

Induksi tunas dari protokorm intak dan fase awal perkembangan *Dendrobium phalaenopsis* secara in vitro

In vitro shoot induction from intact protocorm and early stage development in *Dendrobium phalaenopsis*

ARKAN SETIAJI^{1,✉}, NINTYA SETIARI², ENDANG SEMIARTI^{3,✉}

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Sleman 55281, Yogyakarta, Indonesia. Tel./fax.: +62-274580839, ✉email: arkan.setiaji@mail.ugm.ac.id

²Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro. Kampus Undip Tembalang, Semarang 50275, Jawa Tengah, Indonesia

³Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Sleman 55281, Yogyakarta, Indonesia. Tel./fax.: +62-274580839, ✉email: endsemi@ugm.ac.id

Manuskrip diterima: 18 Maret 2018. Revisi disetujui: 21 Juni 2018.

Abstrak. Setiaji A, Setiari N, Semiarti E. 2018. Induksi tunas dari protokorm intak dan fase awal perkembangan *Dendrobium phalaenopsis* secara in vitro. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 4*: 20-27. Anggrek larat (*Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.) merupakan flora identitas Provinsi Maluku, Indonesia. Berdasarkan Peraturan Pemerintah No. 7 tahun 1999 tentang pengawetan jenis tumbuhan dan satwa, anggrek ini termasuk dalam 12 spesies anggrek yang dilindungi. Perbanyakkan secara in vitro perlu dilakukan sebagai upaya konservasi dan pemenuhan kebutuhan pasar. Biji ditumbuhkan dalam media Vacin and Went (VW) diperkaya 1,0, 2,0 dan 3,0 g l⁻¹ pepton. Karakteristik setiap fase yang berkembang pada biji yang berkecambah diamati dan dianalisis. Pengujian kemampuan multiplikasi tunas dilakukan dengan penanaman protokorm intak (utuh) umur 2,7 bulan pada media Murashige and Skoog (MS) dengan penambahan 4,54, 9,08, 13,62 mM Thidiazuron (TDZ) dan 4,44, 13,32, 17,76, 26,64 mM 6-Benzylaminopurine (BAP), dan kontrol. Fase awal perkembangan benih anggrek larat terbagi menjadi 6 fase yang optimal tumbuh pada media VW penambahan pepton 2,0 g l⁻¹. Berdasarkan nilai indeks kapasitas pembentukan tunas, penambahan TDZ 9,08 mM optimal digunakan untuk induksi tunas pada protokorm anggrek larat dengan nilai 1,83±0,59.

Kata kunci: *Dendrobium phalaenopsis*, fase awal, induksi tunas, protokorm

Abstrak. Setiaji A, Setiari N, Semiarti E. 2018. In vitro shoot induction from intact protocorm and early stage development in *Dendrobium phalaenopsis*. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 4*: 20-27. Anggrek larat (*Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.) is the identity flora of Moluccas Province, Indonesia. Based on Government Regulation no. 7 of 1999 on the preservation of plant and animal species, this orchid belongs to 12 species of protected orchids. In vitro propagation needs to be done as a conservation and fulfillment of market needs. Seeds are grown in Vacin and Went (VW) medium-enriched 1.0, 2.0, 3.0 g l⁻¹ peptone. The characteristics of each of the developing phases in the germinated seed were observed and analyzed. For the establishing of proliferating cultures, intact protocorm of 2.7 months of age were growing on Murashige and Skoog (MS) medium with the addition of 4.54, 9.08, 13.62 mM Thidiazuron (TDZ) and 4.44, 13.32, 17.76, 26.64 mM 6-Benzylaminopurine (BAP), and control. The initial phase of development of seeds is divided into 6 phases that optimally grow on VW media addition of peptone 2.0 g l⁻¹. Based on the value of the bud formation capacity (BFC) index, the optimal addition of TDZ 9.08 mM was used for shoot induction in protocorm of *D. phalaenopsis* with value 1.83±0.59.

Keywords: *Dendrobium phalaenopsis*, early stages, protocorm, shoot induction

PENDAHULUAN

Anggrek (Orchidaceae), merupakan familia terbesar dalam kingdom Plantae dengan 800 genera dan beranggotakan 20.000 sampai dengan 30.000 spesies (Godo et al. 2010). Genus *Dendrobium* sendiri memiliki sekitar 1.500 spesies, kebanyakan epifit, dengan keunggulan mudah beradaptasi dengan berbagai cuaca, mudah dibudidayakan, dan memiliki daerah persebaran yang luas (Faria 2010; Lorenzi and Souza 2008). Di antara anggrek spesies yang ada, salah satu diantaranya adalah anggrek larat (*Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.).

Keberadaan anggrek ini di habitat aslinya sudah sangat sedikit dan telah ditetapkan menjadi salah satu dari 12 spesies anggrek langka di Indonesia berdasarkan Peraturan Pemerintah No. 7 tahun 1999 tentang pengawetan jenis tumbuhan dan satwa. Upaya konservasi untuk mencegah kepunahan dan hilangnya sumber daya genetik, serta pemenuhan kebutuhan pasar terhadap suplai indukan anggrek perlu dilakukan. Dalam hal ini mikropropagasi secara in vitro menjadi solusi yang tepat karena dapat menghasilkan bibit anggrek dalam jumlah banyak, efisien dan seragam.

Dalam kultur *in vitro* diperlukan suatu media yang tepat. Komponen media untuk kultur *in vitro* anggrek secara umum terdiri dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino, myo-inositol dan penambahan zat-zat organik lain yang relatif dibutuhkan dalam jumlah besar. Laju pertumbuhan jaringan tanaman juga dapat ditingkatkan dengan penambahan zat-zat organik kompleks dan ekstrak tanaman (Gnasekaran et al. 2012). Penambahan air kelapa, ekstrak pepaya, ekstrak daging, ekstrak tomat, dan pepton mampu mempengaruhi komposisi nutrisi organik pada media dan menghasilkan faktor-faktor pertumbuhan yang tidak terdefinisi (Molnar et al. 2011). Pepton merupakan hasil hidrolisis dari jaringan tanaman atau hewan yang mengandung asam amino dan vitamin (Nambiar et al. 2012). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan pepton dapat meningkatkan pembentukan formasi tunas dan dalam beberapa kasus, praktis digunakan untuk anggrek (Chen and Chang 2002; Kaur and Bhutani 2012; Ng et al. 2010) dan alpukat (Nhut et al. 2008) terutama untuk mempercepat pembentukan embrio somatik. Hossain et al. (2010) menetapkan $2,0 \text{ g l}^{-1}$ pepton sebagai konsentrasi yang optimal ditambahkan pada media Mitra dan Phytamax dengan tingkat perkecambahan biji *Cymbidium giganteum* mencapai 100%. Efek positif pepton terhadap pertumbuhan dan perkembangan awal anggrek juga ditunjukkan pada *C. punctatum* (Dutra et al. 2008) dan anggrek terestris *Calopogon tuberosus* (Kauth et al. 2006).

Salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan adalah perimbangan komposisi media dengan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan (Gunawan 1995). Penambahan sitokinin pada media kultur dapat meningkatkan laju pembentukan dan ukuran zona meristematik (Ioio et al. 2008). Latip et al. (2010) melaporkan bahwa penambahan TDZ 0,45-1,36 mM mampu menginduksi 1-23 protokorm baru hasil embriogenesis somatik sekunder pada protokorm *P. gigantea*. Pada *Phalaenopsis*, penggunaan TDZ secara tunggal lebih efektif daripada BA (Ernst 1994). Pada *P. amabilis* konsentrasi TDZ 2,27 mM optimal menginduksi embriogenesis somatik pada protokorm (Ningrum dkk. 2017). Menggunakan berbagai macam eksplan, Mose et al. (2017) menetapkan konsentrasi 13,62 mM optimal untuk embriogenesis somatik pada *P. amabilis*.

Jenis sitokinin lainnya adalah 6-benzylaminopurine (BAP). BAP telah luas digunakan dan efektif dalam induksi pembelahan sel dan regenerasi tunas (Chawla 2009). Persentase proliferasi tunas tertinggi pada pemberian BAP konsentrasi 4,44 dan 8,88 mM. Pemberian 17,76 mM BAP menyebabkan protokorm yang terbentuk berwarna kekuningan atau kecoklatan (David et al. 2008). Penelitian ini akan menetapkan fase perkembangan tahap awal dan daya multiplikasi tunas anggrek *D. phalaenopsis* pada medium *in vitro* dengan penambahan pepton, TDZ dan BAP.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan analisis anatomi dilaksanakan di Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada bulan Maret s.d. Oktober 2017.

Cara kerja

Bahan tanaman

Buah (kapsul) umur 2,5 bulan disterilisasi dengan perendaman dalam alkohol 70% dan dibakar beberapa detik. Perlakuan ini diulang 3 kali. Karpel kemudian dibuka dengan mengiris bagian pinggir midrib kapsul, biji diambil dan disemai pada media perlakuan pepton. Protokorm untuk perlakuan induksi tunas diperoleh dari semai pada perlakuan sebelumnya yang berumur 2,7 bulan.

Pengaruh pepton terhadap perkecambahan biji dan pembentukan protokorm (eksperimen 1)

Biji ditabur pada media VW (Vacin and Went 1949) dengan berbagai konsentrasi pepton (1,0, 2,0 dan $3,0 \text{ g l}^{-1}$). Media dilengkapi dengan 0,8% agar dan 2,0% sukrosa. pH media diatur pada kisaran 5,2-5,8 sebelum diautoklaf pada suhu 121° C , tekanan 103.421 kPa, selama 15 menit. Perkecambahan biji dan perkembangan fase protokorm diamati setiap minggu selama 2 bulan pengamatan. Pada setiap minggu sampel diambil untuk dibuat preparat anatomisnya berdasarkan metode Ruzin (1999).

Pengaruh TDZ dan BAP terhadap induksi tunas protokorm (eksperimen 2)

Protokorm hasil eksperimen 1 disubkultur pada media MS (Murashige and Skoog 1962) dengan berbagai konsentrasi TDZ (4,54, 9,08, 13,62 mM) dan BAP (4,44, 13,32, 17,76, 26,64 mM). Media dilengkapi dengan 0,2% gellan gum dan 3,0% sukrosa. pH media diatur pada kisaran 5,6-6,3 sebelum diautoklaf pada suhu 121° C , tekanan 103.421 kPa, selama 15 menit. Setiap perlakuan diujikan pada 40 protokorm selama 8 minggu, kemudian diukur nilai indeks kemampuan pembentukan tunas (*bud forming capacity* (BFC)).

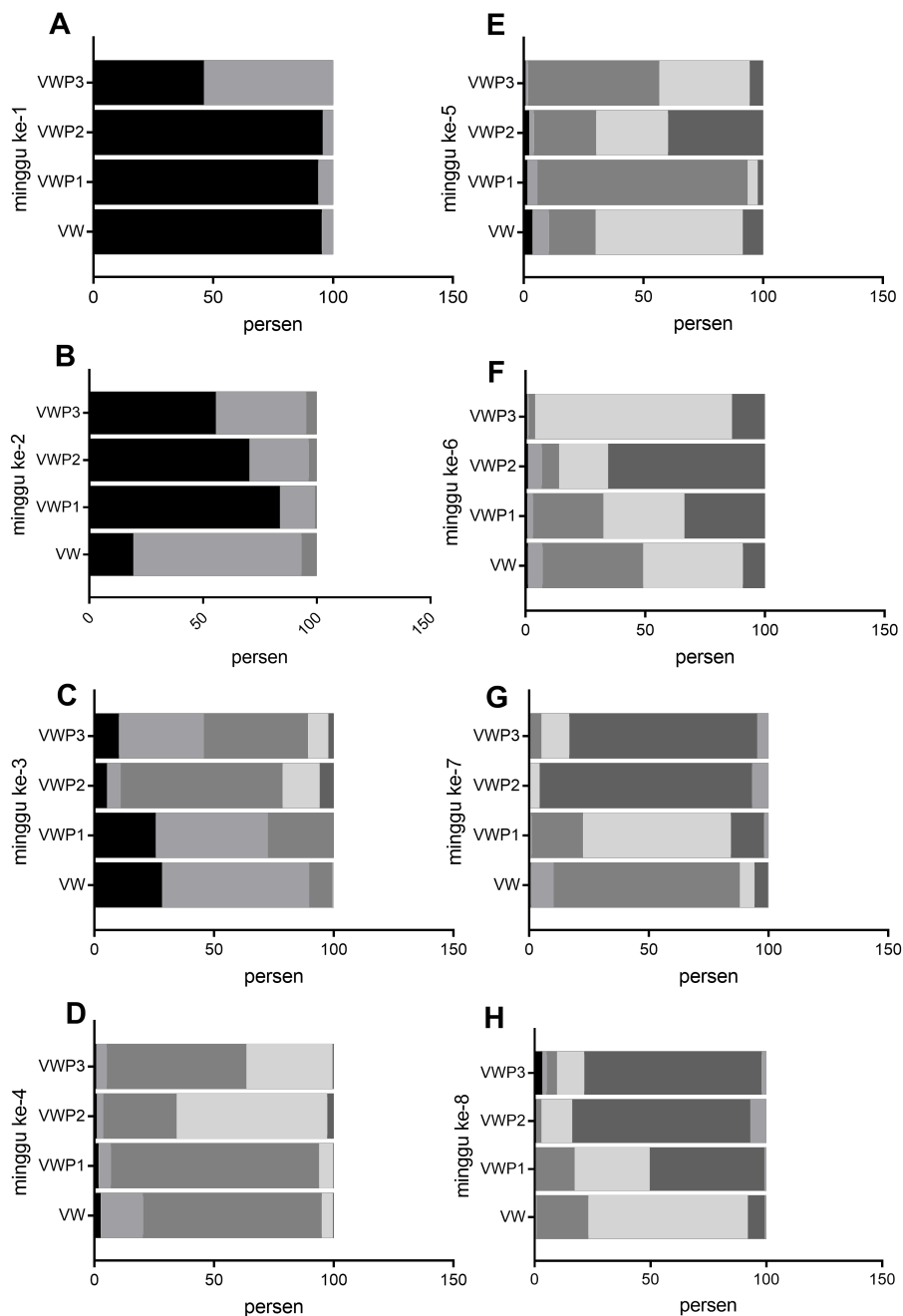
Analisis data

Data perkecambahan dan perkembangan protokorm dianalisis dengan ANOVA atau Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Mann Whitney U atau uji Duncan. Analisis data multiplikasi tunas menggunakan *BFC index* yang dihitung berdasarkan rerata jumlah tunas dan respon persentase eksplan (Hajong et al. 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pepton terhadap perkecambahan biji dan pembentukan protokorm (eksperimen 1)

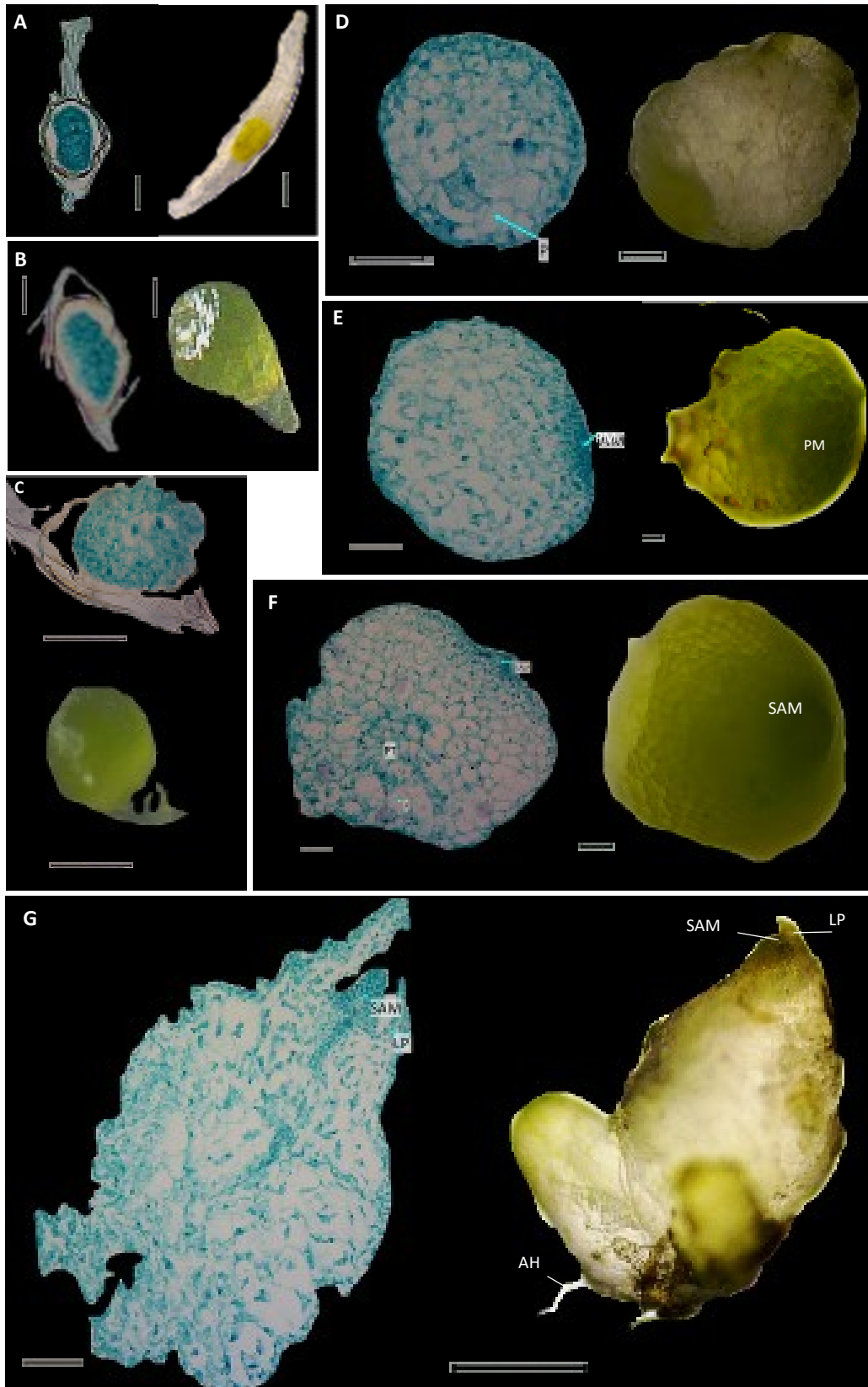
Perkembangan protokorm anggrek *D. phalaenopsis* yang diamati selama 8 minggu menunjukkan adanya 6 fase perkembangan (Gambar 2), adapun rincian perkembangan



Gambar 1. Perkembangan fase-fase pasca germinasi selama 8 minggu. Grafik ini menggambarkan fase yang mendominasi dan yang berkurang jumlahnya, berkembang menjadi fase selanjutnya pada setiap minggu pengamatan dan media perlakuan yang diujikan, berturut-turut A-H, minggu ke-1 s.d. minggu ke-8. VW = Vacin & Went (kontrol); VWP1 = VW + 1,0 g l⁻¹; VWP2 = VW + 2,0 g l⁻¹; VWP3 = VW + 3,0 g l⁻¹

setiap fase per minggunya diilustrasikan pada gambar 1. Jumlah protokorm dari masing-masing fase dihitung. Pada minggu ke-8, 68.77% protokorm masih berada pada fase 4 pada media VW; 49.48% pada fase 5 di media VWP1; 76.82% pada fase 5 di media VWP2; dan 76.51% pada fase 5 di media VWP3. Penentuan konsentrasi penambahan pepton yang optimal diperoleh berdasarkan fase 5, dimana fase ini sudah membentuk struktur bipolar dan merupakan fase terbanyak dari 6 fase yang diketahui (Gambar 3).

Selain itu penentuan perlakuan terbaik juga didasarkan atas luas penampang melintang protokorm anggrek larat (Tabel 1). Luas penampang protokorm yang dipilih adalah pada fase 5 usia 8 minggu dan dipilih secara random. Berdasarkan percobaan VWP2 mampu menghasilkan protokorm anggrek larat dengan penampang paling luas. Grafik perbandingan luas protokorm fase 5 juga ditampilkan (Gambar 4).



Gambar 2. Fase-fase perkembangan bibit awal anggrek larat. A. Fase 0 (embrio terselubung testa). B. Fase 1 (embrio berkembang berbentuk ovoid). C. Fase 2 (testa pecah dan embrio berbentuk ovoid tumbuh melampui testa). D. Fase 3 (bentuk embrio membulat dan telah terpisah dari testa). E. Fase 4 (zona mersitem apikal terbentuk); F. Fase 5 (protokorm akan membentuk SAM); G. Fase 6 (protokorm dengan primordial daun). T = testa; PM = promeristem; P = parenkim; AM = *apical meristem*; PT = *provascular tissue*; PS = *procambial strand*; SAM = *shoot apical meristem*; LP = *leaf primordia*. Skala (A-F) = 100 μ m (G) 500 μ m

Pengaruh TDZ dan BAP terhadap induksi tunas protokorm (eksperimen 2)

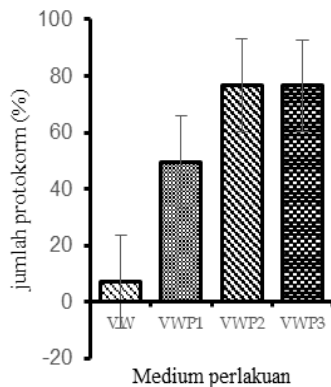
Strategi perbanyak anggrek larat juga dapat dilakukan dengan induksi tunas menggunakan Thidiazuron atau BAP. Menggunakan protokorm intak fase 5 umur 9 minggu selama 8 minggu pengamatan diketahui bahwa nilai BFC tertinggi pada medium MS + pepton 2,0 g l⁻¹ + TDZ 9,08 mM (Tabel 2). Adapun proses pemunculan tunas adventif disajikan pada Gambar 6.

Tabel 1. Luas penampang melintang protokorm fase 5 pada 4 medium penambahan pepton. Protokorm memiliki penampang paling luas pada medium VWP2

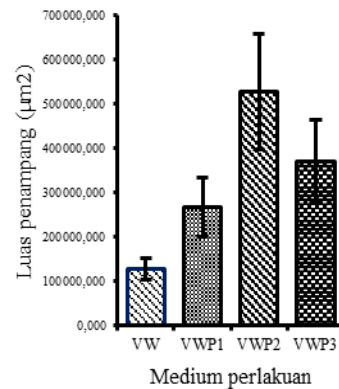
Medium	Protokorm yang dihitung	Rerata luas (µm ²) ± SD
VW	40	128340.6805 ± 24167.91
VWP1	40	268334.4855 ± 67031.27
VWP2	40	529008.71175 ± 132974.9
VWP3	40	371584.23925 ± 95689.78

Tabel 2. Rerata nilai BFC pada eksplan yang diinduksi thidiazuron dan BAP. Rerata nilai BFC tertinggi 1,13 pada medium MS + pepton 2,0 g l⁻¹ + TDZ 9,08 mM sedangkan terendah 0,13 pada medium MS + pepton 2,0 g l⁻¹ + BAP 4,44 mM

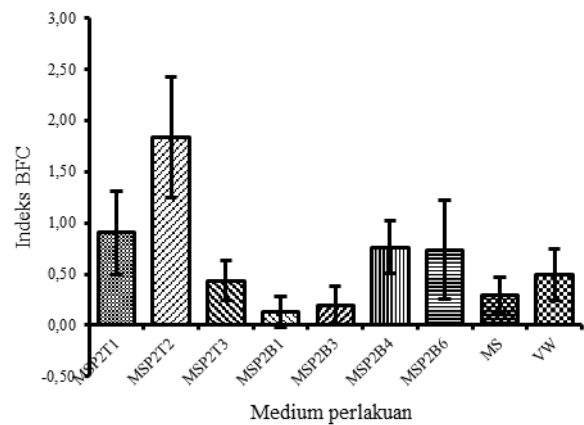
Medium	Rerata BFC ± SD
MSP2T1	0,90 ± 0,40
MSP2T2	1,83 ± 0,59
MSP2T3	0,43 ± 0,20
MSP2B1	0,13 ± 0,15
MSP2B3	0,20 ± 0,18
MSP2B4	0,76 ± 0,26
MSP2B6	0,74 ± 0,49
MS	0,29 ± 0,17
VW	0,49 ± 0,25



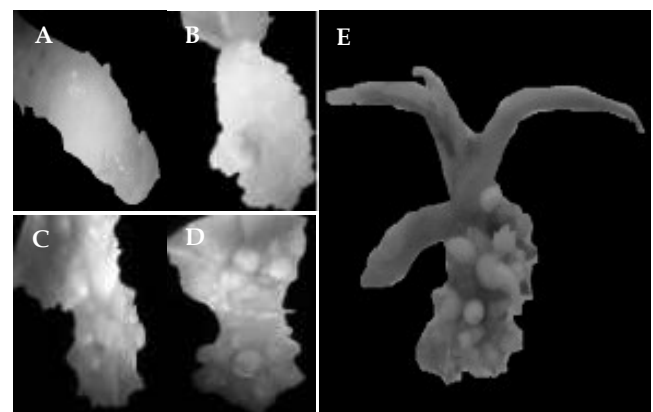
Gambar 3. Jumlah protokorm fase 5 pada 4 medium penambahan pepton. VW + pepton 2 g l⁻¹ memiliki prosentase tertinggi sedangkan medium dasar VW memiliki prosentase terendah.



Gambar 4. Perbandingan luas penampang melintang protokorm pada usia 8 minggu. Protokorm memiliki penampang paling luas pada medium VWP2 (µm²)



Gambar 5. Perbandingan nilai BFC pada berbagai medium perlakuan. Rerata nilai BFC tertinggi 1,13 pada medium MS + pepton 2,0 g l⁻¹ + TDZ 9,08 mM sedangkan terendah 0,13 pada medium MS + pepton 2,0 g l⁻¹ + BAP 4,44 mM



Gambar 6. Perkembangan tunas adventif pada pangkal eksplan protokorm. A. 2 minggu, pangkal mulai mengalami penonjolan; B. 4 minggu, propagul mulai terlihat; C. 6 minggu, SAM mulai terbentuk; D. 7 minggu, primordia daun berkembang; E. tampilan penuh eksplan pada umur >9 minggu setelah penanaman pertama. Skala = 0,5 cm

Pembahasan

Studi pendahuluan memperlihatkan bahwa *D. phalaenopsis* sulit untuk berkecambah. Umur kematangan fisiologis biji sulit diprediksi karena biji yang mudah berkecambah adalah yang berwarna putih kekuningan yang seringkali warna valvenya masih kehijauan. Pada umumnya buah anggrek diprediksi matang ketika warna valve kekuningan. Pengamatan secara mendetail bagaimana kondisi embrio *D. phalaenopsis* di dalam testa dalam penelitian ini belum dilakukan. Pada spesies anggrek yang sulit berkecambah, selain adanya kulit biji luar, terdapat selapis kulit lagi bagian dalam yang disebut karapas yang menghasilkan selubung embrio yang rigid saat biji masak (Yamazaki and Miyoshi 2006). Saat biji mulai masak, beberapa senyawa kimia, misalnya, polifenol, bahan kutikular, atau lignin, dapat terakumulasi pada pada kulit biji dan menyebabkan biji yang matang bersifat hidrofobik (Lee et al. 2005). Faktor-faktor ini dapat menyebabkan impermeabilitas benih yang masak dan menghasilkan persentase perkecambahan biji yang rendah (Hsu and Lee 2012). Selain itu, akumulasi asam absisat endogen yang tinggi dalam biji matang juga menghambat perkecambahan biji (Lee et al. 2007). Akibatnya, perbanyakan in vitro pada biji yang belum matang sering digunakan untuk memaksimalkan persentase perkecambahan pada beberapa spesies anggrek.

Embrio masak akan mulai berkembang pada umur 2 minggu setelah penaburan (msp) dengan memperbesar volume sehingga berbentuk ovoid. Pada minggu ke-3 akan terjadi peningkatan jumlah fase 3 dimana bentuk protokorm yang membulat dengan sel-sel yang seragam (sel parenkim). Fase-fase perkembangan protokorm secara anatomi tersebut kemudian diperbandingkan dengan tampilan morfologi (Gambar 2). Rambut akar mulai terlihat pada fase 3 dan akar sejati mulai terlihat setelah umur 12 minggu. Selama pengamatan struktur tunas lebih terbentuk dibandingkan dengan perakaran.

Setelah embrio berkembang menjadi fase 1, dalam 2-3 hari akan menjadi fase 2 sehingga pada minggu ke-2 jumlah fase 2 sudah mengalami penurunan. Proses perkecambahan diawali dengan imbibisi. Benih menyerap air dan oksigen yang menyebabkan benih membengkak dan ukurannya meningkat. Pada benih dengan endosperma, enzim yang dikeluarkan akan mengubah pati yang tidak larut menjadi gula terlarut. Namun pada anggrek, kompleksitas komposisi medium in vitro sudah cukup untuk mendukung diferensiasi sel. Air tersebut memicu penurunan kadar hormon etilen dan asam absisat sehingga hormon auksin teraktivasi. Auksin berperan dalam mempengaruhi pembelahan sel, pemanjangan sel dan diferensiasi sel (Eibl et al. 2009). Pusat pengorganisasian auksin terletak di dekat ujung anterior embrio, dan auksin akan mengalir ke bagian basal dan membentuk hipofisis, yang merupakan jaringan inisial untuk meristem akar (Su et al. 2011).

Pada sebagian besar angiosperma, meristem embrionik terbentuk selama embriogenesis (tahap jantung (*heart stage*)), yang kemudian membentuk sumbu tunas/akar. Setelah perkecambahan, sel embrio membelah untuk membentuk protokorm, yang dapat berbentuk tuberous,

sphere atau lonjong, dan terdiri dari sel yang tidak terdiferensiasi hingga sekitar dua sampai tiga minggu kemudian, meristem akan memunculkan daun pertama (Vinogradova and Andronova 2002). Daun pertama *D. phalaenopsis* muncul pada minggu ke-5. Hal ini menunjukkan bahwa perkembangan awal anggrek sejalan dengan pembentukan meristem tunas yang juga teramati selama pertengahan/akhir embriogenesis pada kebanyakan angiosperma.

Pada medium dengan penambahan pepton, embrio saat masih terbungkus testa sebelum pecah (fase 1 minggu ke-1) sudah berwarna kehijauan (*greenish embryo*). Namun hal ini bukan berarti telah terjadi peralihan dari heterotrof menjadi autotrof dalam waktu singkat. Inisiasi klorofil memang terjadi sejak awal embriogenesis melalui adanya kloroplas embrionik fungsional namun kloroplas ini akan mengalami degenerasi sehingga disebut eoplast (Ruppel et al. 2011).

Protein fotosintesis penting dalam kloroplas terdapat pada lapisan SAM (L1, L2 dan L3) dan primordia daun, yang telah digunakan untuk studi diferensiasi kloroplas dalam jaringan (Charuvi et al. 2012). Lapisan L1, LP dan sebagian besar lapisan L3 pada plastidnya mengandung jejaring pembentukan tilakoid yang juga terdapat protein aktif untuk fotosintesis. Pada *D. phalaenopsis*, SAM telah muncul pada usia 21 hari. Arditi (1992) menemukan kloroplast terbentuk pada 14-21 hari setelah penaburan pada media kultur in vitro yang mengandung gula. Terlepas dari fungsi vital mengatur pembelahan sel dan diferensiasi, sitokinin terlibat langsung dalam pembentukan kloroplas oleh sintesis protein kloroplas dan pigmen fotosintetik (Aremu et al. 2012).

Embrio selanjutnya berkembang menjadi protokorm. Protokorm merupakan bentuk peralihan embrio yang belum terdiferensiasi. Protokorm membentuk dua sumbu (bipolar), bagian anterior dan posterior. Selama proses perkecambahan, pecahnya kulit biji memungkinkan protokorm putih mengembang, yang dalam waktu singkat menjadi kehijauan. Protokorm hijau berbentuk bulat dan menghasilkan rhizoid di daerah yang bersentuhan dengan media kultur; sel-sel kecil di daerah yang berlawanan mengalami pembelahan sel untuk membentuk jaringan meristematik. Massa meristematik tersebut menghasilkan tonjolan yang berkembang menjadi daun pertama, dan daun selanjutnya dihasilkan dari meristem ini. Daun ini berbentuk tombak tebal dan memiliki ujung acute. Setelah primordia daun terbentuk, *procambial strand* akan berkembang dan memanjang ke atas ke arah primordia daun serta ke bawah ke arah protokorm, sedangkan akar pertama akan muncul dari sel-sel yang berdekatan dengan tempat munculnya tunas ujung (Arditti 1992). Selama kultur in vitro, sejumlah kecil protokorm menghasilkan apeks tunas baru, masing-masing berpotensi sebagai bibit tunggal. Pada fase akhir, mayoritas protokorm ini muncul *absorbing hair* pada bagian posterior protokorm. Tidak seperti tumbuhan lainnya, pada anggrek belum terbentuk *Root Apical Meristem* (RAM) selama perkembangan awal anggrek sehingga peran penyerapan nutrisi digantikan sementara oleh rambut akar (Novero et al. 2008)

Penentuan fase perkembangan awal *D. phalaenopsis* ini berdasarkan perkembangan struktur tunas. Pepton kaya akan kandungan nitrogen dan asam-asam amino. Keberadaan nitrogen berkorelasi positif dengan konsentrasi sitokinin (Kamada-Nobusada et al. 2013; Kiba et al. 2011), khususnya pada tunas apikal namun menghambat biosintesis sitokinin pada tunas lateral (Liu et al. 2011). Sitokinin merupakan fitohormon yang berperan dalam beberapa proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman, seperti pertumbuhan tunas dan akar, dominansi apikal dan perpanjangan umur daun (Werner et al. 2003). Sitokinin juga berperan dalam pembentukan klorofil dari prekursor protoklorofil dan asam amino tirosin yang terdapat dalam pepton diketahui berperan dalam perubahan protoklorofil menjadi klorofil sebagai donor proton (Yoshiki et al. 2003; Belyaeva and Litvin, 2007).

Pada perlakuan induksi tunas. Daerah pertumbuhan tunas-tunas adventif ini berada pada pangkal eksplan (Gambar 6). Nilai yang tertinggi pada luas penampang yang diukur tidak mutlak dapat digunakan untuk penentuan pengaruh pepton. Gejala vetrifikasi juga memengaruhi nilai yang didapatkan sehingga tidak representatif dalam melihat biomassa yang terbentuk. Namun dengan besarnya penampang bibit, hara yang terserap diharapkan semakin banyak sehingga dapat mendukung laju pertumbuhan bibit lebih cepat.

Menurut Chen and Chang (2004), lapisan sel epidermal pada bagian posterior protokorm memiliki kemampuan pengulangan embriogenesis. Tunas yang tumbuh pada semua perlakuan TDZ adalah melalui embriogenesis langsung, tanpa tahapan kalus. Eksplan yang berukuran besar menghasilkan jumlah propagul yang lebih banyak namun propagul-propagul yang tertutupi menjadi *browning* kemudian mati. Tidak sepenuhnya eksplan dalam penelitian ini ditanam secara vertikal, eksplan yang merebah dengan daun yang kontak langsung dengan medium juga tidak memunculkan propagul.

Thidiazuron 9,08 mM memberikan nilai BFC tertinggi meskipun secara statistik hasilnya tidak berbeda nyata dengan medium perlakuan yang lain termasuk pada BAP. Beberapa laporan tentang anggrek terutama pada *Dendrobium* telah sepakat bahwa TDZ sangat efektif merangsang pembentukan dan pemanjangan tunas (Parthibhan et al. 2015). TDZ adalah turunan fenil urea, stimulator yang lebih aktif untuk pembentukan tunas karena aktivitas sitokinin yang tinggi dan sifat persistensi yang lebih dalam di jaringan tanaman, hal ini menyebabkan regenerasi berupa pemanjangan dan perakaran tunas (Parthibhan et al. 2015).

Feng and Chen (2014) berhasil melakukan embriogenesis langsung pada intak *Phalaenopsis aphrodite* dengan kemunculan tunas juga pada bagian distal. TDZ 3 mg/L menginduksi embrio somatik terbanyak dari eksplan protokorm. Sedangkan penelitian Feng and Chen (2014) lainnya menemukan bahwa konsentrasi 2,27 atau 4,54 mM TDZ menghasilkan hasil terbaik induksi embriogenesis somatik dari *seedling*. Dari dua penelitian tersebut menyimpulkan bahwa umur eksplan adalah faktor pembatas keefektifan hormon.

Indeks BFC adalah indikator induksi tunas yang efisien karena mempertimbangkan jumlah eksplan yang menunjukkan tunas terinduksi serta jumlah tunas per eksplan (Tandon et al. 2007).

KESIMPULAN

Tahap awal perkembangan *D. phalaenopsis* terdiri dari 6 fase, yaitu fase 0, fase 1, fase 2, fase 3, fase 5 dan fase 6. Berdasarkan analisis fase-fase perkembangan bibit awal, respon terbaik ditunjukkan oleh penambahan pepton 2 g l⁻¹. multiplikasi tunas terbanyak ditemukan pada medium dengan penambahan TDZ 9,08 mM.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai hibah desentralisasi PUPT UGM (Penelitian Unggulan Terapan Perguruan Tinggi) tahun 2017 dengan nomor kontrak 2325/UN1.P.III/DIT-LIT/LT/2017 tanggal 19 April 2017 dan merupakan sub penelitian dari judul “Peningkatan Produksi Bibit Anggrek Unggul Indonesia melalui Pembentukan Embrio Somatik Secara In vitro dengan Bioteknologi” dengan ketua peneliti penulis korespondensi (Dr. Endang Semiarti).

REFERENCES

- Arditti J. 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley and Sons, New York.
- Aremu AO, Bairu MW, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J. 2012. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Organ Cult* 108: 1-16.
- Belyaeva OB and Litvin FF. 2007. Photoactive pigment-enzyme complexes of chlorophyll precursor in plant leaves. *Biochemistry* 72: 1458-1477.
- Charuvi D, Kiss V, Nevo R, Shimoni E, Adam Z, Reich Z. 2012. Gain and loss of photosynthetic membranes during plastid differentiation in the shoot apex of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 1143-1157.
- Chawla HS. 2009. Introduction to Plant Biotechnology. Oxford and IBH Publishing Company Pvt, New Delhi.
- Chen JT, Chang WC. 2002. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* ‘Gower Ramsey’. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 69: 41-44.
- Chen JT and Chang WC. 2004. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 40 (3): 290-293.
- David D, Gansau JA, Abdullah JO. 2008. Effect of NAA and BAP on protocorm proliferation of Borneo Scented Orchid, *Vanda helvola*. *AsPac J Mol Biol Biotechnol* 16 (3): 221-224.
- Dutra D, Kane ME, Richardson L. 2009. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96: 235-243.
- Eibl R, Werner S, Eibl D. 2009. Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale. *Eng Life Sci* 9: 156-164.
- Ernst R. 1994. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 39: 273-275.
- Feng JH, Chen JT. 2014. A Novel In vitro protocol for inducing direct somatic embryogenesis in *Phalaenopsis aphrodite* without taking explants. *Sci World J*. 2014: 263642. DOI: 10.1155/2014/263642.
- Gnasekaran P, Poobathy R, Mahmood M, Samian MR, Subramaniam S. 2012. Effects of complex organic additives on improving the growth of PLBs of *Vanda* Kasem’s Delight. *Aus J Crop Sci* 6 (8): 1245-1248.

- Godo T, Komori M, Nakaoki E, Yukawa T, Miyoshi K. 2010. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 46: 323-328.
- Gunawan LW. 1995. Teknik Kultur Invitro dalam Hortikultura. Penebar Swadaya, Depok.
- Hajong S, Kumaria S, Tandon P. 2013. Effect of plant growth regulators on regeneration potential of axenic nodal segments of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. *J Agric Sci Tech* 15: 1425-1435.
- Hossaina MM, Sharma M, da Silva JAT, Pathak P. 2010. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae* 123 (4): 479-487.
- Hsu RC-C, Lee YI. 2012. Seed development of *Cypripedium debile* Rchb. f. in relation to asymbiotic germination. *Hortscience* 47 (10): 1495-1498.
- Ioio RD, Linhares FS, Sabatini S. 2008. Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Curr Opin Plant Biol* 11 (1): 23-27.
- Kamada-Nobusada T, Makita N, Kojima M, Sakakibara H. 2013. Nitrogen-dependent regulation of de novo cytokinin biosynthesis in rice: The role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant Cell Physiol* 54 (11): 1881-1893.
- Kaur S, Bhutani KK. 2012. Organic growth supplement stimulants for in vitro multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Hort Sci (Prague)* 39: 47-52.
- Kauth PJ, Vendrame WA, Kane ME. 2006. In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85: 91-102.
- Kiba T, Kudo T, Kojima M, Sakakibara H. 2011. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J Exp Bot* 62: 1399-1409.
- Latip MA, Rosmah M, Zaleha A, Ting LH, Govindasamy LM, Ripin R. 2010. Effects of N6-benzyladenine and thidiazuron on proliferation of *Phalaenopsis gigantea* protocorms. *Asia Pacific. J Mol Biol Biotechnol* 18 (1): 217-220.
- Lee YI, Lee N, Yeung EC, Chung MC. 2005. Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination in vitro. *J Amer Soc Hort Sci* 130: 747-753
- Lee YI, Lu CF, Chung MC, Yeung EC, Lee N 2007 Developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl J Amer Soc Hort Sci 132: 246-252.
- Mathur G, Nadgouda RS. 1998. In vitro plantlet regeneration of blue pine (*Pinus wallichiana* A.B. Jacks) In: National Symposium on Commercial Aspects of Tissue Culture, Molecular. Biology and Biotechnology of Medicinal Plants, Jamia Hamdard University, New Delhi.
- Molnár Z, Virág E, Ördög V. 2011. Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biologica Szegediensis* 55 (1): 123-127.
- Mose W, Indrianto A, Purwantoro A, Semiarti E. 2017. The influence of thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume orchid. *Hayati J Biosci* 24 (4): 201-205.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Nambiar N, Tee CS, Maziah M. 2012. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm-like bodies in *Dendrobium alya* Pink. *Plant Omics J* 5 (1): 10-18.
- Ng C-Y, Saleh NM, Zaman FQ. 2010. In vitro multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). *African J Biotechnol* 9 (14): 2062-2068.
- Nhut DT, Thi NN, Bui TKL and Luan VQ. 2008. Peptone stimulates in vitro shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae* 115: 124-128.
- Ningrum EFC, Rosyidi IN, Puspasari RR, Semarti E. 2017. Perkembangan awal protocorm anggrek *Phalaenopsis amabilis* secara in vitro setelah penambahan zat pengatur tumbuh α -naphthaleneacetic acid dan thidiazuron. *Biosfera* 34 (1): 9-14.
- Novero M, Genre A, Szczyglowski K, Bonfante P. 2008. Root hair colonization by mycorrhizal fungi. In: *Plant Cell Monographs*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Parthibhan S, Rao MV, Kumar TS. 2015. In vitro regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley - An imperiled orchid. *J Genet Eng Biotechnol* 13 (2): 227-233.
- Peraturan Pemerintah No. 7 tahun 1999 tentang Pengawetan Jenis Tumbuhan dan Satwa
- Ruzin SE. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, Oxford.
- Saborio F, Dvorak WS, Donahue JK, Thorpe TA. 1997. In vitro regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacayuite*. *Tree Physiol* 17 : 787-796.
- Su YH, Liu YB, Zhang XS. 2011. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol Plant* 4: 616-625.
- Vacin E, Went FW. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot Gaz* 110: 605-613.
- Vinogradova T and Andronova EV. 2002. Chapter Four - Development of orchid seeds and seedlings. In: *Orchid Biology: Reviews and Perspectives VIII*: Kluwer Academic Publishers, Nederland.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schumling T. 2003. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.
- Yamazaki J, Miyoshi K. 2006. In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Ann Bot* 98: 1197-1206.
- Yoshiki Y, Kanai D, Awai K, Shimojima M, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H. 2003. Light and cytokinin play a co-operative role in MGDG synthesis in greening cucumber cotyledons. *Plant Cell Physiol* 44 (8): 844-855.