

# INDUKSIKALUS DAN ORGANOGENESIS KULTUR/ZV *VITRO* *Dendrobium lineale* Rolfe<sup>1</sup>

[Callus Induction and Organogenesis of *in vitro* Culture *Dendrobium lineale* Rolfe]

Djadja Siti Hazar Hoesen<sup>K\*</sup>, Witjaksono dan LA Sukanto

Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong Science Center (LIPI), Jin Raya Bogor Km 46 Cibinong 16191

e-mail: hoesensitihazar@yahoo.com

## ABSTRACT

Callus induction and organogenesis were evaluated in the protocorm like bodies (PLB) culture of *Dendrobium lineale* Rolfe (Orchidaceae). The globular PLB were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium with half strength macronutrients (QA MS), supplemented with thidiazuron (TDZ 0,1, 0,5 and 1) mg/l and 2,4 Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D 0,1, 0,5, 1 and 5) mg/l as treatments. The media containing 1 mg/l TDZ and (1 and 5) mg/l 2,4-D was the best treatment for callus initiation (100%). The largest diameter of callus was obtained from 1 mg/l TDZ (average 3.5 cm). Shoot buds regeneration achieved on 1 mg/l TDZ (average 41.66 %). However roots regeneration was very low (average 6.66 %) obtained from 1 mg/l 2,4-D. The number of adventitious buds produced from the regenerated shoots on media without plant growth regulator

**Kata kunci:** protocorm like bodies, *Dendrobium lineale* Rolfe, induksi kalus, organogenesis.

## PENDAHULUAN

Marga *Dendrobium*, termasuk suku Orchidaceae merupakan marga terbesar anggotanya lebih dari 350 jenis, umumnya epifit, berumbi semu dengan batang yang beruas. *Dendrobium lineale* Rolfe, adalah salah satu jenis dari marga *Dendrobium* yang dikelompokkan dalam section *Spatulata* (*Ceratobium*). Section tersebut merupakan salah satu tulang punggung induk persilangan dan bunga potong. *Spatulata* termasuk anggrek section 'evergreen'. Anggota dari section tersebut 50 jenis di antaranya tersebar mulai dari Filipina, Indonesia (terutama di pulau Jawa), Australia, Kepulauan Pasifik, Samoa bagian Timur. Papua Nugini sendiri sebagai pusat penyebaran, memiliki 30 jenis/spesies dan merupakan habitat alaminya yang meliputi Pulau Papua (wilayah Indonesia). Tumbuhnya pada dataran rendah, tepi pantai hingga ketinggian tempat 800 m dpi. Jenis tersebut umumnya dikembangbiakkan dengan biji, sangat jarang secara vegetatif atau melalui kalus (Irawati, 1996; Lavarack et al., 2002; Lugrayasa dan Hoesen, 2006; Anonim, 2005).

*D. /wea/emempunya isinonim D. veratrivolum* Lindl., *D. cogniauxianum* Kraenzl., *D. augustae-victoriae* Kraenzl., *D. imperatrix* Kraenzl. dan *D. grantii* C.T White. Di Papua Nugini jenis tersebut sering disebut dengan 'Morobe shower', 'Kui blue' dan banyak nama lainnya. Tanaman ini terutama bunganya, dimanfaatkan sebagai bunga potong. Tiap

✉; terima: 6 Oktober 2008 - Disetujui: 8 Nopember 2008

batang dapat menghasilkan 3-5 tangkai bunga yang setiap tangkainya ditumbuhi sejumlah kuntum bunga. Panjang perbungaan dapat mencapai 75 cm dengan ukuran bunga yang relatif besar, diameternya mencapai 5 cm. Warna bunga putih atau kuning pucat dengan lidah berwarna kebiruan, masa bunga mekar di alam tahan hingga 2-3 bulan dan bunga tersedia sepanjang tahun. Di Kebun Raya Bogor (KRB) tahan hingga 20 hari. Waktu berbunga di KRB yaitu pada Januari sampai Juli (Gandawidjaja dan Sastrapradja, 1980).

*D. lineale* memenuhi persyaratan untuk tanaman penghasil bunga potong dan induk persilangan. Penelitian kemampuan silang (*crossability*) antar jenis dalam section *Spatulata*/*Ceratobium* koleksi Kebun Raya Bogor, berhasil membentuk buah dan biji fertil baik sebagai induk jantan ataupun betina (Hoesen, 1983 - tidak dipublikasi). Namun hingga saat ini hibrida-hibrida yang dihasilkan dari induk jenis ini bentuk dan warna bunganya sangat didominasi oleh jenis alaminya, dengan demikian variasinya sangat terbatas dan mengalami kegagalan ketika dikawinsilangkan dengan section lainnya (*section Cuihbertsonid*) kemungkinan karena adanya ketidak serasian (*incompatibility*). Ketidak serasian tersebut dapat diatasi dengan teknik nonkonvensional/rekayasa genetika, antara lain dengan fusi protoplas, embriogenesis somatik. Keberhasilan teknik tersebut akan diperlukan ketika pemuliaan secara konvensional tidak berhasil. Variasi somaklonal melalui

kultur jaringan umumnya terjadi pada kultur kalus, karena kalus merupakan pembentukan sel/jaringan yang tidak terorganisasi jadi regenerasi terjadi bukan pada tingkat sel, sehingga kemungkinan terjadi keragaman. Untuk mempersiapkan penelitian ke arah rekayasa genetika tersebut, dicoba dengan menginduksi kalus (embriogenik) dan organogenesisnya.

Pembentukan kalus embriogenik untuk embriogenesis somatik akan menyediakan bahan dan peluang keberhasilan pemuliaan secara nonkonvensional/rekayasa genetika, untuk mengatasi adanya ketidak serasian genetik.

Kultur kalus terutama pada marga *Dendrobium* section *Spatulata* dengan membentuk tunas adventif untuk tujuan perbanyakan jarang dilakukan, tetapi untuk penelitian embriogenesis somatik kemampuan beregenerasi tersebut penting. Penambahan 2,4D berhasil menginduksi pembentukan kalus pada kultur *D.formosum* dan organogenesisnya terjadi pada media yang mengandung BAP (2,4 dan 6) mg/l dan NAA (0,5 dan 1) mg/l (Nasiraddin et al., 2003a). Penelitian pengaturan intensitas cahaya kurang berpengaruh terhadap organogenesis tunas/pucuk pada kultur kalus anggrek *Dendrobium* sp. hingga umur 14 minggu, namun berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan plb. Intensitas cahaya 1450 lux dan 1600 lux memberikan pertumbuhan plb yang terbaik (<http://www.politeknikjbr.itgo.com/P8.htm>). Pada penelitian ini kultur kalus disimpan dalam kondisi gelap dan untuk meregenerasikannya disimpan dalam kondisi terang.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui formulasi media terbaik untuk menginduksi dan meregenerasikan kalus dengan mengevaluasi penambahan ZPT Thidiazuron (TDZ) dan 2,4D pada media formulasi Murashige dan Skoog (MS).

## BAHAPANMETODE

Buah anggrek *D. lineale* hasil selfing, berasal dari koleksi Kebun Raya Bogor. Biji dari buah utuh yang telah masak fisiologis disemai secara *in vitro* pada media VW (Vacin & Went) (Foto 1). Setelah kultur biji tersebut membentuk protocorm like bodies (plb), plb digunakan sebagai eksplan dan dipilih yang berbentuk bulat. Plb yang terpilih selanjutnya ditanam dalam botol yang berisi media kultur. Tiap botol berisi 4 eksplan. Kultur untuk pembentukan tunas secara langsung (tanpa membentuk kalus) disimpan dalam ruang inkubasi dengan intensitas cahaya sekitar 1000 lux selama 16 jam per hari, dengan suhu ruangan 26-27°C. Media kultur yang digunakan yaitu formula MS (Murashige and Skoog, 1962) dengan konsentrasi hara makro dan mikro setengahnya (V2MS), diperkaya dengan vitamin MS (*glycine* 3 mg/l, *thiamine* HCl 0,1 mg/l, *pyridoxine* HCl 0,5 mg/l, *nicotinic acid* 0,5 mg/l), *myo-inositol* 100 mg/l, sukrosa 20 g/l, *casein hidrolisate* 150 mg/l, air kelapa 150 ml/l dan phytigel 2 g/l.

Untuk menginduksi kalus, media dasar Vi MS ditambah NAA (*Naphtalene acetic acid*) 5 mg/l dan phytigel 2 g/l mendapat perlakuan penambahan TDZ (*thidiazuron*) 0,0,1; 0,5; 1 mg/l dan 2,4-D (*2,4 Dichloro phenoxy acid*) 0,0,1,0,5,1 dan 5 mg/l ditambahkan ke dalam media. Media tersebut sebelum diautoklaf diatur pH-nya 5,7-5,8. Selanjutnya diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 kg/cm<sup>2</sup> selama 20 menit. Kultur diinkubasikan pada tempat gelap dengan suhu ruangan 26-27 °C.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan pola faktorial. Pengamatan dilakukan 4 minggu setelah tanam. Peubah yang diamati adalah persentase eksplan yang bertahan hidup, persentase eksplan membentuk tunas,



Foto 1. Tanaman dan bunga *D. lineale* sebagai sumber eksplan dan hasil semai biji secara *in vitro*

persentase eksplan membentuk akar, persentase eksplan membentuk kalus dan ukuran diameter kalus. Data dianalisis dengan menggunakan program SPSS 11.5 for Windows.

Setelah selesai pengamatan tahap pembentukan kalus, kalus yang terbentuk pada berbagai media perlakuan tersebut disubkultur untuk pemeliharaan dan mempersiapkan bahan untuk penelitian selanjutnya (kultur protoplas dan embriogenesis somatik) ke media MS + TDZ 0,1 mg/1 + 2,4-D 0,5 mg/1 dan disimpan di ruang gelap dengan suhu ruangan 26-27°C selama 4 minggu. Setelah 4 minggu inkubasi kultur diamati dan disubkultur ke media yang sama, selanjutnya subkultur dilakukan sebanyak 3 kali dengan lama inkubasi selama 8 minggu. Kalus yang disubkultur adalah yang bertekstur *friable* dan bentuk bulat saja (diduga embriogenik). Selain di media TDZ 0,1 mg/1 + 2,4D 0,5 mg/1 semisolid, sebagian kultur juga disubkultur ke media yang mengandung TDZ 0,1 mg/1 + 2,4D 0,5 mg/1 cair dan media 1/2MS semisolid. Untuk organogenesis/regenerasi kalus menjadi bakal tunas, kultur diinkubasikan pada ruangan dengan intensitas cahaya sekitar 1000 lux selama 16 jam terang per hari, dengan suhu ruangan 26-27°C.

## HASIL

Kultur plb pada media dasar (1/2MS), 100% kultur berhasil membentuk tunas/planlet dalam kondisi 16 jam/hari terang.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi TDZ dan 2,4D tidak berbeda nyata pada selang kepercayaan 95% (Tabel 3), untuk mengamati persebaran nilai rataannya diperhitungkan dengan standar deviasi, dengan demikian pengaruh faktor tunggal dianalisis.

### Pengaruh TDZ ; 2,4D secara tunggal terhadap persentase kemampuan hidup kultur *D. lineale*

Hasil pengamatan pada kultur yang berumur 4 minggu dari saat pemindahan teramati bahwa penambahan TDZ 0,5 mg/1 secara tunggal menunjukkan nilai rata-rata persentase hidup tertinggi (57,27 %). Nilai rataannya terendah (41,07 %), terjadi pada kultur dalam media yang diberi tambahan TDZ 1 mg/1. Nilai tersebut secara statistik menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji berjarak Duncan (Tabel 1). Tampak adanya kecenderungan persentase kultur yang hidup meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi TDZ hingga 0,5 mg/1, kemudian menurun secara nyata pada kultur dengan perlakuan TDZ 1 mg/1.

Penambahan 2,4D secara tunggal ke dalam media menunjukkan respon yang kurang optimal; hal tersebut diindikasikan dengan persentase nilai rata-rata kemampuan hidup kultur lebih kecil dibandingkan dengan kontrol. Bahkan perlakuan 2,4D konsentrasi tertinggi 5 mg/1 nilai rataannya terkecil (38,64 %) dan hasil uji statistik juga berbeda nyata (Tabel 2).

### Pengaruh TDZ, 2,4D secara tunggal terhadap persentase pembentukan dan ukuran diameter kalus pada kultur *D. lineale*

Penambahan TDZ (0,1, 0,5 hingga 1) mg/1 tidak berpengaruh nyata terhadap persentase pembentukan dan ukuran diameter kalus. Walaupun demikian tampak adanya kecenderungan pemberian TDZ 0,1 mg/1 terbanyak membentuk kalus; lebih dari 84% kultur membentuk kalus dan semua perlakuan serta kontrol berhasil membentuk kalus dengan kisaran nilai rata-rata (68%-85%). Dari nilai rata-rata ukuran diameter kalus teramati bahwa penambahan TDZ (0,1 hingga 0,5) mg/1 dapat meningkatkan ukuran diameter kalus dan pada kultur yang ditambah TDZ 1 mg/1 diameter kalus menurun (Tabel 1).

**Tabel 1.** Pengaruh Penambahan TDZ terhadap pembentukan kalus dan organogenesis PLB *D. Lineale*

Konsentrasi TDZ (mg/1)	Persentase Hidup (%)	Persentase Tunas (%)	Persentase Akar (%)	Persentase Kalus (%)	Diameter kalus (cm)
0	44,74 b	6,14 a	1,75 a	79,82 a	2,18 a
0,1	50,31 ab	4,17 a	0,00 a	84,37 a	2,46 a
0,5	57,27 a	16,67 a	0,00 a	68,18 a	2,90 a
1	41,07 b	13,09 a	0,00 a	80,95 a	2,14 a

Ket.: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada selang kepercayaan 95%.

Perlakuan penambahan 2,4D hingga 5 mg/1 menghasilkan nilai rata-ran tertinggi terhadap persentase pembentukan kalus atau jumlah kultur yang membentuk kalus (95,45%), semakin tinggi konsentrasi ZPT, persentase jumlah kultur yang membentuk kalus semakin meningkat hingga 5 mg/12,4D. Hasil uji DMRT Duncan menunjukkan perbedaan yang nyata pada selang kepercayaan 95% (Tabel 2). Hal sebaliknya teramati pada peubah ukuran diameter kalus, ada kecenderungan nilai rata-ran semakin menurun dibandingkan dengan kontrol 2,80 cm berturut-turut 2,67 cm, 2,34 cm, 2,49 cm dan 2,02 cm (0,1, 0,5, 1 dan 5) mg/1 2,4D, namun perbedaan tersebut secara statistik tidak berbeda nyata (Tabel 2 dan Gambar 2).

**Pengaruh TDZ, 2,4D secara tunggal terhadap organogenesis pada kultur *D. lineale***

Pembentukan tunas pada kultur dalam media yang mengandung TDZ dan kontrol (tanpa TDZ) menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan nilai rata-ran seiring dengan meningkatnya konsentrasi TDZ hingga 0,5 mg/1, kemudian menurun pada kultur dalam media yang mengandung TDZ 1 mg/1. Namun secara statistik hasil tersebut tidak berbeda nyata. Sementara

pembentukan akar tidak terjadi pada media yang mengandung TDZ, hanya kontrol yang berhasil membentuk akar dengan nilai rata-ran 1,75 (Tabel 1 dan Gambar 1).

Persentase jumlah kultur yang berhasil membentuk tunas pada kultur *D. lineale* menurun secara nyata seiring dengan meningkatnya konsentrasi 2,4D; bahkan pada media yang mengandung 5 mg/1 2,4D tunas tidak terbentuk. Akar hanya terbentuk pada media yang mengandung 0,1 mg/1 2,4D dengan nilai rata-ran 2,08. Kultur dalam media tanpa ataupun mengandung 2,4D dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari 0,1 mg/1 gagal membentuk akar. Analisis statistik tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata (Tabel 2 dan Gambar 2).

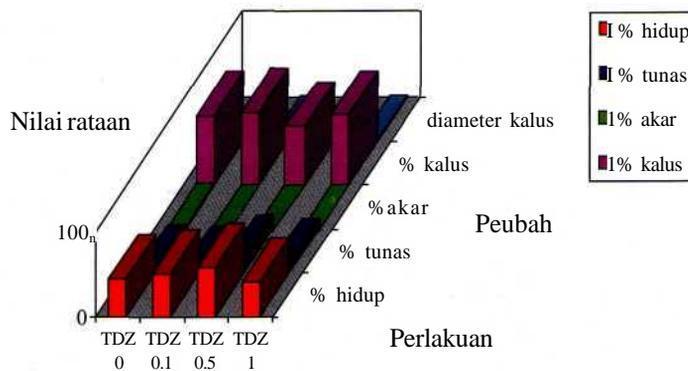
**Pengaruh perlakuan kombinasi TDZ dengan 2,4D terhadap persentase hidup kultur *D. lineale***

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi antara TDZ dan 2,4D (interaksi) tidak berbeda nyata terhadap peubah yang diamati, untuk melihat persebarannya, nilai rata-ran peubah yang diamati diperhitungkan dengan nilai standar deviasinya.

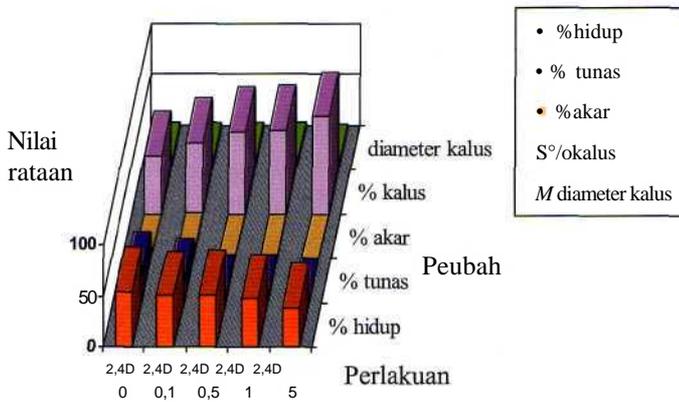
**Tabel 2.** Pengaruh penambahan 2,4-D terhadap pembentukan kalus dan organogenesis pada PLB *D. Lineale*

Konsentrasi 2,4-D (mg/1)	Persentase Hidup (%)	Persentase Tunas (%)	Persentase Akar (%)	Persentase Kalus (%)	Diameter kalus (cm)
0	55,00 a	26,67 a	0,00 a	56,67 c	2,80 a
0,1	50,62 ab	19,79 ab	2,08 a	69,79 be	2,67 a
0,5	51,84ab	4,38 be	0,00 a	80,70 ab	2,34 a
1	48,00 ab	4,44 be	0,00 a	82,22 ab	2,49 a
5	3 8,64 b	0,00 c	0,00 a	95,45 a	2,02 a

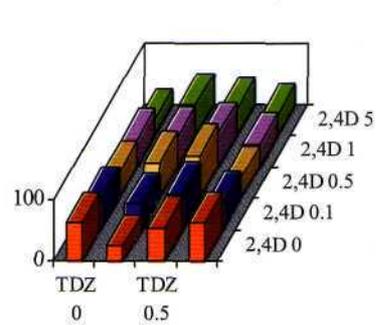
Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada selang kepercayaan 95%.



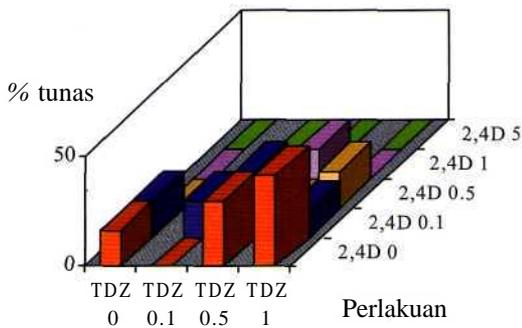
**Gambar 1.** Pengaruh perlakuan TDZ terhadap kemampuan hidup kultur, pembentukan kalus dan organogenesis PLB *D. Lineale*.



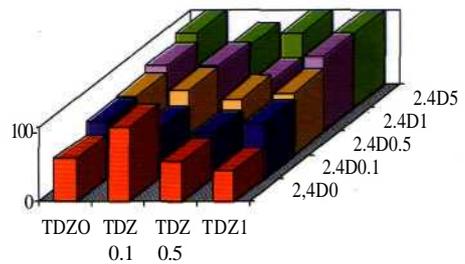
Gambar 2. Pengaruh perlakuan 2,4D terhadap pembentukan kalus dan organogenesis PLB *D. lineale*



Gambar 3. Pengaruh perlakuan kombinasi TDZ dan 2,4D terhadap % hidup kultur *D. lineale*



Gambar 4. Pengaruh perlakuan kombinasi TDZ dan 2,4D terhadap pembentukan tunas *D. lineale*

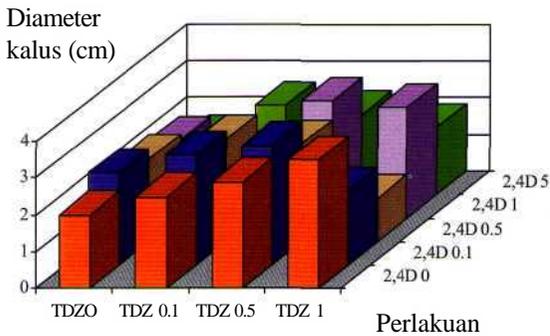


Gambar 5. Pengaruh perlakuan kombinasi TDZ dan 2,4D terhadap pembentukan kalus *D. lineale*

Tabel 3. Pengaruh penambahan kombinasi TDZ dengan 2,4-D terhadap pembentukan kalus dan organogenesis *D. lineale*

Perlakuan (mg/l)	Persentase Hidup	Persentase Tunas	Persentase Akar	Persentase Kalus	Diameter kalus (cm)
TDZ 2,4-D					
0 0	62,50+ 17,68	16,66 + 23,57	0,00	58,33+ 11,79	2,00 + 0,71
0 0,1	50,00+ 17,68	16,66 + 23,57	<b>6,66+14,90</b>	76,66 + 32,49	2,50+ 1,26
0 0,5	41,67 + 20,41	0,00	0,00	77,78+ 25,09	2,25+ 1,21
0 1	43,75+ 12,50	0,00	0,00	87,50 + 25,00	2,12+ 1,05
0 5	25,00 + 0,00	0,00	0,00	<b>100,00+28,87</b>	1,50 + 0,00
0,1 0	25,00 + 0,00	0,00	0,00	<b>100,00</b>	2,50
0,1 0,1	42,50 + 24,75	16,66 + 23,57	0,00	66,66-47,14	3,00 + 0,00
0,1 0,5	58,33± 12,91	5,55 ± 13,61	0,00	86,12 ± 22,15	2,79± 1,65
0,1 1	48,75 ±22,50	0,00	0,00	87,50 ± 25,00	1,73 ±0,69
0,1 5	50,00 ±25,00	0,00	0,00	83,33 ± 28,87	2,42 ± 1,23
0,5 0	55,00 ± 20,92	30,00 ± 29,82	0,00	53,33 ± 27,39	2,90± 1,02
0,5 0,1	60,00 ± 13,69	30,00 ± 29,82	0,00	60,00 ± 25,28	3,25±1,00
0,5 0,5	<b>71,25 + 7,50</b>	0,00	0,00	75,00+ 31,51	2,67+ 1,18
0,5 1	55,00+ 11,18	13,33 + 29,82	0,00	66,66+ 31,18	3,20+ 1,04
0,5 5	41,67+ 14,43	0,00	0,00	<b>100,00 + 0,00</b>	2,17+ 1,04
1 0	62,50+ 17,68	<b>41,66 + 11,79</b>	0,00	41,66+ 11,79	<b>3,50 + 2,12</b>
1 0,1	43,75 + 12,50	12,50 + 25,00	0,00	75,00 + 28,87	2,00 + 0,71
1 0,5	33,33 + 14,43	16,67 + 28,87	0,00	83,33 + 28,87	1,17 + 0,29
1 1	37,50+ 17,68	0,00	0,00	<b>100,00+0,00</b>	3,00 + 0,00
1 5	33,33 + 14,43	0,00	0,00	<b>100,00+0,00</b>	1,83+ 1,04

Keterangan: Angka-angka yang tercantum pada tabel merupakan jumlah rata-rata ± std deviasi.



**Gambar 6.** Pengaruh perlakuan kombinasi TDZ dan 2,4D terhadap ukuran diameter kalus kultur PLB *D. lineale*

Penambahan TDZ (0,1, 0,5 dan 1) mg/1 yang dikombinasikan dengan 2,4D (0,1, 0,5,1 dan 5) mg/1; teramati bahwa nilai rata-ran % kemampuan hidup kultur tertinggi pada media yang ditambah TDZ 0,1 yang dikombinasikan dengan 0,5 mg/12,4D (58,33%), tetapi nilai rata-ran tersebut lebih kecil dari kontrol (62,5%). Penambahan TDZ 0,5 mg/1 dan 2,4D 0,5 mg/1, menghasilkan kultur dengan nilai rata-ran tertinggi (71,25%) dan nilai tersebut lebih besar dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan lainnya. Sementara TDZ 1 mg/1 yang dikombinasikan dengan 2,4D 0,1 mg/1 menghasilkan nilai rata-ran tertinggi 43,75%, nilai tersebut lebih kecil dari kontrol dan ada kecenderungan nilai rata-ran terus menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi 2,4D (Tabel 3 dan Gambar 3).

**Pengaruh perlakuan kombinasi TDZ dengan 2,4D terhadap persentase kultur membentuk kalus dan**

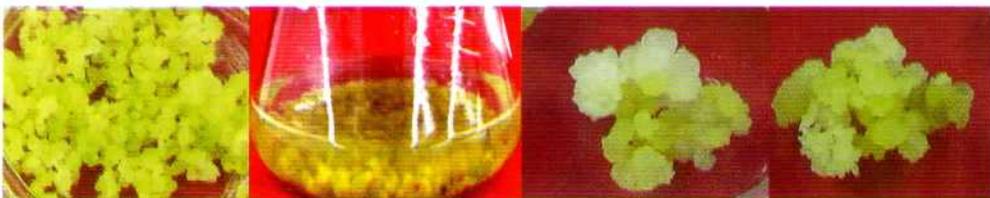
**diameter kalus kultur ZX *lineale***

Seluruh kultur pada media yang ditambah TDZ 0,5 mg/1 + 2,4D 5 mg/1; TDZ 1 mg/1 + 2,4D (1 dan 5) mg/1 berhasil membentuk kalus (100%). Dari nilai rata-ran persentase pembentukan kalus pada kultur dalam media yang ditambah TDZ 1 mg/1, tampak adanya kecenderungan semakin kecil rasio TDZ : 2,4D (konsentrasi sitokinin : auksin) cenderung semakin meningkatkan persentase jumlah kultur yang berhasil membentuk kalus. Sedangkan persentase terkecil 60% kultur dalam media yang ditambah TDZ 0,5 mg/1 + 2,4D 0,1 mg/1; nilai tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (58,33 %).

Ukuran diameter kalus yang terbesar pada media yang mengandung kombinasi TDZ dan 2,4D dihasilkan oleh kultur dalam media yang mengandung TDZ 0,5 mg/1 dan 2,4D 0,1 mg/1 (3,25 cm) dan diameter terkecil terbentuk pada media yang mengandung TDZ 1 mg/1 dan 2,4D 0,5 mg/1 (1,17 cm), sedangkan kontrol diameternya berukuran 2 cm. TDZ 1 mg/1 tanpa 2,4D menghasilkan nilai rata-ran ukuran diameter kalus terbesar yaitu 3,5 cm dan nilai tersebut merupakan nilai tertinggi dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan lainnya (Tabel 1).

**Pengaruh perlakuan kombinasi TDZ dan 2,4D terhadap organogenesis kultur *D. lineale***

Pemeliharaan kalus pada media yang ditambah kombinasi 2,4D 0,5 mg/1 dan TDZ 0,1 mg/1, pada subkultur pertama hingga subkultur ke tiga menunjukkan adanya peningkatan pembentukan kalus yang bentuk bulat dan friable (embriogenik), walaupun



**Foto 2.** Kalus yang embriogenik



**Foto 3.** Tunas hasil organogenesis *D. Lineale*

kalus yang menggelembung dan kompak masih terbentuk dan semakin berkurang hingga subkultur ke tiga (Foto 2). Sementara kalus yang dipelihara pada media *ViMS* tanpa perlakuan ZPT dapat membentuk tunas/planlet (Foto 3)

## PEMBAHASAN

Keberhasilan teknik *in vitro* sangat ditentukan oleh komposisi media yang digunakan, bahan organik, ZPT (zat pengatur tumbuh) yang ditambahkan sesuai dengan fase pertumbuhan dan perkembangan, serta jenis eksplan (George, 1993). Media Murashige and Skoog (MS), mengandung garam-garam mineral dengan konsentrasi relatif tinggi, terutama untuk mendorong terjadinya organogenesis eksplan (Murashige, 1975; Gamborg dan Shyluk, 1981).

ZPT yang ditambahkan ke dalam media kultur jaringan untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Rasio antara ZPT dari luar dengan hormon yang diproduksi tanaman (endogen) akan menentukan arah perkembangan kultur dan tipe pembentukan organnya. Penambahan ZPT dari luar tersebut akan mengubah level ZPT endogen, dengan demikian level baru ZPT akan menjadi faktor pemicu untuk proses pertumbuhan dan morfogenesis eksplan (Gunawan, 1988).

Auksin berpengaruh terhadap pembelahan, pembesaran dan pemanjangan sel. Biasanya auksin diaplikasikan untuk merangsang pertumbuhan kalus, suspensi sel dan organ serta inisiasi akar. Sementara sitokinin berperan dalam pengaturan pembelahan sel, jaringan dan organogenesis.

Pada kultur PLB *D. lineale*, penambahan 2,4D secara tunggal hingga konsentrasi 5 mg/l berhasil membentuk kalus 95,45 % (Tabel 2 dan Gambar 2). Sementara itu, 2,4D (auksin) sering digunakan untuk merangsang inisiasi kalus; dalam proses inisiasi embriogenesis somatik juga sering digunakan auksin (terutama 2,4D) dengan konsentrasi tinggi. Pengaplikasian 2,4D tersebut tidak dianjurkan pada fase pemeliharaan kalus, karena apabila digunakan pada fase ini kadang-kadang menimbulkan adanya variasi genetik (George, 1993). Penambahan auksin secara tunggal pada tahap regenerasi seringkali tidak berhasil membentuk kalus yang embrionik.

Penambahan auksin (2,4D, NAA dan IAA) secara tunggal dan dikombinasikan dengan sitokinin (BA, kinetin), yang telah diaplikasikan pada kultur berbagai macam eksplan (akar, hipokotil, kotiledon dan potongan daun), berhasil membentuk kalus dan organogenesis pada kultur tanaman Safflower cv. Bhima (Nikam dan Shitole, 1999).

Auksin (2,4D) dikombinasikan dengan sitokinin sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus dan kultur suspensi. Pembentukan kalus embriogenik temulawak, inisiasi kalus dan regenerasi kultur jahe (*Zingiberaceae*) dan inisiasi kalus serta pembentukan PLB anggrek *Dendrobium formosum* yang berasal dari eksplan potongan daun, berhasil terbentuk pada media yang diberi perlakuan kombinasi 2,4D dan BA (Mukhri *et al.*, 1985; Syahid dan Mariska, 1997; Nasiruddin, *et al.*, 2003b). Penelitian induksi kalus dan embriogenesis somatik pada kultur *Dendrobium* Queen Sonia juga telah dilakukan dengan perlakuan 2,4 D dan BA serta perlakuan kadar sukrosa (Aswath, 2001)

Kalus *D. lineale* yang diduga embriogenik pembentukannya didorong pula oleh keberadaan 2,4 D (auksin) yang dikombinasikan dengan thidiazuron (sitokinin) (Tabel 3; Gambar 5 dan Gambar 6). Efek 2,4D secara tidak langsung dapat mendorong embriogenesis terjadi pada tanaman *Avena*, *Oryza*, *Panicum* (George, 1993). Penggunaan 2,4 D dan zeatin (sitokinin), serta penggunaan dicamba (auksin: 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) dan zeatin berhasil pula menginduksi inisiasi kalus pada embriogenesis dan regenerasi kultur suspensi tanaman pisang yang biasa dimakan segar (dessert-AA dan AAA) dan pisang olahan (cooking-ABB), serta kultur pisang kultivar Rasthali (AAB) (Novak *et al.*, 1989; Ganapathi, *et al.*, 2001).

Kombinasi ZPT auksin (NAA) dan sitokinin (BA), diaplikasikan pada kultur sel lapisan tipis (thin layer cell) *Dendrobium candidum* dan berhasil meregenerasikan tunas dan akar dari kalus. Perlakuan kombinasi NAA dan BA tersebut menunjukkan respon positif terhadap proliferasi tunas kultur anggrek *Dendrobium* lainnya (Zhao *et al.*, 2007; Nasiruddin *et al.*, 2003 a).

Pembentukan akar terjadi pada kultur kalus *D. lineale* dalam media yang ditambah kombinasi antara 2,4D 0,1 mg/l tanpa TDZ (Tabel 2 & 3, gambar 2). Fase pembentukan tunas dan akar dari kalus (organogenesis), biasanya dipengaruhi oleh rasio konsentrasi sitokinin dan auksin. Rasio antara sitokinin : auksin dengan level tinggi, akan menginduksi pembentukan tunas pada eksplan secara langsung. Sedangkan auksin secara tunggal cenderung mendorong pembentukan akar. Pembentukan akar umum terjadi apabila rasio auksin : sitokinin tinggi (Friedman *etal*, 1985). Kombinasi ZPT BA dan NAA yang ditambahkan ke dalam media kultur *Catharanthus roseus* (L.) G. Don berhasil menginduksi pembentukan kalus berakar pada kultur tanaman penghasil ajmalisin tersebut secara optimum dengan rasio auksin ( $10^7$  M NAA): sitokinin ( $10^5$  M BAP) (Aprianitae/a/., 2003). Perlakuan kombinasi NAA + 2iP, serta NAA + BA, berhasil membentuk kalus, akar dan planlet pada kultur berbagai macam eksplan *Philodendron goeldii* (Irawati,2000).

Penambahan TDZ 1 mg/l secara tunggal pada penelitian kultur *D. lineale* berhasil menginduksi pembentukan tunas, meningkatkan persentase keberhasilan hidup kultur kalus *D. lineale*. Dari nilai rata-rata tersebut mengindikasikan adanya konsentrasi TDZ yang dapat meningkatkan, tahap optimal, kemudian menurunkan persentase kemampuan hidup kultur dan pembentukan tunas. Dari kultur dalam media yang ditambah TDZ tanpa 2,4D; teramati pula bahwa ZPT tersebut berhasil mendorong pertumbuhan bakal tunas (Tabel 1 dan Gambar 1). Pada kultur kalus dari suku lainnya, bakal tunas dan bakal akar dari kalus yang embriogenik juga berhasil terbentuk pada media yang diberi perlakuan kombinasi auksin (IBA) dan sitokinin (BA) pada kultur tanaman hias *Clematis integrifolia* X *C. viticella* (Ranunculaceae). Respon yang hampir sama juga terjadi pada induksi inisiasi kalus kultur tanaman manggis (Mandegaran dan Sieber, 2000; Qosim *et al*, 2007; <http://wikipedia.org/wiki/Clematis>). Sementara pembentukan tunas ganda (*multiple shoots*) berhasil diinduksi pada kultur *Alpinia galanga* (Zingiberaceae) dalam media yang diberi tambahan kombinasi sitokinin (BA) dan auksin

(NAA) dengan tingkat rasio sitokinin hingga 4x (sitokinin : auksin = 2 : 0,5) (Borthakure/a/., 1999).

Pada fase pemeliharaan kalus *D. lineale* dari subkultur pertama hingga ke tiga pada media yang mengandung TDZ 0,1 mg/l + 2,4D 0,5 mg/l, teramati bahwa adanya pembentukan kalus baru yang *friable* dan berwarna kekuningan. Hal ini diduga sel-sel bakal kalus embrionik (proembrionik) membelah diri kembali dan membentuk sel-sel yang proembrionik (Foto 2). Selanjutnya kalus tersebut dipelihara, dipersiapkan untuk penelitian selanjutnya antara lain somatik embriogenesis dan kultur protoplast. Kultur dalam media ViMS tanpa ZPT membentuk tunas adventif. Sering kali pembentukan tunas adventif melalui kalus, tetapi kadang-kadang langsung membentuk tunas (Foto 3).

#### KESEMPULAN

Penambahan ZPT auksin dan sitokinin ke dalam media MS untuk induksi kalus dan organogenesisnya berhasil direspon secara positif oleh kultur *D. lineale*. Dari penelitian tersebut, formulasi media terbaik untuk induksi kalus dan organogenesisnya telah diketahui. Proliferasi tunas/planlet dari kalus tersebut dapat diaplikasikan untuk perbanyakan massal dan pembibitan. Di samping menyediakan kalus yang embriogenik sebagai bahan penelitian, keragaman tanaman dari planlet yang terbentuk kemungkinan akan terjadi. Kalus yang embriogenik berhasil diinduksi dari penelitian tersebut untuk bahan penelitian embriogenesis somatik dan kultur protoplas. Dengan dikuasainya teknik menginduksi kalus (yang embriogenik) dan organogenesisnya, akan memberikan peluang untuk keberhasilan teknik rekayasa genetika secara nonkonvensional. Sebagai cara alternatif karena adanya ketidak serasian genetik.

#### SARAN

Penelitian lanjutan disarankan ke arah embriogenesis somatik dan kultur protoplast untuk hibridisasi somatik, sebagai cara alternatif pada tanaman yang tidak berhasil dengan cara hibridisasi konvensional.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami sampaikan ucapan terima kasih kepada pengelola DIPA 2006-2008 LIPI, Program Penelitian Kompetitif, Subprogram Domestikasi Keanekaragaman Hayati Indonesia yang telah membiayai penelitian ini. Dr. Irawati selaku narasumber, Sofi Mursidawati, MSc, penanggung jawab Laboratorium Anggrek Kebun Raya Bogor, Mujiono, K. Utami dan Junaedi yang telah membantu pekerjaan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aswath CR. 2001. Callus induction and somatic embryogenesis of *Dendrobium* Queen Sonia. *Proceedings of APOC7*, 60-62. Nagoya Japan.
- Aprianita RR, Esyanti dan AH Siregar, 2003. Pengaruh pemberian elisitor jamur *Phytophthora aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Terhadap kandungan ajmalisin pada kultur kalus berakar *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Berita Biologi* 6(4), 546-547.
- Anonim. 2005. Anggrek *Dendrobium*. *Trubus Info Kit* 1(1). Trubus Swadaya. Cimanggis, Depok.
- Borthakur M, J Hazarika and RS Singh. 1999. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55, 231-233.
- Friedman R, A Altman and Bahcrachu. 1985. Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings. II. Incorporation of precursor into polyamines. *Plant Physiology* 79, 80-83.
- Gandawidjaja D dan S Sastrapradja, 1980. Plasmanutufah *Dendrobium* asal Indonesia. *Buletin Kebun Raya* 4(4), 113-125.
- Gamborg OL and JP Shyluk, 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue culture, 21-42. In: *Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture*. TA Thorpr (Ed.). Academic Press, New York.
- Gunawan LW. 1988. *Teknik Kultur Jaringan*. Pusat Antar Universitas, Bioteknologi IPB. Bogor.
- George EF. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture in Practice*. Part 1. Exegetic Limited England.
- Ganapathi TR, NS Higgs, PJ Balint-Kurti, CJ Artzen, GD May and JM Van Eck. 2001. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Reports* 20, 157-162. Springer-Verlag.
- Hoesen DSH. 1983. Kemampuan silang antar jenis dalam section *Ceratobium*. *Laporan Penelitian Tahun 1982-1983. Sumber Bahan Industri*. Lembaga Biologi Nasional-LIPI. Tidak dipublikasikan.
- Irawati. 1996. Potensi anggrek spesies Indonesia dan pengembangan kultivar unggul. (publikasi terbatas). *Makalah Disampaikan pada Seminar Anggrek, 1-2 Nopember 1996, di Jakarta*. Perhimpunan Anggrek Indonesia (PAI).
- Irawati. 2000. Diferensiasi berbagai macam eksplan pada perbanyak *Philodendron goeldii* (Araceae) secara *in vitro*. *Berita Biologi* 5(1), 69-75.
- Lavarack B, V Harris and G Stocker, 2002. *Dendrobium and Its Relatives*. Timber Press. Portland, Oregon USA.
- Lugrayasa IN and DSH Hoesen, 2006. *Dendrobium* Sw. tanaman hias dalam ruangan. *PROSEA Sumber Daya Nabati* No. 20.1. Pusat Penelitian Biologi-LIPI. LIPI Press.
- Murashige T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 : 473 - 497.
- Murashige T. 1975. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166
- Mukhri Z; A Baihaki dan P Sudigdo. 1985. Kultur jaringan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb. - Zingiberaceae) dan studi awal kemungkinan penggunaan mutagen untuk meningkatkan kadar kurkuminnya. *Prosiding Simposium Nasional Temulawak*, 167-172. Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran.
- Mandegaran Z and VK Sieber. 2000. Somatic embryogenesis in *Clematis integrifolia* X *C. viticella*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62(2), 163-165.
- Novak FJ, R Afza, M van Duren, M Perea-Dallos, BV Conger and T Xiaolang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Biotechnology* 7, 154-159.
- Nikam TD and MG Shitole, 1999. In vitro culture of Safflower L. cv. Bhima: Initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55(1), 15-22.
- Nasiruddin KM, R Begum and S Yasmin, 2003a. Protocorm like bodies and planlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus. *Asian Journal of Plant Sciences* 2(13), 955-957.
- Nasiruddin KM, R Begum, S Yasmin, SK Talukder and L Hassan, 2003b. Shoot proliferation of *Dendrobium* orchid with BAP and NAA. *Journal Biological Sciences* 3(11), 1058-1062.
- Qosim WA, R Purwanto, GA Wattimena dan Witjaksono. 2007. Pengaruh iradiasi sinar gamma terhadap kapasitas regenerasi kalus nodular tanaman manggis. *Hayati Journal of Biosciences* 14(4), 140-144.
- Syabid, F dan U. Mariska, 1997. Pengaruh media dan zat pengatur tumbuh terhadap induksi dan regenerasi kalus jahe secara *in vitro*. *Jurnal Littri* 3(4), 145-150
- Zhao F, W Wang, F Fo-Sheng, F Wu, Y Zhong-Qi and W Wan-Yung. 2007. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall, ex Lindl. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 90(2), 131 - 139. ISSN 0167-6857.
- [http://www.anggrek.org/sekilas\\_kulturjaringan\\_aneerek.html](http://www.anggrek.org/sekilas_kulturjaringan_aneerek.html) - Generated 3 November 2008.
- <http://www.Doliteknikibr.itgo.com/P8.htm> - Generated 3 November 2008.
- <http://en.wikiDedia.org/wiki/Clematis> - Generated 3 November 2008.