

PERBANYAKAN ANGGREK SPESIES *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J.Smith MELALUI PROLIFERASI TUNAS ADVENTIF SECARA *IN VITRO*

Propagation Species Orchid of Paphiopedilum glaucophyllum J.J.Smith through Adventitious Shoot Proliferation via *In Vitro*

Tubagus Kiki Kawakibi Azmi¹⁾, Ni Made Armini Wiendi²⁾

¹⁾Mahasiswa Departemen Agronomi dan Hortikultura Faperta IPB, A24051953

²⁾Staf Pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura

Abstract

This research was studied to determine the effects of BAP and medium on adventitious Shoot proliferation of *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J.Smith *in vitro*. Plantlet 1 year 9 months old from seed germination *in vitro* on modified Knudson C medium used as an explant. This research was arranged in a Completely Randomized Design consisted of two factors using factorial combination with three replications. The first factor was different concentration of BAP, consist of 1 and 2 mg/l (All combination medium were added with 0.5 mg/l 2,4-D). The second factor was different concentration of macro and micro nutrient from MS (Murashige and Skoog) and KC (Knudson C) medium, consist of 1, $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, and $\frac{1}{4}$ concentration of macro and micro nutrient. The result showed plantlets failed to respond to the adventitious shoot proliferation in all combination medium within 16 weeks. Concentration of medium affected to leaves and root growth, the optimum growth was achieved at $\frac{3}{4}$ concentration of macro and micro nutrient from KC medium, combined with 2 mg/l BAP for leaves growth and 1 mg/l BAP for root growth. BAP affected to induction callus, the highest percentage of callus was achieved at 1 mg/l BAP (48.61 %).

Keywords: *Paphiopedilum*, BAP, medium, proliferation.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Paphiopedilum glaucophyllum J.J. Smith adalah salah satu spesies dari genus *Paphiopedilum* dalam famili Orchidaceae. Anggrek tersebut memiliki tipe pertumbuhan simpodial. Secara umum tanaman dewasa yang telah selesai berbunga akan menghasilkan tunas anakan (*offshoot*) dari bagian pangkal batang bawah. Perbanyakannya secara konvensional melalui pemisahan anakan, tetapi perlu waktu yang cukup lama. Birk (1983) mengemukakan bahwa dalam perbanyakannya *Paphiopedilum* sp. melalui pemisahan tunas anakan harus memperhatikan kondisi pertumbuhannya, yaitu telah memiliki akar yang cukup untuk mendukung pertumbuhannya. Kondisi tersebut dapat dicapai dalam waktu dua sampai tiga tahun setelah muncul mata tunas anakan.

Paphiopedilum glaucophyllum yang berasal dari pulau Jawa ini cukup diminati penggemar anggrek, namun proses perbanyakannya jarang dilakukan petani anggrek. Hampir seluruh *Paphiopedilum glaucophyllum* yang dipasarkan di Indonesia merupakan tanaman yang berasal dari hutan. Habitatnya yang sangat terbatas dan pertumbuhannya yang lambat menyebabkan anggrek tersebut mudah hilang dari habitat aslinya, jika perambahan untuk tujuan komersial tetap dilakukan. Cribb (1997) memperkirakan 25 dari 60 spesies *Paphiopedilum* yang terdapat di alam liar sangat terancam keberadaannya, dengan penyebab utamanya adalah perambahan untuk tujuan komersial. Perdagangan internasional terhadap spesies liar *Paphiopedilum* telah dibatasi dengan menempatkan seluruh spesiesnya dalam Appendix I dari CITES (*Convention in Trade on Endangered Species of Flora and Fauna*).

Metode perbanyakannya tanaman secara *in vitro* melalui proliferasi tunas adventif merupakan cara untuk mendapatkan tanaman dalam jumlah besar dalam waktu singkat dan efisien. Perbanyakannya melalui tunas aksilar memiliki peluang yang lebih rendah untuk dapat menghasilkan tunas dalam jumlah besar. Metode tersebut dapat dijadikan jalan keluar yang tepat untuk mengatasi masalah perbanyakannya *Paphiopedilum glaucophyllum*. Pengecambahan biji melalui metode *in vitro* digunakan dalam perbanyakannya *Paphiopedilum*, terutama untuk menghasilkan hibrida. Cara lain dalam perbanyakannya *in vitro* *Paphiopedilum* adalah menggunakan jaringan tanaman sebagai sumber eksplan. Ting-Yu *et al* (2002) menggunakan ruas batang dari planlet *Paphiopedilum philippinense* (hibrida PH59 dan PH60) sebagai eksplan yang diregenerasi secara *in vitro* menjadi tanaman lengkap pada media MS (Murashige dan Skoog) setengah konsentrasi hara makro dan mikro yang ditambah TDZ dan 2,4-D.

Sitokinin dan auksin adalah zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sangat diperlukan untuk mengarahkan pertumbuhan pada media kultur *in vitro* (Chawla, 2002). BAP (dikombinasikan dengan 2,4-D) dan dua jenis media (MS dan KC) digunakan

sebagai perlakuan untuk menghasilkan proliferasi tunas adventif dari planlet *Paphiopedilum glaucophyllum*.

Tujuan

1. Mempelajari pengaruh jenis media dan BAP terhadap daya proliferasi tunas adventif dari planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* secara *in vitro*.
2. Mendapatkan komposisi media yang optimal untuk perbanyakannya *Paphiopedilum glaucophyllum* melalui induksi proliferasi tunas adventif secara *in vitro*.

Hipotesis

1. Diduga jenis media berpengaruh nyata terhadap daya proliferasi tunas adventif *Paphiopedilum glaucophyllum* secara *in vitro*.
2. Diduga zat pengatur tumbuh BAP berpengaruh nyata terhadap daya proliferasi tunas adventif *Paphiopedilum glaucophyllum* secara *in vitro*.
3. Diduga terdapat interaksi yang nyata antara jenis media dan konsentrasi BAP dalam menginduksi daya proliferasi tunas adventif *Paphiopedilum glaucophyllum* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, mulai bulan Juni sampai Oktober 2009.

Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan adalah planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* berumur 1 tahun 9 bulan yang diperoleh dari Pusat Konservasi Tumbuhan (PKT) Kebun Raya Bogor. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah BAP dan 2,4-D, dengan media dasar dari komposisi MS (Murashige dan Skoog) dan KC (Knudson C). Bahan yang lain adalah aquades sebagai pelarut media dasar MS dan KC, agar sebagai pematat media, dan alkohol 70 % sebagai sterilan alat tanam.

Alat-alat yang dipakai adalah botol kultur dengan volume 300 ml, autoklaf, magnetik stirrer, gelas ukur, labu erlenmeyer, laminar air flow cabinet (LAFC), pisau scalpel, petridish, lampu bunsen, dan pinset.

Metodologi

Percobaan ini disain menggunakan Rancangan Acak Lengkap dan rancangan perlakuan yang disusun secara Faktorial dengan dua faktor perlakuan. Faktor pertama adalah media, yaitu dua jenis media dasar (media MS dan KC) yang terdiri dari empat taraf konsentrasi hara makro dan mikro, yaitu $\frac{1}{4}$ konsentrasi, $\frac{1}{2}$ konsentrasi, $\frac{3}{4}$ konsentrasi, dan 1 konsentrasi. Faktor kedua

adalah BAP yang terdiri dari dua taraf konsentrasi, yaitu 1 mg/l dan 2 mg/l. Zat pengatur tumbuh lain yang diberikan ke dalam setiap media adalah 0,5 mg/l 2,4-D. Pada penelitian ini terdapat enam belas kombinasi perlakuan yang disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Media (MS dan KC) dan BAP

| No. | Jenis media | Konsentrasi Hara Makro dan Mikro | Zat Pengatur Tumbuh |
|-----|-------------|----------------------------------|-----------------------------|
| 1 | MS 1 | MS ¼ Konsentrasi | 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 2 | MS 2 | MS ½ Konsentrasi | 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 3 | MS 3 | MS ¾ Konsentrasi | 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 4 | MS 4 | MS 1 Konsentrasi | 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 5 | MS 5 | MS ¼ Konsentrasi | 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 6 | MS 6 | MS ½ Konsentrasi | 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 7 | MS 7 | MS ¾ Konsentrasi | 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 8 | MS 8 | MS 1 Konsentrasi | 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 9 | KC 1 | KC ¼ Konsentrasi | 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 10 | KC 2 | KC ½ Konsentrasi | 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 11 | KC 3 | KC ¾ Konsentrasi | 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 12 | KC 4 | KC 1 Konsentrasi | 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 13 | KC 5 | KC ¼ Konsentrasi | 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 14 | KC 6 | KC ½ Konsentrasi | 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 15 | KC 7 | KC ¾ Konsentrasi | 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |
| 16 | KC 8 | KC 1 Konsentrasi | 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4 D |

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Umum

Selama percobaan berlangsung, faktor yang menjadi kendala utama adalah kontaminasi yang dapat menyebabkan planlet mati. Kontaminasi disebabkan oleh cendawan dan bakteri, akan tetapi penyebab utamanya adalah cendawan dan sangat sulit untuk mensterilkan kembali planlet yang telah terkontaminasi oleh cendawan. Kontaminasi mulai terlihat pada 2 MST. Periode planlet terkontaminasi cukup lama, pada 7 MST masih terdapat beberapa botol planlet yang mengalami kontaminasi, akan tetapi frekuensinya sudah menurun, hanya 1 - 3 botol planlet.

Jumlah Planlet Mati dan Kontaminasi

Planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* memiliki akar yang setiap permukaannya ditutupi oleh rambut halus, hal tersebut menimbulkan kesulitan sterilisasi jika terjadi kontaminasi pada planlet. Daya tahan planlet terhadap sterilan seperti Sodium hypoclorit sangat rendah, planlet yang disterilisasi dengan Sodium hypoclorit 5 % selama 5 menit akan menjadi coklat setelah beberapa hari ditanam dan akhirnya mati. Subkultur pada media baru dilakukan pada saat terjadi kontaminasi hanya pada media saja, sedangkan planlet masih dalam kondisi steril. Hal tersebut dapat mengurangi jumlah planlet mati akibat kontaminasi. Jumlah planlet mati adalah 36 (25 %) dari 144 jumlah planlet keseluruhan.

Jumlah Tunas

Perlakuan media (MS dan KC) dan sitokinin jenis BAP tidak menunjukkan pengaruhnya terhadap proliferasi tunas adventif dari planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* selama 16 MST. Semua planlet dari setiap kombinasi perlakuan tidak menghasilkan tunas baru. Jumlah tunas tetap pada seluruh planlet, yaitu satu tunas per planlet. Menurut Wiendi *et al* (1992), secara umum pembentukan tunas secara *in vitro* baik melalui morfogenesis langsung ataupun tidak langsung sangat tergantung pada jenis dan konsentrasi yang tepat dari senyawa organik, inorganik, dan zat pengatur tumbuh (ZPT).

Chen dan Piluek (1995) melaporkan bahwa TDZ lebih efektif dalam mendorong pembentukan tunas pada *Phalaenopsis* hibrida dibandingkan BAP selama 8 MST. Pengaruh yang sama dari TDZ dilaporkan oleh Jen Tsung dan Wei Chin (2000), dimana 1 mg/l TDZ mampu menginduksi tunas dari eksplan kalus yang berasal dari tangkai bunga *Oncidium Sweet Sugar* selama 8 MST. Le *et al* (1999) menemukan pengaruh TDZ dalam mendorong pembentukan tunas eksplan potongan melintang

batang (*transverse thin cell layer*) dari *Rhynchosytilis gigantea* meningkat dengan mengkombinasikannya dengan BAP selama 4 MST.

Jumlah Daun

Pengaruh perlakuan terhadap variabel pengamatan jumlah total helai daun dari planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* secara nyata ditunjukkan dari perlakuan media secara tunggal saat umur planlet 9 MST sampai diakhir pengamatan (16 MST). BAP dan interaksinya dengan media tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap jumlah total helai daun.

Perlakuan media berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan daun dari planlet *Paphiopedilum glaucophyllum*. Media KC pada ¾ konsentrasi hara makro dan mikro menunjukkan jumlah total helai daun tertinggi, yaitu 6.3 helai daun per planlet (Tabel 2). Jumlah total helai daun per planlet terendah adalah dari media MS pada 1 konsentrasi hara makro dan mikro dan KC pada ¼ konsentrasi hara makro dan mikro, yaitu 4.9 helai daun per planlet.

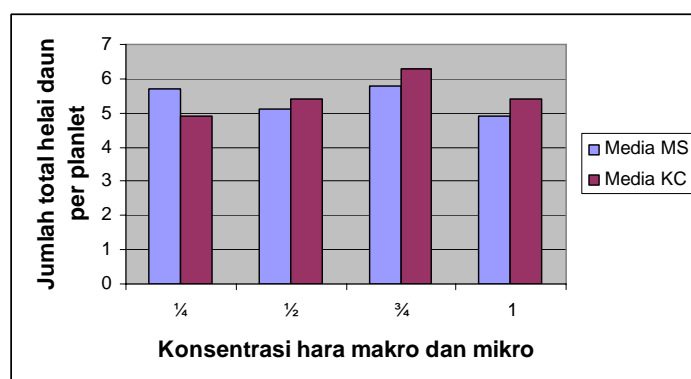
Tabel 2. Pengaruh Konsentrasi Hara Makro dan Mikro Media (MS dan KC) terhadap Jumlah Total Helai Daun *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In vitro*

| Konsentrasi hara makro dan mikro | Umur Planlet (MST) | | | |
|----------------------------------|--------------------|--------|--------|--------|
| | 10 MST | 12 MST | 14 MST | 16 MST |
| Media MS | | | | |
| ¼ | 4.9 ab | 4.9ab | 5.6 ab | 5.7 ab |
| ½ | 4.3 b | 4.3 b | 4.9 b | 5.1 b |
| ¾ | 5.4 ab | 5.4 ab | 5.7ab | 5.8 ab |
| 1 | 4.4 b | 4.4 b | 4.7 b | 4.9 b |
| Media KC | | | | |
| ¼ | 4.3 b | 4.3 b | 4.8 b | 4.9 b |
| ½ | 4.8 ab | 4.8 ab | 5.3 ab | 5.4 ab |
| ¾ | 5.9 a | 5.9 a | 6.3 a | 6.3 a |
| 1 | 4.4 b | 4.4 b | 5.2 b | 5.4 ab |
| Uji F | * | * | * | * |
| KK (%) | 17.73 | 17.57 | 14.91 | 14.36 |

Keterangan : Nilai yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata dengan uji lanjut DMRT pada $\alpha = 5\%$.

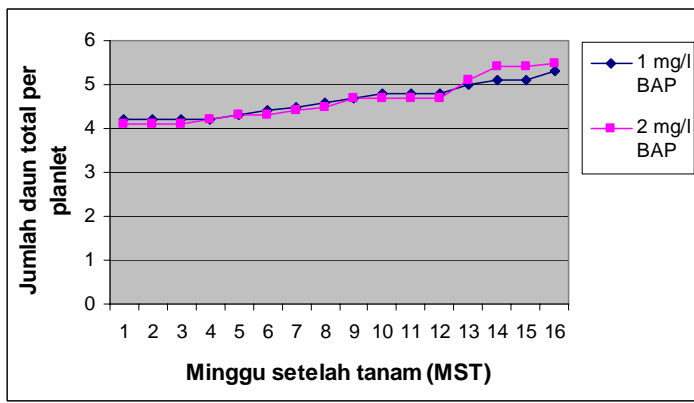
* = Berbeda nyata pada uji F, $\alpha = 5\%$

Konsentrasi hara makro dan mikro pada kedua jenis media berpengaruh terhadap pertumbuhan daun planlet yang dapat dilihat dari jumlah total helai daun yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi media. Pertumbuhan daun optimum diperoleh pada ¾ konsentrasi hara makro dan mikro (Gambar 1).



Gambar 1. Pengaruh Konsentrasi Media (MS dan KC) terhadap Pertumbuhan Daun Planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro* pada 16 MST

BAP pada konsentrasi 1 mg/l dan 2 mg/l tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata terhadap pertumbuhan daun planlet *Paphiopedilum glaucophyllum*. Jumlah total helai daun yang dihasilkan terlihat tidak berbeda secara signifikan pada dua konsentrasi BAP yang digunakan (Gambar 2).



Gambar 2. Pengaruh Dua Taraf BAP terhadap Pertumbuhan Daun Planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro*

Jumlah total helai daun tertinggi pada 16 MST ditunjukkan oleh planlet pada media KC $\frac{3}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro ditambahkan 2 mg/l BAP (KC 6) (Tabel 3). Wiendi *et al* (1992) melaporkan bahwa morfogenesis daun dan akar dipengaruhi oleh perbandingan (nisbah) zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin dan sitokinin. Perbandingan auksin dan sitokinin yang tinggi akan mendorong morfogenesis akar, sedangkan perbandingan sitokinin dan auksin yang tinggi akan mendorong pembentukan tunas. Walaupun demikian, secara umum morfogenesis sangat tergantung pada jenis dan konsentrasi yang tepat dari senyawa organik, in-organik, dan zat pengatur tumbuh.

Tabel 3. Pengaruh Perlakuan terhadap Jumlah Total Helai Daun Planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro*

| Perlakuan | Jumlah Total Helai Daun | | | | | | | |
|-----------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Minggu setelah tanam (MST) | | | | | | | |
| | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
| MS 1 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.2 | 4.2 | 5.0 | 5.0 |
| MS 2 | 4.5 | 4.5 | 4.7 | 4.7 | 4.8 | 4.8 | 5.1 | 5.3 |
| MS 3 | 4.2 | 4.2 | 4.8 | 5.1 | 5.2 | 5.2 | 5.3 | 5.4 |
| MS 4 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 4.0 | 4.4 | 4.4 | 4.5 | 4.9 |
| MS 5 | 4.9 | 4.9 | 5.0 | 5.3 | 5.5 | 5.5 | 6.2 | 6.4 |
| MS 6 | 3.8 | 3.8 | 3.8 | 3.8 | 3.8 | 3.8 | 4.7 | 4.8 |
| MS 7 | 5.0 | 5.0 | 5.2 | 5.4 | 5.5 | 5.5 | 6.1 | 6.2 |
| MS 8 | 3.8 | 3.8 | 4.2 | 4.3 | 4.3 | 4.4 | 4.9 | 4.9 |
| KC 1 | 4.4 | 4.4 | 4.5 | 4.9 | 5.0 | 5.0 | 5.2 | 5.3 |
| KC 2 | 4.2 | 4.2 | 4.4 | 4.8 | 5.0 | 5.0 | 5.3 | 5.4 |
| KC 3 | 4.3 | 4.3 | 4.7 | 5.1 | 5.7 | 5.7 | 6.1 | 6.1 |
| KC 4 | 3.9 | 3.9 | 4.1 | 4.3 | 4.5 | 4.5 | 4.9 | 5.1 |
| KC 5 | 3.3 | 3.3 | 3.3 | 3.5 | 3.7 | 3.7 | 4.4 | 4.5 |
| KC 6 | 4.0 | 4.0 | 4.4 | 4.5 | 4.7 | 4.7 | 5.3 | 5.4 |
| KC 7 | 5.4 | 5.4 | 5.8 | 5.8 | 6.1 | 6.1 | 6.4 | 6.4 |
| KC 8 | 3.2 | 3.2 | 3.2 | 3.8 | 4.2 | 4.2 | 5.4 | 5.8 |
| Uji F | tn | tn | tn | tn | tn | tn | tn | tn |
| KK (%) | 20.55 | 20.47 | 20.62 | 19.23 | 17.73 | 17.57 | 14.91 | 14.36 |

Keterangan : tn = Tidak berbeda nyata pada uji F dengan $\alpha = 5\%$

Jumlah Akar

Pengaruh perlakuan terhadap jumlah total akar planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* secara nyata ditunjukkan dari perlakuan media secara tunggal saat umur planlet 6 sampai 12 MST (Tabel 4). BAP dan interaksinya dengan media (MS dan KC) tidak berbeda nyata sampai 16 MST.

Diantara dua jenis media (MS dan KC) pada empat taraf konsentrasi hara makro dan mikro, media KC $\frac{3}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro menghasilkan jumlah total akar tertinggi sampai 16 MST, yaitu 5.5 akar per planlet. Jumlah total akar terendah diperlihatkan oleh planlet pada media MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi hara makro dan mikro dan KC $\frac{1}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro, masing-masing adalah 4.1 akar per planlet. Media KC diduga memiliki pengaruh yang baik untuk pertumbuhan akar pada $\frac{3}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro.

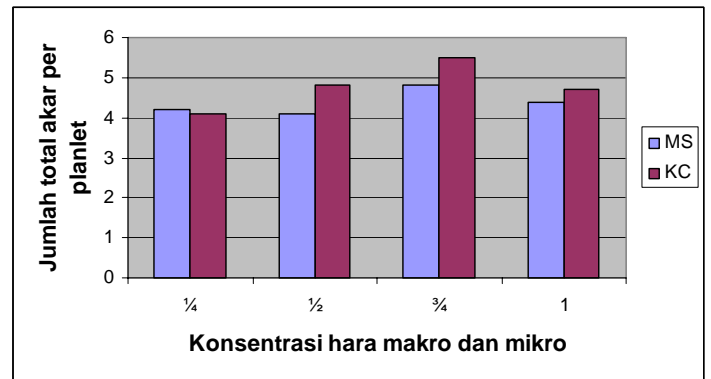
Tabel 4. Pengaruh Konsentrasi Hara Makro dan Mikro Media (MS dan KC) terhadap Jumlah Total Akar Planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro*

| Konsentrasi hara makro dan mikro | Umur Planlet | | | |
|----------------------------------|--------------|--------|--------|--------|
| | 6 MST | 8 MST | 10 MST | 12 MST |
| Media MS | | | | |
| $\frac{1}{4}$ | 3.4 b | 3.8 b | 4.1 b | 4.1 b |
| $\frac{1}{2}$ | 3.4 b | 3.8 b | 3.8 b | 3.9 b |
| $\frac{3}{4}$ | 4.2 ab | 4.7 ab | 4.8 ab | 4.8 ab |
| 1 | 3.7 b | 3.9 b | 3.9 b | 3.9 b |
| Media KC | | | | |
| $\frac{1}{4}$ | 3.2 b | 3.8 b | 3.9 b | 3.9 b |
| $\frac{1}{2}$ | 3.9 ab | 4.7 ab | 4.7 ab | 4.8 ab |
| $\frac{3}{4}$ | 4.8 a | 5.3 a | 5.4 a | 5.4 a |
| 1 | 4.1 ab | 4.3 ab | 4.5 ab | 4.5 ab |
| Uji F | * | * | * | * |
| KK (%) | 20.39 | 18.62 | 18.85 | 19.33 |

Keterangan : Nilai yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata dengan uji lanjut DMRT pada $\alpha = 5\%$.

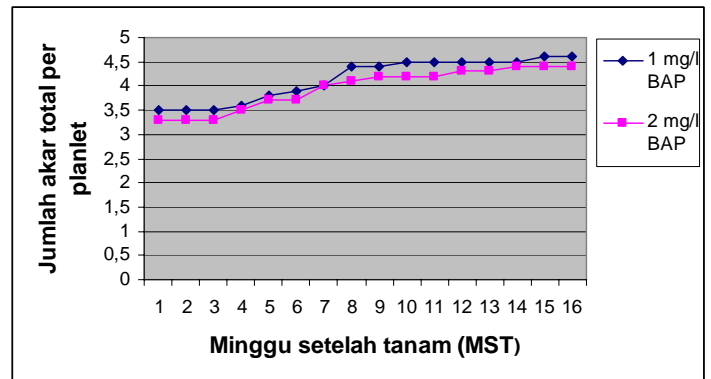
* = Berbeda nyata pada uji F, $\alpha = 5\%$

Pertumbuhan akar terhambat pada media dengan konsentrasi hara makro dan mikro yang lebih rendah dari $\frac{3}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro (Gambar 3).



Gambar 3. Pengaruh Konsentrasi Media (MS dan KC) terhadap Pertumbuhan Akar Planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro* pada 16 MST

Penggunaan BAP pada konsentrasi 1 mg/l dan 2 mg/l tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata terhadap pertumbuhan akar (Gambar 4). Jumlah total akar yang dihasilkan pada dua taraf BAP tersebut tidak berbeda secara signifikan.



Gambar 4. Pengaruh Dua Taraf BAP terhadap Pertumbuhan Akar Planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro*

Pengaruh interaksi antara media (MS dan KC) dan BAP tidak berbeda nyata terhadap pertumbuhan akar. Pertumbuhan akar pada media KC $\frac{3}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro yang ditambahkan 1 mg/l BAP (KC 2) relatif lebih cepat diantara perlakuan yang lain. Hal tersebut dapat dilihat dari jumlah total akar yang dihasilkan lebih tinggi pada 16 MST, yaitu 5.6 akar per planlet (Tabel 5).

Tabel 5. Pengaruh Perlakuan terhadap Jumlah Akar Total Planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro*

| Perlakuan | Jumlah Total Akar | | | | | | | |
|-----------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Minggu setelah tanam (MST) | | | | | | | |
| | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
| MS 1 | 2.6 | 2.7 | 3.0 | 3.5 | 3.8 | 4.0 | 4.0 | 4.1 |
| MS 2 | 3.2 | 3.3 | 3.7 | 4.2 | 4.2 | 4.3 | 4.3 | 4.3 |
| MS 3 | 3.6 | 3.8 | 4.1 | 4.4 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 |
| MS 4 | 3.3 | 3.7 | 3.8 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.2 | 4.3 |
| MS 5 | 3.6 | 3.7 | 3.8 | 4.1 | 4.2 | 4.2 | 4.2 | 4.2 |
| MS 6 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.4 | 3.4 | 3.6 | 3.8 | 3.8 |
| MS 7 | 3.7 | 4.0 | 4.2 | 4.8 | 5.0 | 5.0 | 5.1 | 5.1 |
| MS 8 | 3.1 | 3.3 | 3.5 | 3.6 | 3.8 | 3.8 | 4.3 | 4.4 |
| KC 1 | 3.2 | 3.2 | 3.4 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.2 | 4.4 |
| KC 2 | 4.2 | 4.2 | 4.2 | 5.2 | 5.2 | 5.2 | 5.3 | 5.3 |
| KC 3 | 3.7 | 3.8 | 4.6 | 5.3 | 5.5 | 5.5 | 5.6 | 5.6 |
| KC 4 | 3.8 | 4.0 | 4.1 | 4.3 | 4.4 | 4.4 | 4.4 | 4.4 |
| KC 5 | 2.7 | 2.8 | 3.0 | 3.5 | 3.6 | 3.6 | 3.6 | 3.6 |
| KC 6 | 3.1 | 3.5 | 3.6 | 4.1 | 4.1 | 4.3 | 4.3 | 4.3 |
| KC 7 | 4.3 | 4.4 | 4.8 | 5.2 | 5.2 | 5.3 | 5.3 | 5.3 |
| KC 8 | 3.0 | 3.2 | 4.0 | 4.3 | 4.5 | 4.5 | 4.8 | 4.8 |
| Uji F | tn | tn | tn | tn | tn | tn | tn | tn |
| KK (%) | 25.05 | 23.66 | 20.39 | 18.62 | 18.85 | 19.33 | 19.67 | 19.21 |

Keterangan : tn = Tidak berbeda nyata pada uji F dengan $\alpha = 5\%$

Jumlah Planlet Berkalus

Pembentukan kalus diawali dengan pembesaran bagian ujung akar yang mulai terlihat pada 6 MST. Kalus mulai terlihat pada 9 MST. Perlakuan BAP (1 mg/l dan 2 mg/l) menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap pembentukan kalus dari planlet *Paphiopedilum glaucophyllum*. Perlakuan media dan interaksi antara media dan BAP tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap pembentukan kalus. Sebanyak 38,24 % planlet menghasilkan kalus dari seluruh planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* dalam percobaan.

Tabel 6. Pengaruh Konsentrasi Media terhadap Jumlah Planlet Berkalus *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro* pada 16 MST

| Konsentrasi hara makro dan mikro | Jumlah planlet berkalus (%) |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Media MS | |
| 1/4 | 22.22 |
| 1/2 | 44.45 |
| 3/4 | 55.56 |
| 1 | 27.78 |
| Media KC | |
| 1/4 | 33.33 |
| 1/2 | 55.56 |
| 3/4 | 22.22 |
| 1 | 44.45 |
| Uji F | tn |
| KK (%) | 68.4 |

Keterangan : tn = Tidak berbeda nyata pada uji F dengan $\alpha = 5\%$

KK merupakan data hasil transformasi dengan rumus $\sqrt{x+0.5}$

Media MS dan KC pada empat taraf konsentrasi (1, 3/4, 1/2, 1/4 konsentrasi hara makro dan mikro) tidak berbeda nyata terhadap jumlah planlet berkalus *Paphiopedilum glaucophyllum*. Diantara dua jenis media tersebut, media MS pada 3/4 konsentrasi hara makro dan mikro dan media KC pada 1/2 konsentrasi hara makro dan mikro menghasilkan jumlah planlet berkalus yang lebih tinggi diantara konsentrasi hara makro dan mikro yang lain pada kedua jenis media, yaitu 55.56 % planlet berkalus (Tabel 6). Pada media MS, pembentukan kalus optimum diperoleh pada 3/4 konsentrasi hara makro dan mikro, pada konsentrasi hara makro dan mikro yang lebih tinggi dan lebih rendah dari konsentrasi tersebut menyebabkan pembentukan kalus terhambat. Pada media KC, pembentukan kalus optimum diperoleh pada 1/2 konsentrasi hara makro dan mikro.

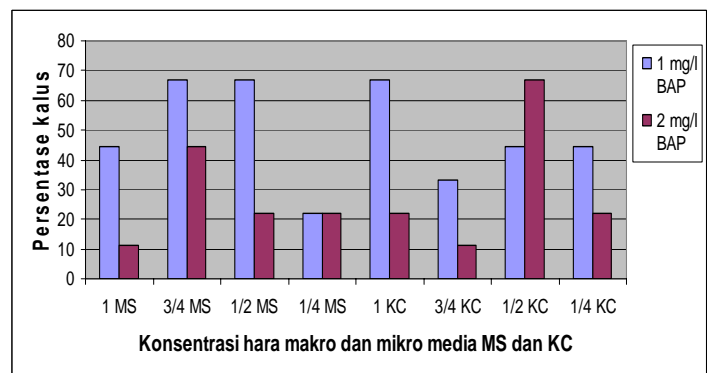
Tabel 7. Pengaruh Dua Taraf BAP terhadap Jumlah Planlet Berkalus *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J. Smith secara *In Vitro* pada 16 MST

| Konsentrasi BAP | Jumlah planlet berkalus (%) |
|-----------------|-----------------------------|
| 1 mg/l | 48.61 |
| 2 mg/l | 27.78 |
| Uji F | * |
| KK (%) | 68.4 |

Keterangan : * = Berbeda nyata pada uji F dengan $\alpha = 5\%$

KK merupakan data hasil transformasi dengan rumus $\sqrt{x+0.5}$

Pembentukan kalus terjadi akibat jaringan dari bagian ujung akar planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* mengalami dediferensiasi, yang secara nyata dipengaruhi oleh BAP. Jumlah planlet berkalus tertinggi diperoleh pada perlakuan 1 mg/l BAP, yaitu 48.61 % (Tabel 7). Menurut Chawla (2002), fenomena dimana sel dewasa kembali pada keadaan meristematik dan membentuk jaringan kalus yang belum terdiferensiasi disebut sebagai dediferensiasi. Menurut Wiendi *et al* (1992), kemampuan suatu jaringan dalam membentuk kalus dan laju pertumbuhan kalus tergantung pada media, zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan dan faktor lingkungan lainnya. Roy dan Banerjee (2003) melaporkan pengaruh yang tinggi dari penggunaan 1 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0.5 mg/l NAA terhadap frekuensi pembentukan kalus eksplan pucuk *Dendrobium fimbriatum* var. *oculatum* pada modifikasi media KC selama 8 MST.



Gambar 5. Grafik Batang Jumlah Planlet Berkalus *Paphiopedilum glaucophyllum* terhadap Kombinasi Perlakuan Media (MS dan KC) dan BAP pada 16 MST

Interaksi antara perlakuan media (MS dan KC) dan BAP tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap pembentukan kalus dari planlet *Paphiopedilum glaucophyllum*. Pembentukan kalus terhambat pada media yang ditambahkan 2 mg/l BAP. Peningkatan jumlah planlet berkalus dari media yang ditambahkan 1 mg/l BAP ke media yang ditambahkan 2 mg/l BAP hanya terjadi pada media KC 1/2 konsentrasi hara makro dan mikro (Gambar 5). Media MS 1/2 konsentrasi hara makro dan mikro menghasilkan jumlah planlet berkalus yang sama pada dua taraf konsentrasi BAP, yaitu sebanyak 22.22 %.

Kalus yang terbentuk memiliki struktur padat (massif). Kalus tersebut memiliki warna yang beragam, akan tetapi sebagian besar kalus berwarna putih kekuningan. Menurut Evans (2003), variasi kalus bergantung pada jaringan eksplan yang digunakan, umur kalus dan kondisi lingkungan tumbuhnya. Kalus bisa berwarna putih, hijau, ataupun berwarna gelap karena adanya pigmen antosianin. Kalus bisa terdiri dari massa sel yang tersusun renggang dan bersifat friable (mudah dipisahkan), atau berlignin dengan susunan massa sel yang rapat dan bertekstur keras (non-friable).

Pencoklatan (browning) terjadi pada kalus yang dihasilkan oleh planlet *Paphiopedilum glaucophyllum*. Dari jumlah keseluruhan planlet yang membentuk kalus, sekitar 40 % kalus mengalami perubahan warna menjadi coklat kehitaman. Perubahan tersebut terjadi pada saat akar mulai membesar atau setelah akar mulai menjadi kalus. Menurut Hutami (2008), perubahan warna menjadi coklat (pencoklatan) dalam kultur jaringan terjadi karena akumulasi polifenol oksidase yang dilepas atau disintesis jaringan dalam kondisi teroksidasi ketika sel

dilukai. Jaringan yang diisolasi menjadi berwarna coklat dan atau kehitaman serta gagal untuk tumbuh.

Pembentukan Plb (*Protocorm like bodies*)

Protocorm like bodies (plb) tidak dihasilkan oleh planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* selama 16 MST pada semua kombinasi perlakuan yang digunakan dalam penelitian. Kalus yang dihasilkan oleh planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* tidak mengalami perkembangan yang mengarah pada pembentukan *protocorm like bodies* (plb). Menurut Sheelavanthmath dan Murthy (2005), BA lebih efektif dalam menginduksi *protocorm like bodies* (plb) dari eksplan *protocorm* dan daun dibandingkan TDZ dan Kinetin pada *Aerides crispum* sema 8 MST.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Perlakuan BAP dengan dua taraf konsentrasi (1 mg/l dan 2 mg/l) dan media (MS dan KC) dengan empat taraf konsentrasi hara makro dan mikro (1, $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, dan $\frac{1}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro) tidak menghasilkan proliferasi tunas adventif dari planlet *Paphiopedilum glaucophyllum* sampai 16 MST. Jumlah tunas dari seluruh planlet tidak bertambah pada semua kombinasi perlakuan yang digunakan. Perlakuan media (MS dan KC) berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan daun dan akar planlet *Paphiopedilum glaucophyllum*. Pertumbuhan daun dan akar optimum diperoleh pada $\frac{3}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro dari kedua jenis media (MS dan KC).

Jumlah total helai daun tertinggi diperoleh dari planlet pada media KC $\frac{3}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro yang ditambah 2 mg/l BAP (KC 6), sedangkan jumlah akar total pada KC $\frac{3}{4}$ konsentrasi hara makro dan mikro yang ditambah 1 mg/l BAP (KC 2). BAP berpengaruh nyata terhadap jumlah planlet berkalus. Penggunaan 1 mg/l BAP (dikombinasikan dengan 0.5 mg/l 2.4-D) menghasilkan jumlah planlet berkalus tertinggi pada semua konsentrasi hara makro dan mikro dari media (MS dan KC), kecuali KC $\frac{1}{2}$ konsentrasi hara makro dan mikro.

Saran

Perlu pengujian terhadap BAP pada taraf yang lebih tinggi, yang secara umum digunakan untuk proliferasi tunas adventif pada angrek. Perlu di coba zat pengatur tumbuh (ZPT) yang berbeda secara tunggal atau kombinasi pada berbagai konsentrasi yang berbeda, begitu juga dengan formulasi media. Perlu percobaan lanjutan mengenai media dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang diperlukan dalam menginduksi perkembangan lain dari kalus yang dihasilkan pada penelitian ini, agar bisa dihasilkan planlet.

DAFTAR PUSTAKA

- Bennett, K.S. 1985. *The Tropical Asiatic Slipper Orchids*. Angus & Robertson Publishers. London. 91 p.
- Birk, L. A. 1983. *The Paphiopedilum Grower's Manual*. Pisang Press. Santa Barbara. 208 p.
- Chawla, H.S. 2002. *Introduction to Plant Biotechnology*. SciencePublishers, Inc. New Hampshire. 532 p.
- Chen, Y. and C. Piluek. 1995. Effects of thidiazuron and N6-benzyl aminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. *Plant Growth Regulation* 16: 99-101.
- Cribb, P. 1997. *Slipper Orchids of Borneo*. Natural History Publications. Kinabalu. 117 p.
- Evans, D.E., J.O.D. Coleman, and A. Kearns. 2003. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers. London and New York. 194 p.
- Hutami, S. 2008. Masalah pencoklatan pada kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 4(2): 83-88.
- Jen-Tsung, C. and Wei-Chin Chang. 2000. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explant of *Oncidium Sweet Sugar*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 95-100.
- Le, B.V., N.T.H. Phuong, L.T.A. Hong, and K.T.T. Van. 1999. High frequency shoot regeneration from *Rhyncostylis gigantea* (orchidaceae) using thin cell layer. *Plant Growth Regulation* 28: 179-185.
- Mahendran, G. and V. Narmatha Bai. 2009. Mass propagation of *Satyrium nepalense* D.Don.-A medicinal orchid via seed culture. *Scientia Horticulturae* 119: 203-207.
- Roy, Jonojit and Nirmalya Banerjee. 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. Var. *oculatum* Hk. f. *Scientia Horticulturae* 97: 333-340.
- Sheelavanthmath, S.S, H.N. Murthy, B.P. Hema, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2005. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf section of *Aerides crispum*. *Scientia Horticulturae* 106: 395-401.
- Ting-Yu, C., Jen-Tsung Chen, and Wei-Chin Chang. 2002. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 38: 595-597.
- Wiendi, N., G.A. Wattimena, dan L.W. Gunawan. 1991. Perbanyak Tanaman. Hal.17-44. *Dalam* Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman (Eds.). Bioteknologi Tanaman. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor. 309 hal.