

KONSERVASI ANGGREK HITAM (*Coelogyne pandurata* Lindl.) MELALUI MIKROPROPAGASI PADA BERBAGAI MEDIUM KULTUR

Ratih Restiani^{1,2}, Endang Semiarti², Ari Indrianto²

¹Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta, Gedung Agape lantai 4,
Jl. Dr. Wahidin 5-25 Yogyakarta 55224

²Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta
Email : Ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id; endsemi@ugm.ac.id; ariindri@ugm.ac.id

Abstrak

C.pandurata Lindl. merupakan salah satu anggrek alam endemik Kalimantan Timur yang memiliki keindahan bunga dan keunikan di bagian labelumnya yang berwarna hitam. Eksploitasi anggrek hitam yang berlebihan, konversi penggunaan hutan serta kebakaran hutan yang menyebabkan kerusakan habitat alami anggrek hitam dan sulitnya perbanyakan secara konvensional menyebabkan penurunan jumlah populasinya di alam. Oleh karena itu, diperlukan upaya konservasi melalui perbanyakan anggrek hitam secara *in vitro*. Perbanyakan dilakukan melalui kultur biji anggrek hitam pada berbagai medium kultur Knudson C (KC), Vacin & Went (VW), New Phalaenopsis (NP), dan Murashige & Skoog (MS) dengan tujuan menentukan medium yang optimal dalam menginduksi perkecambahan anggrek hitam serta kombinasi hormon NAA (0 dan 0,15 μM) dan 2-IP (0 ; 1 ; 3 ; 5 dan 7 μM) yang optimal dalam multiplikasi tunas kecambah anggrek hitam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium yang optimal dalam menginduksi perkecambahan biji anggrek hitam secara *in vitro* adalah medium MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi. Hasil ini diperoleh berdasarkan pengamatan yang dilakukan terhadap biji anggrek hitam yang telah dikedambahkan selama 6 minggu dalam berbagai medium kultur dan telah dibagi dalam 4 fase yaitu fase 1 (*yellowish embryo*), fase 2 (*greenish embryo*), fase 3 (*embrio bipolar*) dan fase 4 (tunas dengan 1 daun). Selain media yang optimal, penentuan kombinasi hormon yang optimal untuk menginduksi tunas adalah 0,15 μM NAA dan 3 μM 2IP.

Kata kunci: *Coelogyne pandurata* Lindl., konservasi *in vitro*, multiplikasi tunas

Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki hutan tropis terbesar serta memiliki kekayaan spesies anggrek yang sangat beragam. Terdapat hampir 30.000 spesies anggrek alam yang tersebar di seluruh dunia terutama di hutan hujan tropis. Dari jumlah tersebut, diperkirakan 5.000 spesies diantaranya berasal dari Indonesia (Irawati, 2002). Salah satu anggrek alam yang dianggap sebagai *trademark* Indonesia adalah *Coelogyne pandurata* Lindl.

Anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) adalah anggrek simpodial yang memiliki keunikan pada labelumnya yang berwarna hitam. Anggrek hitam terdistribusi secara alami di Papua dan Kalimantan (Handoyo dan Prasetya, 2006). Anggrek ini

banyak dicari untuk dibudidayakan karena bunganya yang indah dan berukuran besar. Kelopak dan mahkota bunga berwarna hijau cerah dengan labelum berbentuk seperti violin berwarna ungu kehitaman sampai hitam dengan beberapa bagian berwarna hijau. Tanaman anggrek ini merupakan anggrek endemik yang habitat alaminya adalah di pohon-pohon hutan hujan tropis Kalimantan.

Berdasarkan PP Nomor 7 Tahun 1999 yang dikeluarkan pada tanggal 27 Januari 1999 menyatakan bahwa anggrek hitam merupakan jenis anggrek yang dilindungi keberadaannya. Hal ini disebabkan karena konversi penggunaan hutan dan juga kebakaran hutan yang menyebabkan kerusakan habitat alami, serta ditambah dengan adanya pencabutan anggrek-anggrek tersebut untuk dibudidayakan diluar habitatnya, menyebabkan anggrek ini terancam keberadaannya (Silalahi dkk., 2008). Kendala yang dihadapi dalam perbanyakan anggrek hitam secara konvensional sebagai upaya konservasi adalah periode berbunganya yang sangat cepat dan bunga yang relatif sulit untuk disilangkan atau dibastarkan (Arditti, 1992).

Oleh karena itu, perlu dilakukan upaya konservasi baik secara *in situ* maupun *ex situ* dalam rangka menjaga kelestarian biodiversitas Kalimantan yang sangat berharga ini. Saat ini telah banyak dilakukan teknik perbanyakan tanaman dengan metode kultur *in vitro*. Penerapan kultur *in vitro* yang dapat dilakukan sebagai upaya perbanyakan anggrek hitam adalah melalui kultur biji. Dalam kultur *in vitro*, embrio dalam biji anggrek dapat terpenuhi kebutuhan gula dan mineralnya sehingga mampu berkecambah tanpa bersimbiosis dengan mikhoriza.

Kultur *in vitro* biji anggrek merupakan teknik yang penting dalam mikropropagasi anggrek, karena secara alami biji anggrek di alam sulit berkecambah. Hal ini disebabkan karena biji anggrek tidak memiliki endosperm sehingga membutuhkan keberadaan jamur mikorhiza untuk bersimbiosis. Perbanyakan anggrek secara *in vitro* dengan media buatan yang sesuai merupakan solusi untuk mengatasi masalah sulitnya perkecambahan biji anggrek di alam tersebut. Keuntungan yang diperoleh dari kultur *in vitro* biji anggrek ini disebabkan karena dapat meningkatkan kemampuan berkecambah biji anggrek yang rendah di alam disebabkan karena biji berukuran sangat kecil (mikroskopik) dan tidak adanya endosperm sebagai cadangan makanan, perkecambahan *in vitro* dapat mempercepat perbanyakan anggrek dibandingkan secara *in vivo* jika pengaturan kondisi lingkungan dalam kultur baik dan

tidak adanya kompetisi dengan jamur atau bakteri (Arditti, 1992 ; Chawla, 2000 ; Evans *et al.*, 2003 ; Luan *et al.*, 2006).

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kultur *in vitro* adalah penggunaan medium yang sesuai sebagai sumber nutrisi eksplan. Medium yang seimbang dibutuhkan untuk memaksimalkan perkecambahan biji anggrek secara *in vitro* (Evans *et al.*, 2003). Penggunaan unsur nitrogen, fosfor, kalium, dan magnesium dapat memacu pertumbuhan eksplan. Sejumlah species anggrek dapat berkecambah sangat baik dalam media dengan kadar kalsium rendah sedangkan penggunaan kadar fosfat dapat memacu perkecambahan pada beberapa spesies (Arditti, 1992). Penggunaan medium untuk kultur *in vitro* biji anggrek berbeda-beda tergantung pada kebutuhan nutrisi masing-masing species. Pada medium kultur anggrek seringkali diberi penambahan bahan alami seperti sumber gula, vitamin, senyawa organik, zat pengatur tumbuh dan asam amino. Keberhasilan penggunaan kultur *in vitro* sangat tergantung pada jenis media. Media kultur yang tidak hanya mengandung unsur hara makro dan mikro, tetapi juga juga karbohidrat sebagai sumber karbon atau bahan organik lainnya. Penggunaan media dan zat pengatur tumbuh yang tepat diharapkan dapat menghasilkan pertumbuhan *in vitro* yang lebih baik (Widiastoety dan Purbadi, 2003 ; Hartati, 2010).

Penggunaan medium kultur dengan berbagai komposisi nutrisi disesuaikan dengan jenis tanaman yang digunakan dan tujuan penelitian. Medium kultur yang umum digunakan untuk kultur *in vitro* anggrek adalah medium Knudson C, Vacin and Went, Murashige and Skoog, dan New Phalaenopsis (Sinha and Roy, 2004). Penelitian mengenai perbanyakan anggrek hitam secara *in vitro* masih belum banyak dipublikasikan. Untari dan Puspitaningtyas (2006), melaporkan penggunaan medium VW yang ditambah dengan senyawa organik kompleks (air kelapa, pisang, kentang, ubi jalar, atau kedelai) dan NAA dapat menghasilkan 1.5-2 kali jumlah tunas pada anggrek. Silalahi *et al.*, (2008), melaporkan penggunaan BA dan NAA untuk induksi tunas dari eksplan ujung tunas anggrek umur 2 tahun. Jumlah tunas terbanyak diperoleh pada medium VW + NAA 1 ppm + BA 3 ppm. Jumlah rata-rata tunas yang terbentuk pada medium yang diperkaya ZPT sebanyak 12 dibandingkan pada kontrol yang hanya terbentuk 8 tunas.

Sebagai upaya menyelamatkan populasi anggrek hitam (*C. Pandurata* Lindl.) yang sudah terancam punah maka dalam penelitian ini dilakukan mikropropagasi

meliputi perkecambahan anggrek hitam secara *in vitro* dalam berbagai medium kultur yaitu medium Knudson C (KC), Vacin and Went (VW), Murashige and Skoog (MS), dan New Phalaenopsis (NP) dengan variasi $\frac{1}{2}$ konsentrasi, konsentrasi penuh dan dengan penambahan air kelapa 150 ml serta induksi tunas pada kecambah anggrek hitam umur 5 bulan dalam medium basal NP dengan kombinasi konsentrasi NAA (0 ; 0.15 μ M) dan 2-ip (0; 1; 3; 5; 7 μ M). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui medium dasar yang optimal dalam meningkatkan persentase perkecambahan *in vitro* biji anggrek hitam dan menentukan kombinasi konsentrasi hormon NAA dan 2-ip yang optimal dalam menginduksi tunas dari eksplan kecambah anggrek hitam umur 5 bulan.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan mikropropagasi anggrek hitam sebagai upaya konservasi anggrek tersebut. Selain itu, diharapkan penelitian ini juga dapat bermanfaat bagi para peneliti maupun *nursery* anggrek yang ingin mengembangkan perbanyak anggrek hitam melalui kultur *in vitro*.

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang didanai oleh Hibah Bersaing XVII. Penelitian ini dibagi ke dalam 3 tahapan diantaranya adalah : 1) menentukan fase perkecambahan anggrek hitam, 2) menentukan medium dasar yang optimal bagi perkecambahan biji secara *in vitro* dan 3) menentukan kombinasi hormon NAA dan 2-ip yang optimal dalam multiplikasi tunas dari eksplan kecambah anggrek hitam.

Eksplan yang digunakan dalam menentukan fase perkecambahan anggrek hitam dan menentukan medium dasar yang optimal bagi perkecambahan biji secara *in vitro* adalah buah anggrek hitam yang telah masak berumur 4-5 bulan berwarna hijau tua kecoklatan (belum pecah) dan mengandung biji berwarna putih dengan embrio berwarna kekuningan (digunakan dalam penentuan fase perkecambahan anggrek hitam dan optimasi media kultur). Buah anggrek yang telah masak dipanen, dilakukan pra-sterilisasi dengan dicuci bersih dan disikat menggunakan sabun kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya sterilisasi dilakukan di LAF yaitu dengan mencelupkan buah anggrek dalam alkohol 70% atau spiritus dan dibakar di atas api (diulangi sebanyak 3 kali). Selanjutnya buah dipotong dan biji ditabur ke dalam masing-masing media kultur sebanyak 3 ulangan untuk masing-masing variasi medium. Media kultur yang

digunakan adalah Knudson C (KC), Vacin and Went (VW), New Phalaenopsis (NP), dan Murashige and Skoog (MS) dengan variasi perlakuan $\frac{1}{2}$ konsentrasi, konsentrasi penuh dan konsentrasi penuh dengan penambahan air kelapa 150 ml/L. Setelah penaburan, selanjutnya media berisi biji anggrek hitam tersebut diinkubasi pada suhu 21 °C dengan pemberian cahaya lampu TL (1000 flux). Pengamatan untuk mengetahui fase perkembangan embrio anggrek hitam dilakukan mulai dari minggu ke 1 sampai minggu ke 6 setelah penanaman dan dilakukan pengamatan secara periodik di bawah mikroskop. Untuk memudahkan pendataan maka dilakukan penentuan fase-fase pertumbuhan seperti yang dilakukan oleh Semiarti *et al.* (2007) terhadap *P. amabilis*. Fase-fase pertumbuhan dan perkembangan pada *C. pandurata* ini ditentukan mengikuti perubahan warna dan morfologi yang terjadi pada embrio anggrek hitam dan diamati secara periodik pada obyek yang sama. Sedangkan pada penentuan medium kultur yang menghasilkan perkecambah yang optimal pada biji anggrek hitam dilakukan melalui penghitungan persentase biji yang memasuki fase perkecambah (fase 3 dan 4) dan persentase biji yang mati pada minggu ke 6 setelah penanaman.

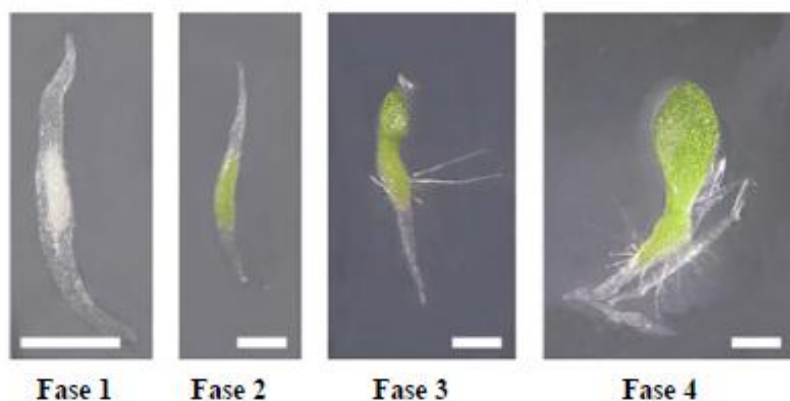
Selanjutnya pada tahap menentukan kombinasi hormon NAA dan 2-ip yang optimal dalam multiplikasi tunas digunakan eksplan kecambah anggrek hitam umur 5 bulan yang telah dikultur dalam media VW + ekstrak kentang 150 gr/L + air kelapa 150 ml/L+NAA 1 ppm. Eksplan kecambah anggrek hitam yang berumur 5 bulan dan dipotong-potong menggunakan skalpel steril menjadi beberapa bagian yaitu badan protokorm, tunas 1, tunas 2, tunas 3, daun 1 dan daun 2. Bagian-bagian tersebut selanjutnya ditanam ke dalam medium NP yang telah diberi variasi NAA dan 2-ip. Zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam penelitian ini adalah NAA (golongan auksin) dan 2-ip (golongan sitokinin) dengan variasi NAA (0 ; 0.15 μ M) dan 2-ip (0; 1; 3; 5; 7 μ M) dengan medium dasar NP. Sebelum media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰ C dan tekanan 15 psi selama 15 menit, pH media diatur dengan kisaran 5.6 – 6.3 menggunakan KOH dan HCl. Masing- masing variasi konsentrasi NAA dan 2-ip dilakukan sebanyak 5 ulangan. Proses penanaman dilakukan di dalam LAF. Pengamatan dilakukan selama 8 minggu, meliputi jumlah kalus dan tunas yang terbentuk dari keenam bagian kecambah yang dipotong tadi. Konsentrasi NAA dan 2-ip yang optimal adalah konsentrasi yang memicu multiplikasi tunas paling banyak.

Rancangan statistik yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Data selanjutnya diolah menggunakan *Analysis of Variance* untuk menunjukkan beda nyata.

Hasil dan Pembahasan

Penentuan fase perkecambahan anggrek hitam

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap perkecambahan biji anggrek hitam diperoleh hasil pada Gambar 1.



Gambar 1. Fase perkecambahan anggrek hitam setelah 6 minggu penanaman. Fase 1: biji anggrek hitam berumur 5 bulan tampak embrio berwarna putih membengkak (*yellowish embryo*), fase 2: embrio mulai membentuk klorofil (*greenish embryo*), fase 3: embrio sudah membentuk 2 sumbu bipolar dan *absorbing hair* (protokorm), fase 4: mulai terbentuk primordial daun. Skala : fase 1 (0.5 mm), fase 2 (0.5 mm), fase 3 (0.5 mm), dan fase 4 (1 mm).

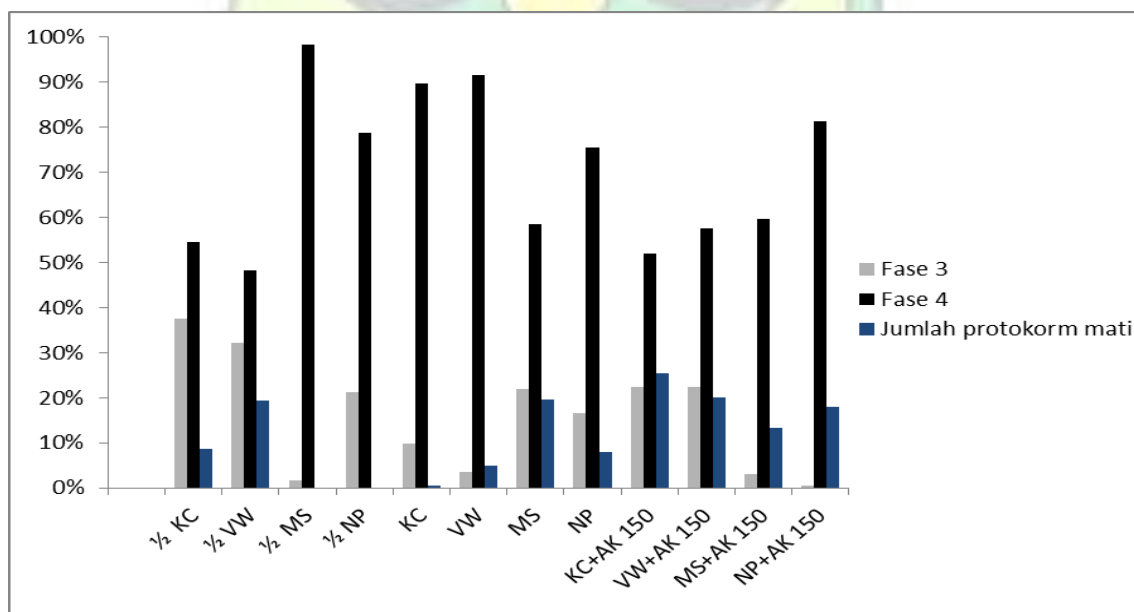
Fase perkembangan embrio selama perkecambahan biji secara *in vitro* dibagi menjadi 4 fase berdasarkan perubahan warna, ukuran dan morfologinya yaitu fase 1 (*yellowish embryo*), fase 2 (*greenish embryo*), fase 3 (protokorm membentuk sumbu bipolar dan fase 4 (protokorm dengan 1 daun). Berdasarkan pengamatan morfologi, perubahan warna embrio dari fase 1 menuju fase 2 terjadi selama 2 minggu setelah penanaman. Pada minggu ke 4 setelah penaburan, *greenish embryo* (fase 2) membentuk sumbu bipolar (protokorm) (fase 3). Pada minggu ke 6 setelah penanaman, protokorm berkembang menjadi primordia daun (fase 4).

Sebagai respon terhadap nutrien dalam medium kultur, terjadi proses perkecambahan yang ditandai dengan membengkaknya embrio dalam biji pada minggu ke 1 setelah penanaman. Keadaan ini disebut sebagai *swollen embryo* (fase 1). Pada perkembangan selanjutnya embrio dalam biji sudah mulai membentuk klorofil yang ditandai dengan perubahan warna kuning pada embrio menjadi hijau pada fase 2.

Kemudian terbentuk protokorm dengan sumbu bipolar yang ditandai dengan gelapnya sisi di sumbu bagian atas dan bagian yang lebih terang di sumbu bagian bawah serta mulai terbentuk *absorbing hair* di sumbu bagian bawah untuk membantu penyerapan air dan nutrient dalam medium selanjutnya protokorm mulai membentuk primordia daun (fase 4). Fase perkecambahan ini selanjutnya yang menjadi acuan dalam menentukan medium dasar yang optimal bagi perkecambahan biji angrek hitam secara *in vitro* melalui penghitungan presentase biji yang berkecambah.

Penentuan medium dasar yang optimal bagi perkecambahan biji secara *in vitro*

Berdasarkan kecepatan pertumbuhan biji (Gambar 2), dapat diketahui bahwa medium MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi merupakan medium yang optimal dalam meningkatkan kecepatan perkecambahan biji angrek hitam yaitu sebesar 98.41%. Hal ini ditunjukkan berdasarkan kecepatan perkecambahan biji yang dapat mencapai fase 4 (protokorm dengan satu daun) sebesar 98.41% dan yang masih berkecambah pada fase 3 sebesar 1.59% , sedangkan protokorm yang mati tidak ada.



Gambar 2. Persentase perkecambahan biji angrek hitam dalam berbagai medium setelah 6 minggu penanaman

Kecepatan perkecambahan yang tinggi juga dijumpai pada medium VW yaitu sebesar 91.68 % dapat berkecambah mencapai fase 4 (protokorm dengan satu daun) dan sebesar 3.47 % masih berada pada fase 3, sedangkan protokorm yang mati sebesar 4.86%.

Penggunaan medium kultur dengan komposisi dan konsentrasi yang tepat dan sesuai dengan tujuan yang ingin dicapai merupakan salah satu faktor penentu

keberhasilan dalam kultur *in vitro*. Berbagai jenis garam anorganik yang meliputi unsur makro, mikro, besi, vitamin, senyawa organik, dan senyawa organik kompleks merupakan komponen dasar penyusun medium yang berperan dalam mengoptimalkan pertumbuhan eksplan (Evans *et al.*, 2003). Adanya garam ammonium dalam medium dapat memacu pertumbuhan embrio meningkatkan kompleksitas morfologi, sedangkan garam nitrat dan nitrit berperan dalam memacu pertumbuhan protokorm anggrek (Raghavan, 1976). Selain unsur nitrogen yang membentuk komponen penyusun sel, jaringan, dan organ tanaman, unsur lain yang memiliki peranan penting adalah fosfor, sulfur, kalsium dan magnesium. Selama proses perkecambahan berlangsung, unsur-unsur ini sangat dibutuhkan biji agar dapat berkembang dan memasuki tahap perkembangan lebih lanjut.

Berdasarkan persentase jumlah rata-rata prokotorm pada fase 4 (Gambar 3) menunjukkan bahwa persentase tertinggi sebesar 98.41% dapat berkecambah sampai fase 4 adalah protokorm pada medium $\frac{1}{2}$ MS. Sehingga penentuan medium yang optimal untuk mendukung perkecambahan pada penelitian ini adalah medium MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi dilihat dari kecepatan perkecambahan biji mencapai fase 4 (protokorm dengan 1 daun) dan rendahnya persentase kematian protokorm. Hal ini menunjukkan bahwa medium MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi merupakan medium kultur yang sesuai dalam mempercepat perkecambahan biji karena memiliki kandungan unsur makro seperti nitrogen (NO_3^- dan NH_4^+) yang cukup untuk mendukung pertumbuhan embrio dalam biji anggrek hitam dibandingkan jenis medium lainnya. Selain itu, medium dengan konsentrasi penuh dan dengan penambahan senyawa organik seperti air kelapa belum mampu meningkatkan kecepatan perkecambahan biji anggrek hitam bahkan justru dapat menghambat perkecambahan biji anggrek di fase awal perkembangannya. Hal ini mungkin disebabkan karena biji anggrek hitam tidak terlalu membutuhkan nutrien yang kompleks dalam proses perkecambahannya. Hasil penelitian yang sama juga dilaporkan oleh Irene *et al.* (2009) yang memperoleh hasil media terbaik MS dan MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi dalam konservasi *in vitro* biji anggrek *Laelia speciosa*.

Penentuan kombinasi NAA dan 2-ip yang optimal dalam multiplikasi tunas

Pada percobaan multiplikasi tunas ini, pemilihan kombinasi NAA dan 2-ip didasarkan pada percobaan sebelumnya oleh Semiarti *et al.* (2007) pada *Phalaenopsis amabilis* L. Blume. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini berupa kecambah

anggrek hitam umur 5 bulan yang dipotong-potong untuk memisahkan antara badan protokorm, tunas 1, tunas 2, tunas 3, daun pertama, dan daun kedua. Jumlah tunas yang terbentuk dari tiap eksplan pada medium dengan variasi kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan 2-ip dapat dilihat pada Gambar 3.

Setelah 8 minggu pengamatan, diketahui bahwa perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh yang berbeda mempengaruhi jumlah pembentukan tunas yang berbeda pada tiap bagian eksplan. Pada kontrol (bagian badan protokorm, tunas maupun daun) menunjukkan pertumbuhan YLB (*Yellowish Bodies*), GSB (*Greenish Bodies*) serta tunas yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan kombinasi NAA dan 2-ip lainnya. Pertumbuhan YLB juga bahkan tidak terjadi pada kombinasi NAA dan 2-ip sebesar (0 ; 1) μM dan (0 ; 3) μM pada eksplan bagian badan protokorm dan tunas 1.

Perlakuan yang menunjukkan pertumbuhan YLB lebih besar dibandingkan dengan kontrol adalah perlakuan NAA dan 2-ip sebesar (0.15 ; 7) μM pada semua bagian eksplan. Pada pengamatan pertumbuhan GSB (*Greenish Bodies*), perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh yang memberikan pertumbuhan GSB lebih besar dibandingkan kontrol adalah NAA dan 2-ip sebesar (0.15 ; 7) μM pada semua bagian eksplan. Untuk pertumbuhan tunas, perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh yang memberikan pertumbuhan tunas lebih banyak dibandingkan kontrol adalah perlakuan NAA dan 2-ip sebesar (0.15 ; 3) μM pada semua bagian eksplan.

Bagian eksplan yang paling banyak membentuk tunas yaitu bagian tunas 2. Bagian eksplan yang paling sedikit membentuk tunas adalah badan protokorm. Taz and Zeiger (2003) menyatakan yang mempengaruhi proses fisiologi meliputi pertumbuhan, diferensiasi, dan perkembangan pada konsentrasi rendah. Perbedaan konsentrasi NAA (auksin) dan 2-ip (sitokinin) meskipun dalam jumlah sedikit tetapi sangat berpengaruh pada proses pertumbuhan dan perkembangan tunas. Pada penelitian ini induksi tunas yang terbentuk pada masing-masing bagian eksplan (dari kecambah anggrek hitam umur 5 bulan) dalam medium NP dengan kombinasi hormon NAA dan 2-ip adalah tunas adventif melalui jalur organogenesis.

Tabel 1. Jumlah rata-rata tunas *in vitro* yang terbentuk dalam medium kultur dengan kombinasi NAA dan 2-ip setelah 8 minggu pengamatan

Konsentrasi hormon (μM)		Ulangan	Badan protokorm			Tunas 1			Tunas 2			Tunas 3			Daun 1			Daun 2		
NA	2iP		YLB	GSB	Tunas	YLB	GSB	Tunas	YLB	GSB	Tunas	YLB	GSB	Tunas	YLB	GSB	Tunas	YLB	GSB	Tunas
0	0	5	0.00	0.00	0.00	2.50	1.00	18.50	4.50	1.50	7.50	2.00	1.50	3.00	0.00	0.00	4.50	0.00	0.00	2.00
0	1	5	0.00	0.00	0.00	0.00	9.00	11.50	11.00	9.00	23.00	0.00	14.00	7.50	3.00	0.00	17.00	0.00	0.00	0.00
0	3	5	0.00	0.00	0.00	0.00	3.33	7.67	2.33	3.67	25.33	5.00	3.67	12.00	2.67	6.33	13.67	2.00	4.00	5.00
0	5	5	2.00	0.00	0.00	12.00	5.00	12.00	3.00	4.00	34.00	1.00	4.00	4.00	7.00	2.00	15.00	9.00	6.00	1.00
0	7	5	2.00	3.50	1.00	9.00	2.00	16.00	4.00	6.33	21.00	6.00	3.00	19.00	3.33	5.00	14.33	7.67	4.00	13.00
0.15	0	5	2.00	0.00	0.00	8.00	1.50	11.50	3.00	9.00	23.00	6.50	3.00	8.00	0.50	1.50	3.00	1.50	0.00	2.00
0.15	1	5	4.00	0.00	0.00	5.33	7.50	17.67	12.00	4.67	16.00	7.33	6.50	17.67	12.33	9.00	12.00	5.00	18.00	13.00
0.15	3	5	7.00	1.00	10.50	11.00	6.00	12.00	8.50	9.00	61.00	3.00	9.50	33.50	11.50	11.00	25.00	15.50	11.00	11.50
0.15	5	5	3.00	1.00	0.00	16.50	10.00	18.50	12.00	19.50	43.50	10.50	9.50	23.00	11.00	10.00	16.50	10.00	14.50	10.50
0.15	7	5	3.67	2.00	2.00	11.33	6.67	11.67	23.33	15.50	23.67	9.00	22.33	24.00	14.33	14.33	15.67	8.67	10.33	9.33

Keterangan: Medium terbaik untuk induksi tunas : NP+NAA 0,15 μM + 2iP 3 μM

YLB : Yellowish Like Bodies

GSB : Greenish Bodies

Melalui hasil yang diperoleh (Tabel 1), membuktikan bahwa pada perbedaan konsentrasi yang cukup rendah yaitu variasi NAA (0 dan 0.15) μM serta variasi 2-ip (0, 1, 3, 5, 7) μM menunjukkan respon pembentukan tunas yang berbeda-beda pada semua bagian eksplan kecambah yang dipotong-potong (badan protokorm, tunas 1, tunas 2, tunas 3, daun 1, dan daun 3). Pada kontrol dimana tidak terdapat hormon eksogen yang ditambahkan, menunjukkan terbentuknya tunas dalam jumlah yang rendah. Hal ini disebabkan karena dalam kecambah sudah dihasilkan hormon endogen. Akan tetapi dalam kultur *in vitro*, tanpa penambahan hormon eksogen pertumbuhan eksplan tidak dapat berlangsung optimal (cenderung terhambat atau bahkan tidak tumbuh sama sekali). Sehingga untuk keperluan meningkatkan pembentukan tunas diperlukan kombinasi NAA dan 2-ip yang sesuai agar tunas yang terbentuk lebih optimal. Penggunaan auksin disertai sitokinin berperan dalam memacu pembelahan sel dan

morfogenesis. Pembentukan organ akan tercapai jika terdapat keseimbangan konsentrasi antara sitokinin dan auksin (Katuuk, 1989 ; Endang, G.L, 2011).

Pemberian auksin dalam konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan konsentrasi sitokinin cenderung menginduksi pembentukan akar sedangkan pemberian konsentrasi auksin yang lebih rendah dibandingkan sitokinin akan menginduksi pembentukan tunas pada eksplan. Selain itu pemberian auksin pada medium kultur jaringan memiliki kisaran konsentrasi yang lebih sempit karena jika auksin diberikan pada konsentrasi yang sangat tinggi dapat menyebabkan pertumbuhan eksplan yang abnormal dan menghambat pertumbuhan tanaman seperti pada pemberian 2,4-D (herbisida) yang merupakan golongan auksin sintetik pada medium kultur *in vitro* menyebabkan pertumbuhan yang abnormal pada eksplan jika diberikan pada konsentrasi yang tinggi (Evans *et al.*, 2003 ; Endang, G.L, 2011).

Dari hasil diperoleh bahwa pembentukan tunas meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi sitokinin terhadap auksin dan peningkatan pembentukan tunas ini berhenti pada konsentrasi NAA 0.15 μM dan 2-ip 3 μM . Hal ini membuktikan bahwa hormon sitokinin aktif mempengaruhi morfogenesis dan pembelahan sel dalam konsentrasi yang relatif rendah sedangkan dalam konsentrasi yang lebih besar cenderung berkurang kemampuan fisiologisnya terhadap pembentukan tunas.

Kesimpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa medium MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi adalah medium yang optimal dalam meningkatkan kecepatan perkecambahan biji anggrek hitam yaitu sebesar 98.41% biji yang berkecambah mencapai fase 4 (protokorm dengan 1 daun) dan yang masih berkecambah pada fase 3 (protokorm) sebesar 1.59%, sedangkan protokorm yang mati tidak ada. Selain itu kombinasi konsentrasi ZPT NAA 0,15 μM dan 2-iP 3 μM adalah konsentrasi yang optimal untuk menginduksi multiplikasi tunas pada kecambah anggrek hitam umur 5 bulan.

Daftar Pustaka

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA. Pp.550-557

- Chawla, H.S. 2000. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers, Inc. USA. Pp :1-15.
- Endang, G.L. 2011. Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 7 (1): 63-68.
- Evans, D.E., Coleman, J.O.D., and Kearns, A. 2003. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers. London. Pp: 1- 26.
- Handoyo, F. and R. Prasetya. 2006. Native Orchids of Indonesia. Indonesian Orchid Society of Jakarta. Pp: 244
- Hartati, S. 2010. Pengaruh macam ekstrak bahan organik dan zpt terhadap pertumbuhan plantlet anggrek hasil persilangan pada media kultur. *Jurnal Caraka Tani XXV* : 101-105.
- Irawati. 2002. Pelestarian Jenis Anggrek di Indonesia. Seminar Anggrek Indonesia 2002 di Yogyakarta. Hal 34-44.
- Irene, A.D., Ken, O., Carlos, G.A., and Rafael, S.G. 2009. In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* ,99 : 335-343.
- Katuuk, J.R.P.1989. Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropropagasi Tanaman. Depdikbud Dirjen Dikti, Jakarta. Hal 1-100.
- Luan, V.Q., Thien, N.Q., Khiem, D.V., and Nhut, D.T. 2006. In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchid. *Proceeding of International Workshop of Biotechnology in Agriculture*, Ho Chi Minh City, October 20-21.
- Raghavan, V. 1976. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. Academic Press. London.
- Semiarti, E.A., Indrianto, A. Purwantoro, S. Isminingsih, N. Suseno, T. Ishikawa, Y. Yoshioka, Y. Machida, and C. Machida. 2007. Agrobacterium Mediated Transformation Of The Wild Orchid Species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnology* 24, 265-272
- Silalahi, M., J. Lumbangaol, dan Irni. 2008. The Effect of Adding Benzyl Amino Purine BAP and Naphtalene Acetic Acid NAA to The Growth of Black Orchid *Coelogyne pandurata* Lindl. by Using In Vitro Technique. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II 2008 Universitas Lampung, 17-18 November 2008.
- Sinha, P and Roy, S.K. 2004. Regeneration of an Indigenous Orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. Through In vitro Culture. *Plant Tissue Culture Journal* Vol. 14 No.1: 55- 61.
- Taiz, L. and Zeiger. 2003. *Plant Physiology*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. Pp : 108-113.
- Untari, R., dan D.W. Puspitaningtyas. 2006. Pengaruh Bahan Organik dan NAA terhadap Pertumbuhan Anggrek Hitam *Coelogyne pandurata* Lindl. dalam Kultur *In Vitro*. *Biodiversitas Vol.7 No.3*; 344-348.
- Widiastoety, D dan Purbadi. 2003. Pengaruh bubuk ubi kayu dan ubi jalar terhadap pertumbuhan plantlet anggrek *dendrobium*. *J Hort*, 13 (1) : 1-5