

Pertumbuhan Tunas dan Struktur Anatomi *Protocorm Like Body* Anggrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl. dengan Pemberian Kinetin dan NAA

The shoot growth and anatomical structure of Protocorm Like Body of Grammatophyllum scriptum (Lindl.) Bl. after kinetin and NAA application

YUANITA WIJAYANI, SOLICHATUN[♥], WIDYA MUDYANTINI

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126.

Diterima: 13 Maret 2006. Disetujui: 2 Mei 2006.

ABSTRACT

PLB of *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl. was used as explants. The aim of this research was to know the influence of kinetin and *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) application on PLB differentiation and shoot growth by *in vitro* culture. PLB were placed on medium containing basal salt *Knudson C* (KC). Research device the used is *Completely Random Design* (CRD) with six treatments, every treatment with five restating. Kinetin were used in combination with NAA ((K₀N₀: kinetin 0 mg/l and NAA 0 mg/l (control), K₁N₀: kinetin 1 mg/l and NAA 0 mg/l, K₂N₁: kinetin 2 mg/l and NAA 1 mg/l, K₃N₂: kinetin 3 mg/l and NAA 2 mg/l, K₄N₃: kinetin 4 mg/l and 3 mg/l, K₅N₄: kinetin 5 mg/l and NAA 4 mg/l) to shoot induction. The data of shoot induction was examined at week 2, 4, 6, 8, and 10. The parameter examined is amount of shoot formation, anatomy structure of PLB, shoot height, browning of shoot, and root formation. *Analysis of Variance* (ANOVA) was done to know the influence of kinetin and *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) application on shoot formation and when by *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) on 5% significant rate to find out the real distinction between the treatments. The result show that the used of kinetin 1 mg/l and NAA 0 mg/l was stimulating differentiation of PLB *G. scriptum* produced shoot apical and primordial leave at third week. The used of kinetin 5 mg/l and NAA 4 mg/l produced the most shoots, the highest shoot height, and root formation.

Keywords: *Grammatophyllum scriptum*, PLB, kinetin, NAA, shoot

[♥] Alamat korespondensi:
Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-663375.
e-mail: biology@mipa.uns.ac.id

PENDAHULUAN

Anggrek dimasukkan dalam famili Orchidaceae. Famili Orchidaceae mempunyai kurang lebih 3000 jenis (Suryowinoto, 1984). Salah satu jenis anggrek yang saat ini banyak dikembangkan adalah anggrek *Grammatophyllum*. Contoh jenis *Grammatophyllum* adalah *Grammatophyllum scriptum* atau sering disebut anggrek macan. Jenis ini merupakan kebanggaan

bagi masyarakat Papua yang juga merupakan asal dari anggrek ini. Jenis anggrek ini sekarang banyak dikembangkan di Kebun Raya Bogor karena keberadaan di habitat aslinya mulai berkurang (Farid dan Tjaturadi, 2005). Spesies *Grammatophyllum* merupakan salah satu genus anggrek yang dikembangkan sebagai tanaman hias. Keunggulan *G. scriptum* adalah habitusnya yang tegap dan kuat; jumlah bunga yang sangat banyak yaitu 25-50, dan waktu berbunga yang

cukup lama yaitu mulai bulan Januari sampai Agustus (Madulid, 2002; Brink dan Backer, 1968).

Perbanyakan merupakan bagian dari aspek budidaya anggrek. Secara konvensional, metode perbanyakan vegetatif pada anggrek meliputi stek batang, pembelahan rumpun, penggunaan *pseudobulb*, dan *keiki* (anakan yang keluar dari ruas tanaman yang berada agak jauh dari pangkal tanaman) atau *aerial stem* (Gunawan, 2004). Perbanyakan anggrek secara generatif dapat pula dilakukan secara kultur *in vitro*; karena biji anggrek tidak mempunyai endosperm sehingga sulit dikedambahkan secara alami tanpa bantuan mikoriza yang bersimbiosis dengan biji tersebut (Widiastoety, 2004).

Metode kultur *in vitro* dapat digunakan untuk perbanyakan anggrek dalam waktu yang relatif singkat. Melalui metode kultur *in vitro* dapat diperoleh ratusan anggrek serta yang memiliki sifat sama dengan induknya dan pertumbuhannya relatif seragam (Sandra, 2003).

Zat pengatur tumbuh umumnya selalu diberikan dalam media kultur *in vitro* untuk mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam perbanyakan tanaman umumnya dari golongan auksin dan sitokinin (Husni, 1997). Kombinasi auksin dan sitokinin dapat memperbaiki efisiensi regenerasi eksplan, tergantung konsentrasi yang ditambahkan. Kebutuhan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin diperlukan untuk induksi tunas (Roy *et al.*, 1993 dalam Harni, 2003). Induksi tunas terjadi melalui peristiwa diferensiasi sel yaitu sel yang sudah mencapai volume akhirnya menjadi terspesialisasi dengan cara tertentu (Salisbury dan Ross, 1995b).

Protocorm like body (PLB) merupakan suatu struktur berupa bulatan-bulatan yang dibentuk oleh jaringan eksplan dan atau kalus *in vitro* (Morel, 1960 dalam Arditti dan Ernst, 1993). Dorusposari (2003) dalam penelitiannya menggunakan eksplan *protocorm like body* (PLB) *Phalaenopsis "Star of Rio"* dalam media Knudson C (KC) secara *in vitro* menunjukkan bahwa konsentrasi fitohormon yang menghasilkan pertumbuhan tunas terbaik adalah perlakuan 1 μM dan 3 μM kinetin yang dikombinasikan dengan 0,1 μM NAA (*Naphtalene Asetic Acid*). Datta *et al.* (2004) melaporkan bahwa media KC dengan penambahan BAP (*6-Benzyl Amino Purine*) 3 mg/l dan NAA 2 mg/l menghasilkan pembentukan PLB yang optimal dari eksplan berupa tunas samping tangkai bunga *Dendrobium moschatum*. PLB tersebut akhirnya tumbuh

membentuk planlet setelah 10-12 minggu masa inkubasi. Berdasarkan beberapa penelitian pendahuluan tersebut maka penelitian ini diarahkan dalam usaha untuk mengetahui pengaruh zat pengatur tumbuh kinetin dan NAA dalam media KC terhadap pertumbuhan tunas dan diferensiasi PLB anggrek *G. scriptum* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *protocorm like body* (PLB) *G. Scriptum*, akuades, deterjen cair, alkohol 70 %, spiritus, media Knudson C (KC), Kinetin, NAA, larutan FAA (alkohol 70 %: 90 bagian, asam asetat glacial: 5 bagian, formalin: 5 bagian), alkohol bertingkat (20%, 40%, 60%, 70%, 80%, 95%, 100%), xilol, parafin, gliserin albumin, safranin 1%, *fast green*, aquades, dan *canada balsam*.

Cara Kerja

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 6 perlakuan masing-masing perlakuan dengan 5 ulangan. Perlakuan-perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

K₀N₀: kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l

K₁N₀: kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l

K₂N₁: kinetin 2 mg/l + NAA 1 mg/l

K₃N₂: kinetin 3 mg/l + NAA 2 mg/l

K₄N₃: kinetin 4 mg/l + NAA 3 mg/l

K₅N₄: kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l

Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dibagi dalam beberapa tahap meliputi tahap persiapan, tahap penanaman eksplan pada media perlakuan, tahap pembuatan preparat sediaan mikroskopis, dan tahap pengamatan atau pengukuran.

Analisis Data

Data pengamatan berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif yaitu jumlah tunas yang terbentuk pada minggu ke-2, 4, 6, 8, 10 dan tinggi tunas pada minggu ke-10. Data kuantitatif dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh pemberian kinetin dan NAA terhadap jumlah dan tinggi tunas dan bila ada perbedaan nyata dilanjutkan DMRT taraf 5%. Data kualitatif berupa struktur anatomi PLB, pencoklatan tunas, dan pembentukan akar

disajikan secara deskriptif yang diamati pada minggu ke-10.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah Tunas yang Terbentuk

Pertumbuhan tunas dari *protocorm like body* (PLB) tanaman anggrek, pada umumnya dibagi menjadi 5 kategori perubahan morfologi, yaitu (1) *yellowish clb* adalah PLB berwarna putih kekuningan, transparan, kompak, dan keras; (2) *greenish clb* adalah PLB berwarna kehijauan; (3) *shootlike bodies* adalah PLB yang telah membentuk primordia daun tunggal dan berwarna hijau muda; (4) tunas adalah PLB yang telah membentuk satu atau dua calon daun dengan lamina yang jelas, berwarna hijau tua, kadang-kadang dengan nodul calon akar pada bagian basal; dan (5) planlet adalah bentuk pertumbuhan lebih lanjut dari tunas yang telah membentuk daun dan akar yang jelas (Dorusposari, 2003).

Pada penelitian ini morfologi PLB yang diamati pada kategori tunas. Berdasarkan hasil analisis varian dan DMRT pada taraf 5% dapat diketahui bahwa perlakuan yang diberikan berpengaruh terhadap jumlah tunas yang terbentuk. Hasil pengamatan tentang jumlah tunas yang terbentuk disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh pemberian kinetin dan NAA terhadap jumlah tunas *G. scriptum* yang terbentuk

Perlakuan	Jumlah tunas pada minggu ke-				
	2	4	6	8	10
<i>kinetin 0 mg/l + NAA 0 0.0^a</i>	3.2 ^b	4.8 ^b	5.6 ^c	7.4 ^c	
<i>kinetin 1 mg/l + NAA 0 0.0^a</i>	4.2 ^b	4.8 ^b	6.4 ^c	6.4 ^c	
<i>kinetin 2 mg/l + NAA 1 0.0^a</i>	1.6 ^a	2.8 ^a	3.8 ^b	4.4 ^b	
<i>kinetin 3 mg/l + NAA 2 0.0^a</i>	1.2 ^a	2.6 ^a	3.6 ^{a,b}	4.2 ^b	
<i>kinetin 4 mg/l + NAA 3 0.0^a</i>	1.0 ^a	1.6 ^a	2.2 ^a	2.2 ^a	
<i>kinetin 5 mg/l + NAA 4 0.0^a</i>	1.8 ^a	5.0 ^a	7.0 ^c	8.8 ^d	

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu kolom tidak berbeda nyata.

Pada minggu ke-2 tunas belum terlihat muncul pada semua perlakuan. Tunas baru dapat diamati kemunculannya mulai minggu ke-4. Pada minggu ke-10, pemberian kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l menghasilkan jumlah tunas

terbanyak. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi kinetin dan NAA pada konsentrasi tersebut aktif berperan dalam penggandaan tunas sampai jangka waktu akhir pengamatan, meskipun jumlah tunas yang terbentuk pada awal pengamatan masih rendah. Davies (1995) menyatakan bahwa pemberian NAA pada media kultur menyebabkan pembelahan sel pada permulaan kultur berjalan lambat, akan tetapi populasi sel tetap dijaga dan kemudian jumlahnya ditingkatkan. Perbedaan jumlah tunas yang terbentuk pada tiap perlakuan dipengaruhi oleh kombinasi kinetin dan NAA pada konsentrasi yang berbeda. Hal ini sesuai dengan pendapat Wattimena *et al.*, (1992) bahwa kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi zat pengatur tumbuh tertentu dalam konsentrasi yang tertentu. Satu molekul zat pengatur tumbuh saja dapat mempengaruhi cara kerja enzim, maka beberapa molekul zat pengatur tumbuh dapat menyebabkan perubahan-perubahan fisiologis tanaman, karena enzim memegang peranan penting dalam setiap proses metabolisme (Wattimena, 1991). Winarsih dan Priyono (2000) menyatakan bahwa kombinasi perlakuan sitokinin dan auksin pada konsentrasi yang tepat dapat meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa jumlah tunas *Asparagus officinalis* paling banyak diperoleh dari perlakuan kombinasi kinetin 4 mg/l dan NAA 3 mg/l dari eksplan mata tunas.

Anatomi PLB

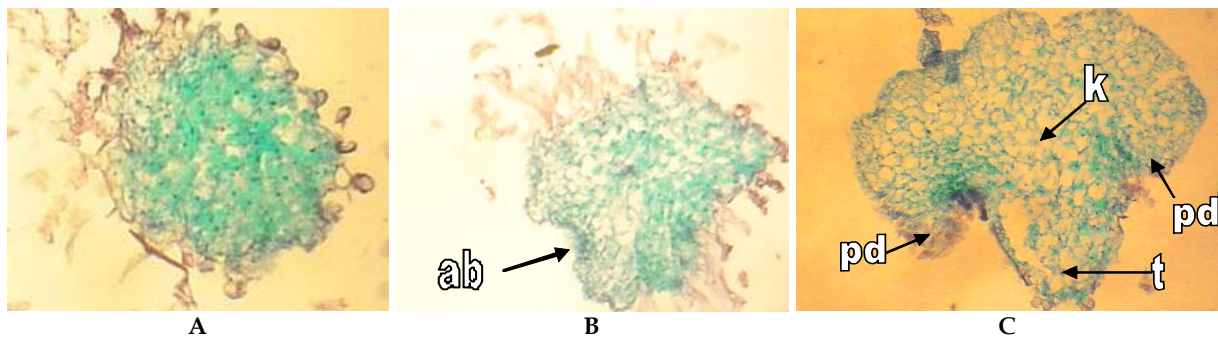
Pengamatan struktur anatomi PLB diperlukan untuk mengetahui perkembangan diferensiasi sel-sel PLB. Pembuatan irisan PLB dilakukan dua kali, yaitu pertama irisan PLB sebelum ditanam pada media perlakuan dan kedua dari PLB hasil perlakuan pemberian kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l (kontrol) dan pemberian kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l umur tiga minggu.

Anatomi PLB *G. scriptum* sebelum ditanam pada media perlakuan sebagian masih berupa sekumpulan sel yang belum menunjukkan arah diferensiasi (Gambar 2A). Pada Gambar 2B, diferensiasi PLB sudah menunjukkan perbedaan ukuran sel pada bagian tepi dengan bagian tengah. Sel daerah tepi terlihat lebih kecil dari sel daerah tengah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lyndon (1998) bahwa sel bagian tepi dan sel bagian tengah pada sel apikal berbeda dalam hal ukuran dan frekuensi pembelahan sel. Sel pada bagian tengah memiliki sel yang ukurannya lebih

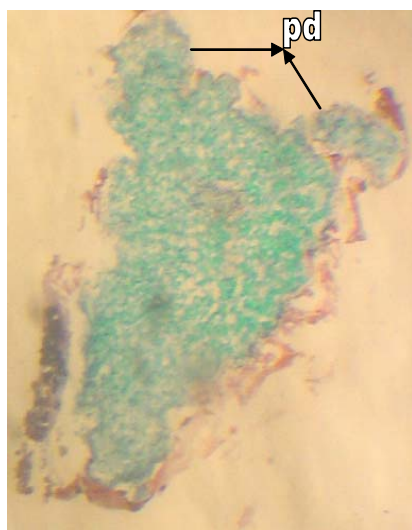
besar dari sel bagian tepi dan frekuensi pembelahan sel lebih rendah. Sel pada bagian tepi berukuran lebih kecil dan mengalami pembelahan lebih sering. Sel bagian tepi tersebut diduga sebagai calon meristem ujung batang. Lyndon (1998) menjelaskan bahwa fungsi utama dari meristem ujung batang adalah sebagai sumber sel yang mengandung materi seluler yang berfungsi untuk pertumbuhan lebih lanjut membentuk tunas. Pada Gambar 2C, diferensiasi PLB telah membentuk apeks batang, sehingga sudah terdapat bagian tunika, korpus, dan inisiasi sepasang primordia daun.

Anatomi PLB *G. scriptum* umur 3 minggu hasil perlakuan kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l

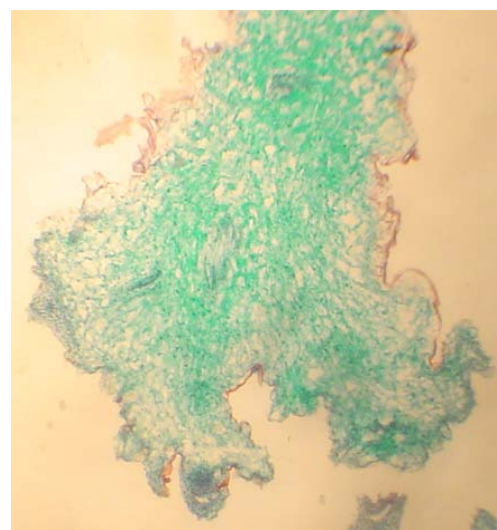
(kontrol) dan kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l, menunjukkan perbedaan pada jumlah apeks batang dan jumlah primordia daun. Pada pemberian kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l (kontrol), diferensiasi PLB hanya membentuk 2 apeks batang dan satu pasang primordia daun (Gambar 3-4). Pada pemberian kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l, menunjukkan diferensiasi PLB membentuk 4 apeks batang dan terdapat dua pasang primordia daun (Gambar 5-6). Perbedaan jumlah apeks batang dan primordia daun yang terbentuk disebabkan oleh peran sitokinin dalam proses pembelahan sel, yaitu:



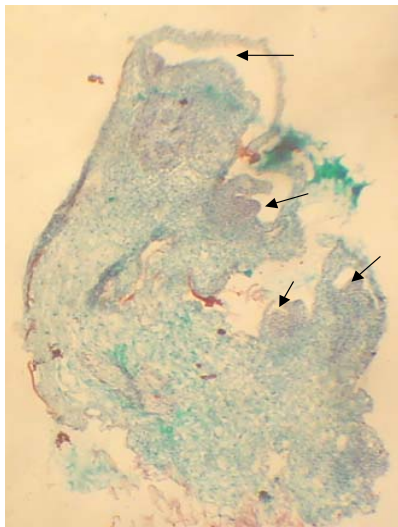
Gambar 2. Anatomi PLB *G. scriptum* sebelum ditanam pada media perlakuan. Pada A menunjukkan sekumpulan sel yang belum menunjukkan arah diferensiasi. Pada B, PLB sudah mengalami diferensiasi membentuk apeks batang (ab). Pada C, PLB berdiferensiasi membentuk inisiasi primordia daun (pd), tunika (t) dan korpus (k). (40X).



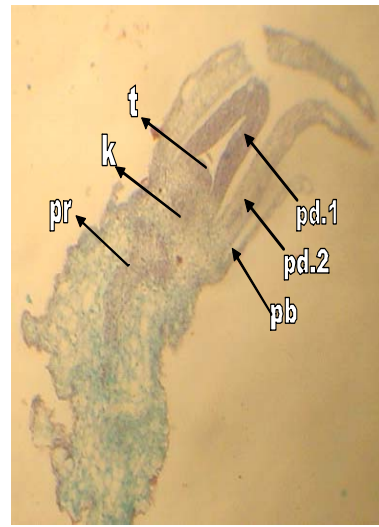
Gambar 3. Irisan membujur PLB *G. scriptum* hasil perlakuan kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l (kontrol) umur 3 minggu setelah tanam. Diferensiasi PLB membentuk primordia daun (pd). (40X).



Gambar 4. Irisan membujur PLB *G. scriptum* hasil perlakuan kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l (kontrol) umur 3 minggu setelah tanam. PLB berdiferensiasi membentuk dua apeks batang (ab). (40X).



Gambar 5. Irisan membujur PLB hasil perlakuan kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l umur 3 minggu setelah tanam. Tanda panah menunjukkan diferensiasi PLB membentuk empat apeks batang. (40X).



Gambar 6. Irisan membujur PLB *G. scriptum* hasil perlakuan kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l umur 3 minggu setelah tanam. Tanda panah menunjukkan diferensiasi PLB membentuk bagian-bagian tunas: pd.1: primordia daun pertama, pd.2: primordia daun ke-2, pb: primordia batang, t: tunika, k: korpul, dan pr: prokambium (40X).

(1) Sitokinin dalam siklus sel memiliki peranan penting yaitu pemacuan sitokinesis. Sitokinin mendorong pembelahan sel dengan cara meningkatkan peralihan G₂ ke mitosis dan dalam hal ini sitokinin juga meningkatkan laju sintesis protein. Beberapa protein itu adalah protein pembangun atau enzim yang dibutuhkan untuk mitosis (Fosket, 1977 dan Fosket dkk., 1981 dalam Salisbury dan Ross, 1995b). Sitokinin juga memperpendek fase S yaitu dengan cara mengaktifkan DNA, sehingga ukuran salinan DNA menjadi dua kali lebih besar kemudian laju sintesis DNA digandakan (Houssa *et al.*, 1994 dalam Lyndon, 1998).

(2) Sitokinin dapat mempengaruhi ekspresi gen KNOX (*Knotted Like Homeobox*). Gen KNOX mengkode suatu protein yang berfungsi memacu pertumbuhan dan pemeliharaan meristem ujung batang (MUB) supaya sel-selnya selalu bersifat meristematik (Harni, 2003). Gen KNOX tanaman *Arabidopsis* bekerja pada bagian tepi meristem ujung batang organ vegetatif dan menunjukkan pemeliharaan aktivitas meristematik. Ekspresi gen KNOX yang terlalu besar dapat menyebabkan aktivitas meristematik terhenti kemudian menginisiasi primordia daun (Lincoln *et al.*, 1994 dalam Lyndon, 1998). Pemberian kinetin 1 mg/l berpengaruh meningkatkan ekspresi gen KNOX sehingga menginduksi dua

pasang primordia daun. Pada pemberian kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l (kontrol), hanya sepasang primordia daun yang baru diinisiasi. Hal ini disebabkan karena sumber sitokinin yang mempengaruhi ekspresi gen KNOX diduga hanya berasal dari air kelapa yang ditambahkan pada media.

Pertumbuhan Tunas pada Akhir Pengamatan

Tinggi Tunas pada Akhir Pengamatan

Hasil analisis varian dan DMRT pada taraf 5% menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi kinetin dan NAA berpengaruh terhadap tinggi tunas. Data tinggi tunas pada akhir pengamatan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Tinggi tunas (cm) *G. scriptum* pada variasi kombinasi kinetin dan NAA.

<i>Perlakuan</i>	<i>Tinggi Tunas (cm)</i>
Kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l	12.16 ^b
Kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l	12.19 ^b
Kinetin 2 mg/l + NAA 1 mg/l	5.61 ^a
Kinetin 3 mg/l + NAA 2 mg/l	6.19 ^a
Kinetin 4 mg/l + NAA 3 mg/l	4.45 ^a
Kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l	12.20 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu kolom tidak berbeda nyata pada DMRT taraf 5%.

Pemberian kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l (kontrol), kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l, dan kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l menghasilkan tinggi tunas yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Pemberian kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l menghasilkan tunas yang tampak lebih tebal. Salisbury dan Ross (1995b) menjelaskan jika irisan batang atau akar ditumbuhkan secara *in vitro* dengan pemberian sitokinin, maka irisan jaringan batang biasanya menjadi lebih tebal karena terjadi pembentangan sel ke arah samping. Wattimena (1991) menyatakan bahwa sitokinin berpengaruh pada proses pembelahan sel. Setelah pembelahan sel terjadi, dengan adanya nutrisi yang diperlukan akan terjadi proses pertumbuhan lainnya yaitu pembentangan sel dan penambahan plasma. Menurut Thomas dkk, (1981) dalam Salisbury dan Ross (1995b), pemberian sitokinin meningkatkan plastisitas dinding sel sehingga dinding sel mengendur kemudian terjadi pembentangan lebih cepat secara tak terbalikkan dalam tekanan turgor yang biasa. Hal ini didukung pula oleh NAA yang mengakibatkan pengenduran dinding sel. NAA mempertahankan potensial air sel agar selalu lebih negatif daripada potensial air larutan di sekitarnya, sehingga potensial tekanan yang diperlukan untuk mendesak pembentangan sel tersebut tidak sebesar pada sel yang tidak diberi NAA (Salisbury dan Ross, 1995b).

Sitokinin selain berperan pada proses pembelahan sel, juga berperan mendorong pemanjangan sel. Kasus ini dijumpai pada semangka katai, sitokinin eksogen yang diberikan pada ujung tajuk atau pada akar terbukti memacu pemanjangan hipokotil, terutama karena laju pemanjangan sel meningkat (Salisbury dan Ross, 1995b). Efek menghambat maupun efek mendorong proses pembelahan sel oleh sitokinin tergantung dari adanya fitohormon lainnya, terutama auksin (Wattimena, 1991). Auksin mempengaruhi pemanjangan suatu sel dengan cara mengaktifkan beberapa enzim yang dapat menurunkan pH pada dinding sel. Enzim tersebut bekerja memutuskan ikatan polisakarida dinding sel, sehingga terjadi pengenduran dinding sel dan pertumbuhan yang cepat. Respons auksin terutama pada bagian epidermis. Auksin mengaktifkan gen di epidermis dengan cara mengembangkan dinding epidermis kemudian sel epidermis memanjang lebih cepat, dan pemanjangan ini menyebabkan sel subepidermis yang menempel padanya juga memanjang (Salisbury dan Ross, 1995b).

Pencoklatan Tunas

Pemberian NAA pada konsentrasi semakin tinggi dalam perlakuan menyebabkan peningkatan pencoklatan tunas (Tabel 3). Pada perlakuan kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l tidak dijumpai pencoklatan tunas, sedangkan pada perlakuan kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l masih dijumpai pencoklatan tunas. Salisbury dan Ross (1995b) menjelaskan bahwa berbagai senyawa fenolik dapat tercampur dengan auksin pada saat auksin diekstraksi. Santoso dan Nursandi (2002) menambahkan bahwa pencoklatan dapat terjadi pada lingkungan eksplan yang mengandung bahan-bahan kimia pendorong pembentuk senyawa fenol, misalnya auksin. Auksin bekerja dengan cara mengaktifkan enzim fenol oksidase.

Tabel 3. Pencoklatan tunas *G. scriptum* pada variasi kombinasi kinetin dan NAA

Perlakuan	Pencoklatan tunas
Kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l	+
Kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l	-
Kinetin 2 mg/l + NAA 1 mg/l	+
Kinetin 3 mg/l + NAA 2 mg/l	+++
Kinetin 4 mg/l + NAA 3 mg/l	+++
Kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l	+++++

Keterangan: (-): tidak ada, (+): pada 1 ulangan, (+++): pada 3 ulangan, (+++++): pada 5 ulangan

Pencoklatan mulai terjadi pada minggu ke-8. Pada saat itu pula mulai terjadi pecahnya media. Pecahnya media diduga disebabkan kandungan air dan nutrisi pada media telah berkurang karena diserap oleh sel-sel eksplan untuk pertumbuhan. Salisbury dan Ross (1995a) mengungkapkan bahwa sukrosa merupakan sumber utama substrat untuk glikolisis, dan tidak ada enzim yang mengkatalisis polisakarida tersebut yang dikendalikan secara alosterik oleh substrat atau produk respirasi. Pada umumnya jika heksosa melimpah maka glikolisis dan tahap respirasi lainnya berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan bila heksosa sedikit.

Pencoklatan diduga berhubungan dengan penurunan sukrosa pada media sehingga menyebabkan pemberian NAA mengaktifkan kerja enzim fenol oksidase. Enzim fenol oksidase bekerja mengoksidasi *o*-dihydroxyfenol dengan menggunakan O₂ sebagai penerima elektron. Reaksi tersebut menghasilkan *o*-quinon yang menyebabkan warna coklat pada jaringan tanaman (Noogle dan Fritz, 1976).

Senyawa-senyawa fenol dapat menghambat pembelahan sel, pembesaran sel dan pertumbuhan (Wattimena, 1991). Tomita dan Tomita (1998) dalam Harni (2003) menyatakan bahwa efek pencoklatan dapat diatasi dengan menggunakan *agar gellan gum*. *Gellan gum* dapat memacu perkembangan *protocorm* dan penyerapan substansi coklat lebih cepat. Sedangkan Sandra (2003) menambahkan bahwa eksplan yang mengalami pencoklatan perlu disubkultur ke media baru supaya tidak keracunan.

Pembentukan Akar

Berdasarkan hasil pengamatan diketahui adanya pengaruh pemberian NAA terhadap pembentukan akar. Pemberian kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l pada perlakuan menunjukkan tidak adanya pembentukan akar. Pembentukan akar terjadi pada perlakuan kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l, kinetin 2 mg/l + NAA 1 mg/l, kinetin 3 mg/l + NAA 2 mg/l, kinetin 4 mg/l + NAA 3 mg/l, dan kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l. Hasil seperti ini juga dilaporkan oleh Ahmad *et al.*, (2002) bahwa media tanpa penambahan NAA tidak dapat menginduksi pembentukan akar pada tunas *Raufolesia serpentina*. Pembentukan akar tidak terjadi pada perlakuan kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l diduga karena pemberian kinetin pada perlakuan tersebut mengakibatkan perbandingan kandungan sitokinin dengan auksin endogen menjadi sangat tinggi, sehingga peran auksin dalam menginduksi akar menjadi terhambat.

Winarsih dan Priyono (2000) menyatakan bahwa interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel-sel secara endogen menentukan perkembangan suatu kultur. Auksin yang ditambahkan pada media bersama-sama dengan auksin endogen yang diproduksi oleh apeks berperan menginduksi pembelahan sel untuk membentuk akar.

Tabel 4. Pembentukan akar *G. scriptum* pada variasi kombinasi kinetin dan NAA.

Perlakuan	Pembentukan akar
Kinetin 0 mg/l + NAA 0 mg/l	+++
Kinetin 1 mg/l + NAA 0 mg/l	-
Kinetin 2 mg/l + NAA 1 mg/l	++++
Kinetin 3 mg/l + NAA 2 mg/l	++++
Kinetin 4 mg/l + NAA 3 mg/l	+++
Kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l	++++

Keterangan: (-): tidak terbentuk akar, (+++): akar terbentuk pada 3 ulangan, (++++): akar terbentuk pada 4 ulangan

Pada penelitian ini, pembentukan akar terjadi pada minggu ke-6. Pembentukan akar diduga berasal dari diferensiasi sel-sel PLB yang masih bersifat meristematik. Pemberian NAA menyebabkan sel-sel PLB berdiferensiasi ke arah pembentukan akar. Sel-sel pembentuk akar berkembang secara akropetal (Fahn, 1989). Sel-sel pembentuk akar berturut-turut berkembang dari prokambium, kambium, perisikel, dan akhirnya membentuk akar.

Pemberian kinetin dan NAA diarahkan untuk memacu pembelahan, pembesaran, dan pemanjangan sel sehingga dapat mendorong diferensiasi PLB. Diferensiasi PLB menyebabkan perubahan anatomi ke arah pembentukan MUB (meristem ujung batang). Pembentukan MUB merupakan awal pembentukan tunas dalam proses embriogenesis. Pada penelitian ini, pemberian kinetin dan NAA pada konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap pertumbuhan tunas. Pemberian kinetin 1 mg/l dan NAA 0 mg/l mendorong diferensiasi PLB membentuk apeks batang dan primordia daun pada minggu ke-3. Pada pemberian kinetin 5 mg/l dan NAA 4 mg/l menghasilkan jumlah tunas terbanyak, tinggi tunas tertinggi, dan terjadi pembentukan akar.

KESIMPULAN

Pemberian kinetin 5 mg/l + NAA 4 mg/l menghasilkan pertumbuhan tunas *G. scriptum* terbaik, yaitu jumlah tunas terbanyak, tinggi tunas tertinggi, dan terjadi pembentukan akar. Pemberian kinetin 1mg/l + NAA 0 mg/l mendorong diferensiasi PLB *G. scriptum* membentuk apeks batang dan primordia daun pada minggu ke-3.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, S., Amin, M.N., Azad, M.A.K., dan Mosaddik, M.A. 2002 Micropropagation and Plant Regeneration of *Raufolesia serpentina* by Tissue Culture Technique. *Journal of Plant Biotechnology* 5(1): 75-79. Asian Network for Scientific Information. Pakistan.
- Arditti, J and Ernst, R. 1993. *Micropropagation of Orchids*. John Wiley and Sons. New York.
- Brink, B.V.D and Backer, C.A. 1968. *Flora of Java Spermatophytes Only*. The Ruksherbarium. Netherlands. III:363.
- Datta, R. 1989. *Ontogeny, Cell Differentiation, and Structure of Vascular Plant*. Springer-Verlag. New York.
- Datta, K.B., Mitra, J., Sarker, D.De., and Kanjilal, B. 2004. *Stem Disc Culture-Development of a Rapid Mass Propagation Method for Dendrobium moschatum* (Buch. Ham.). Swart-An

- Endangered Orchid*. Department of Botany, University of North Bengal. India. <http://www.ias.ac.in/cursci/aug25/articles13.htm>
- Davies, P.J. 1995. "Plant Hormones, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology." In A.D. Krikorian (Ed.) *Hormones in Tissue Culture and Micropropagation*. Kluwer Publishing. Dordest. Pp: 774-793.
- Dorusposari, B. 2003. *Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Kinetin dan Naphthalene Asetic Acid terhadap Pembentukan dan Perkembangan Meristem Ujung Batang Tanaman Anggrek Hibrida Phalaenopsis "Star of Rio" secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.
- Fahn, A. 1989. *Anatomi Tumbuhan*. Rineka Cipta.
- Farid, M dan Tjaturadi, B. 2005. *Upaya Mencetak Peneliti Muda dan Mencatat Keanekaragaman Hayati Papua Kembali Dikerjakan Conservation International Bersama Mitrananya*. Conservation National Indonesia. www.conservation.or.id/home.php?page=g_search.list
- Gunawan, L.W. 2004. *Budi Daya Anggrek*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Harni, L.K. 2003. *Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Kinetin dan Naphthalene Asetic Acid terhadap Pertumbuhan Meristem Ujung Batang secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.
- Husni, A. 1997. "Perbanyakan dan Penyimpanan Tanaman Inggu Melalui Kultur Jaringan". *Buletin Plasma Nutfah* 2(1). Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor. Bogor.
- Lyndon, R.F. 1998. *The Shoot Apical Meristem: Its Growth and Development*. Cambridge University Press. New York.
- Madulid, D.A. 2002. *A Pictorial Guide to the Noteworthy Plants of Palawan, Palawan Tropical Forestry Protection Programme*. Palawan Council for Sustainable Development. pp: 77. http://www.pcsd.ph/photo_gallery/flora/tigre.htm
- Noogle, G.R and Fritz, G.J. 1976. *Introductory Plant Phisiology*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- Salisbury, F.B dan Ross, C.W. 1995a. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 2. (Diterjemahkan oleh Diah R.L dan Sumaryono). Penerbit ITB. Bandung.
- Salisbury, F.B dan Ross, C.W. 1995b. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. (Diterjemahkan oleh Diah R.L dan Sumaryono). Penerbit ITB. Bandung.
- Sandra, E. 2003. *Kultur Jaringan Anggrek Skala Rumah Tangga*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Santoso, U dan Nursandi, F. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.
- Suryowinoto, M. 1984. *Mengenal Anggrek-anggrek Spesies*. UGM Press. Yogyakarta.
- Wattimena, G.A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. PAU Bioteknologi Tanaman. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Bogor
- Wattimena, G.A., Gunawan, L.W., Matjik, N.A., Syamsudin, E., Wendi, N.M.A., dan Gunawan, A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi Tanaman. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Bogor.
- Widiastoety, D. 2004. *Perbaikan Genetik dan Perbanyakan Bibit secara In Vitro dalam Mendukung Perkembangan Anggrek di Indonesia*. Balai Penelitian Tanaman Hias. Bogor.
- Winarsih, S dan Priyono. 2000. "Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh terhadap Pembentukan dan Pengakaran Tunas Mikro pada Asparagus secara *In Vitro*." *J. Hort.* 10 (1): 11-17.
- Withner, C.L. 1974. "Clonal Multiplication of Orchids." In G.M. Morel (Ed.) *The Orchids Scientific Studies*. John Wiley and Sons, Inc. New York.