menghasilkan tunas mulai 35 hss sampai 56 hss. Disamping itu, hasil observasi menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara media yang digunakan dengan konsentrasi BA yang ditambahkan dan memberikan pengaruh nyata pada jumlah embrio yang terbentuk dari setiap *explant* pada 56 hari setelah subkultur.

Tabel 1. Jumlah embrio per *explant* pada 56 hari setelah subkultur

Perlakuan (ppm)	Media ½ MS	Media VW	Media NP
BA 0	13.33 c	1.47 a	1.07 a
BA 0.5	20.40 d	6.07 ab	3.00 ab
BA 1	6.40 ab	5.00 ab	7.60 bc
BA 1.5	2.53 ab	3.60 ab	1.47 a
BNT 5%	6.12		

Keterangan: Bilangan yang didampingi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 1, dapat dijelaskan bahwa pada media ½ MS, konsentrasi BA mempengaruhi jumlah embrio yang terbentuk per *explant*. Rata-rata jumlah embrio terbanyak pada perlakuan media ½ MS adalah yang dikombinasikan dengan BA 0.5 ppm. Jika media ½ MS ditambah BA sebanyak 0.5 ppm, maka embrio yang dihasilkan bertambah 53.04% dari media tanpa BA.

Penambahan BA menjadi 1 ppm dan 1.5 ppm mengakibatkan jumlah embrio yang dihasilkan semakin berkurang. Pada media VW dan NP, penambahan BA tidak mempengaruhi jumlah embrio yang dihasilkan per *explant*. Hal ini dikarenakan media ½ MS mempunyai komposisi yang lebih kompleks dari pada media VW. Walaupun memiliki komposisi yang hampir mirip dengan media ½ MS, tetapi pada media NP terdapat tambahan arang aktif (*Charcoal*). Katuuk (1989) mengungkapkan, bahwa media mempunyai 2 fungsi utama yaitu untuk memasok nutrisi dan mengarahkan pertumbuhan melalui zat pengatur tumbuh. Sehingga yang berperan penting dalam perkembangan *explant* adalah zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media (Wattimena, 1988). Semakin banyak jumlah embrio yang dihasilkan maka jumlah calon planlet yang didapat juga semakin banyak. Hendaryono (2000) menyatakan, bahwa hormon auksin dan sitokinin yang digunakan menurut aturan *Mohr* (dengan perbandingan tertentu hingga merupakan perbandingan yang optimal). Dengan kombinasi zat pengatur tumbuh yang tepat, maka embrio akan terbentuk dengan optimal (Arditti dan Ernst, 1993).

Hasil pengamatan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara media dengan konsentrasi BA yang ditambahkan pada diameter akar yang dihasilkan.

Tabel 2. Diameter akar (mm) pada 56 hari setelah subkultur

Perlakuan (ppm)	Media ½ MS	Media VW	Media NP
BA 0	1.38 abc	0.90 a	2.16 cd
BA 0.5	1.31 abc	0.83 a	2.00 bcd
BA 1	1.00 a	1.00 a	1.08 a
BA 1.5	1.20 ab	2.33 d	2.00 bcd
BNT 5%	0.91		

Keterangan: Bilangan yang didampingi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%.

Dari Tabel 2 dapat dijelaskan bahwa diameter akar yang paling tebal adalah akar dari *explant* yang ditanam pada media VW dengan konsentrasi BA 1.5 ppm. Pada media dasar ½ MS, BA tidak berpengaruh pada diameter akar yang dihasilkan. Pada media NP, BA tidak berpengaruh bahkan memperkecil diameter akar ketika konsentrasi yang ditambahkan sebanyak 1 ppm.

Tidak ada interaksi antara jenis media dan konsentrasi BA yang ditambahkan, tetapi masing-masing faktor sangat berpengaruh terhadap jumlah daun dan jumlah akar per botol pada 56 hss (Tabel 3).

Tabel 3. Jumlah daun dan akar pada 56 hss

Perlakuan	jumlah daun	Jumlah akar
Jenis media		
½ MS	18.00 b	8.50 a
VW	10.25 a	6.25 a
NP	22.75 b	13.50 b
BNT 5%	6.13	3.55
Konsentrasi BA		
0 ppm	23.00 c	16.00 c
0.5 ppm	20.00 bc	10.00 b
1 ppm	8.33 a	4.67 a
1.5 ppm	16.67 b	7.00 ab
BNT 5%	6.13	3.55

Keterangan: Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 3 dapat dijelaskan bahwa jumlah daun tertinggi didapat dari media NP dan media ½ MS. Media tanpa BA menghasilkan jumlah daun tertinggi dan tidak berbeda dengan media yang ditambah BA sebanyak 0.5 ppm. Jumlah akar tertinggi didapat dari media NP. Hal ini dikarenakan adanya komposisi tambahan pada media NP berupa arang aktif/*charcoal* dan ekstrak ragi/*yeast extract*.

Salah satu peran arang aktif adalah merangsang perakaran dengan mengurangi tingkat cahaya yang sampai ke bagian *explant* yang terdapat dalam media, sedangkan ekstrak ragi mengandung asam pepino, peptida dan vitamin untuk pertumbuhan kultur (Gunawan, 1988).

Media tanpa penambahan BA juga menghasilkan jumlah akar yang paling banyak. Hal ini dikarenakan tanpa penambahan BA, maka yang berperan dalam pertumbuhan kultur adalah zat pengatur tumbuh NAA (*Naphtalene Acetic Acid*) yang ditambahkan dalam media kultur (Utami, *et. al.*, 2007). Arditti (2008) menuliskan, bahwa NAA berperan dalam pengakaran baik pada stek, kalus maupun PLB.

Kesimpulan

1. Terjadi interaksi antara media dasar dengan konsentrasi BA yang ditambahkan terhadap jumlah embrio yang dihasilkan tiap *explant* dan diameter akar yang terbentuk. Jumlah embrio terbanyak dihasilkan dari kombinasi media ½MS dengan konsentrasi *Benzyl Adenin* 0.5 ppm. Diameter akar tertinggi dihasilkan dari kombinasi media VW dengan *Benzyl Adenin* 1.5 ppm.
2. Jenis media yang digunakan mempengaruhi jumlah akar dan daun yang terbentuk. Media yang menghasilkan jumlah akar dan daun terbanyak adalah media New Phalaenopsis (NP).
3. Semakin tinggi konsentrasi BA yang ditambahkan, maka jumlah embrio yang dihasilkan semakin berkurang. BA optimum adalah 0.5 ppm. Peningkatan BA menjadi 1 ppm menurunkan jumlah embrio sebanyak 68.63%.

4. Media yang sesuai untuk pembesaran planlet adalah media New Phalaenopsis (NP).

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Sudiarso, MS dan Prof. Dr. Ir. Tatik Wardiyati, MS atas bimbingan dan arahan yang telah diberikan. Serta mengucapkan terima kasih tak terhingga atas bimbingan dan fasilitas yang telah diberikan oleh Prof. Dr. Ir. Titis Adisarwanto selaku pemilik Nursery Venus Orchids, tempat penulis melaksanakan penelitian.

Daftar Pustaka

- Anggraeny, N. 2004. Mikrostek Anggrek Langka *Grammatophyllum Scriptum* Var. Papanum Secara *In Vitro* Pada Media VW Dengan Penambahan Madu Dan Ekstrak Tauge Available At http://digilib.umm.ac.id/go.php?id=jipt_ummpp-gdl-s1-2004-novianggra-85 (verified at 10 November 2009)
- Anonymous. 2011. The Physiology of Tropical Orchids in Relation to The Industry 2nd edition. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. p. 1-10 Available at <http://www.worldscibooks.com/lifesci/5505.html> (verified at 1 April 2011)
- Arditti, J. and R. Ernst. 1993. Micropropagation of orchids. John Wiley and Sons Inc. New York p. 36-57 dan p.467-521
- Arditti, J. 2008. Micropropagation of orchids 2nd edition volume 1. Blackwell Publishing Ltd. USA p.46-49 dan p.63-103
- Gunawan, L.V. 1988. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Univesitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor. pp. 1 dan p. 67-107.
- Hendaryono, D.P.S. 2000. Pembibitan Anggrek Dalam Botol. Kanisius. Yogyakarta. p.22-55
- Hendaryono, D.P.S. dan A. Wijayani. 1994. Teknik Kultur Jaringan Pengenalan Dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif Modern. Kanisius. Yogyakarta. pp.139
- Kalimuthu K., R. Senthilkumar dan S. Vijayakumar. 2006. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp.(Dancing Dolls) African Journal of Biotechnology Vol. 6 (10), p 1171-1174. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB> verified at 20 Juli 2010
- Katuuk, J.R.P. 1989. Teknik Kultur Jaringan Dalam Mikropropagasi Tanaman. Depdikbud. Jakarta. pp. 62, 188
- Mineo, L. 1990. Plant Tissue Culture Techniques *Dalam* Tested Studies For Laboratory Teaching. Volume 11. Proceedings of the Eleventh Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). p.151-174
- Sivaprasad, P and K.K.Soluchana. 2001. Integration of arbuscular mycorrhizal technology with micro-propagation. Government of Kerala Department of Agriculture. Farm Information Bureau Thiruvananthapuram. p.5-10
- Suarez, M. F. and Peter V. Bozhkov. 2008. Plant Embryogenesis. Humana Press. USA. p 51-101
- Tokuhara, K. and Masahiro Mii. 2003. Highly Efficient Somatic Embryogenesis From Cell Suspension Cultures Of Phalaenopsis Orchids By Adjusting Carbohydrate Sources. In Vitro Cell Biology – Plant Volume 39 November – Desember 2003 p.635-639
- Utami, E. S. W., Issirep S., Taryono dan Endang S. 2007. Pengaruh α -Naphtalene Acetic Acid (NAA) Terhadap Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Biodiversitas Volume 8 No 4. p 295 – 299

Wardiyati, T. 1998. Kultur Jaringan Tanaman Hortikultura. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang. p. 95 – 105

Wattimena, G. A. 1988. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor Bekerja Sama Dengan Lembaga Sumberdaya Informasi-IPB. Bogor. p. 140-145