



A REVIEW: MICROPROPAGATION OF *PHALAENOPSIS* sp FROM LEAF AND FLOWER STALK EXPLANTS

Meutia Zahara

Tadris Biologi, Fakultas Agama Islam, Universitas Muhammadiyah Aceh.

Email: teeya_razali@yahoo.co.id

Abstract *Phalaenopsis* orchids are recognized as the most popular orchid genus in the world, especially in horticultural industry due to their large, colorful, and durable flowers as well as their wider adaptability to room conditions. The characteristics of seedling propagated by vegetative means are not uniform; therefore, propagation through tissue culture is desirable. Although the micro propagation of *Phalaenopsis* has shown very good development, but the wide spread of micro propagation still limited due some problems such as the exudation of phenolic compounds, the PGR concentration, the media used, somaclonal variation, the chosen explants, etc. This paper endeavor to include some important investigations based on the common explants used; leaf and flower stalk.

Keywords: Micropropagation, *Phalaenopsis*, leaf explant, flower stalk

I PENDAHULUAN

Anggrek sangatlah populer akan keindahan bunganya dan terdiri dari bermacam varietas. Penyebarannya mencapai 25.000-30.000 di seluruh dunia dan 10.000 diantaranya berada di daerah tropis. Anggrek merupakan familia terbesar kedua dari tumbuhan berbunga yang merupakan kunci konservasi dikarenakan penyebarannya yang luas dan daya tarik bunganya [1,2]. Jenis bunga ini adalah komoditas tanaman hias yang sangat penting di perdagangan internasional yang dapat dijual dalam bentuk bunga potong dan tanaman dalam pot. Potensi ekonomi ini telah banyak dimanfaatkan dan dikembangkan oleh banyak negara termasuk di Indonesia, namun di Indonesia terkendala oleh mutu benih unggul dikarenakan masih menggunakan teknik penanaman secara konvensional [3].

Phalaenopsis sp. dikenal juga dengan nama anggrek bulan di Indonesia, merupakan salah satu jenis anggrek yang banyak diminati dan dibudidayakan oleh berbagai kalangan. Anggrek ini banyak ditemukan di daerah tropis seperti Indonesia, Malaysia, Filipina, Burma dan Thailand [4], *Phalaenopsis amabilis* (L) Blume adalah salah satu jenis anggrek bulan yang sangat penting di Indonesia dan banyak digunakan sebagai induk anggrek hibrida baru (Gambar 1) [27]. Keistimewaan anggrek bulan diantaranya memiliki ukuran bunga yang besar, penampilannya anggun, warna bunga

bervariasi, tidak mudah rontok bunganya dan tahan lama sampai dua bulan [4]. Anggrek bulan juga telah dinobatkan sebagai salah satu bunga nasional dengan nama 'Pesona Puspa' [5]. *Phalaenopsis* sp tergolong ke dalam anggrek monopodial, dimana hanya terdiri dari satu tangkai batang dan tidak bercabang, sehingga memperbanyak secara konvensional sulit dilakukan, oleh karenanya memperbanyak secara kultur jaringan adalah teknik yang paling tepat [6]. Sudah banyak sekali cara memperbanyak anggrek bulan secara kultur jaringan dilakukan oleh para peneliti dengan menggunakan berbagai jenis eksplan diantaranya; kultur tunas aksilar, meristem, tangkai bunga dan daun [7,8,9,10].



Gambar 1. *Phalaenopsis amabilis* [27]

Mikropropagasi atau teknik perbanyakan secara kultur jaringan adalah metode perbanyakan vegetatif secara *in vitro* yang dilakukan di laboratorium dalam kondisi steril. Keuntungan dari teknik ini adalah dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak, anakan yang sama dengan induknya, butuh waktu yang lebih singkat dan hasil yang unggul dan bebas penyakit [8,4,10]. Keberadaan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) eksogen di dalam media yang umumnya terdiri dari auksin dan sitokinin adalah hal yang sangat menunjang keberhasilan teknik kultur jaringan tanaman. Auksin sangat penting untuk pengembangan sel, pertumbuhan dan inisiasi akar dan kalus sedangkan keberadaan sitokinin sangatlah penting dalam proses fisiologis tanaman seperti pembelahan sel, modifikasi apikal dominan dan differensiasi tunas [4].

II TEKNIK KULTUR JARINGAN TANAMAN ANGGREK

Budidaya tanaman anggrek secara konvensional merupakan suatu proses yang panjang. Proses ini terdiri dari beberapa tahapan penting yaitu; (i) polinasi dan pematangan biji (ii) perkecambahan biji secara *in vitro* (iii) pembibitan sampai dewasa secara *eks vitro* dan (iv) penilaian kualitas dan karakteristik bunga. Dikarenakan masa juvenil yang panjang, total waktu yang dibutuhkan untuk semua tahapan mencapai tiga sampai lima tahun tergantung pada genotip yang berpengaruh [11]. Budidaya anggrek secara konvensional ini membutuhkan ribuan bibit untuk menguji kualitas bunga yang diinginkan. Selain itu, dibutuhkan pula waktu, usaha, tenaga kerja, dan modal yang sangat banyak. Namun, hanya sedikit tanaman yang mampu menghasilkan bunga seperti karakteristik yang diinginkan, melalui budidaya ini [12].

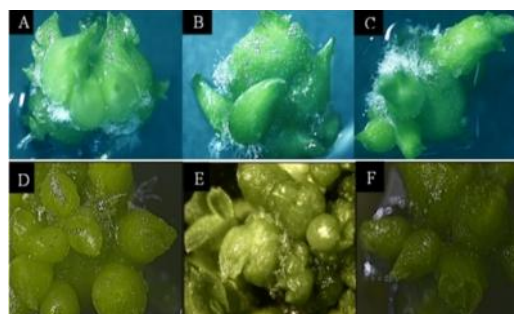
Sel tumbuhan sangat unik dan bersifat totipotensi, dimana tanaman utuh dapat diregenerasikan dari berbagai macam jenis sel, dan sel meristem adalah sel yang memiliki tingkat totipotensi terbaik. Teknik kultur jaringan adalah sebuah metode untuk memanipulasi jaringan tanaman dan sel media steril serta hormon yang digunakan untuk menginduksi embrio somatik secara *in vitro*. Hal ini sangatlah berguna untuk perbanyakan tanaman dan studi tentang hormon tanaman, yang umumnya diperlukan untuk memanipulasi dan meregenerasi tanaman transgenik [13]. Berdasarkan uraian George dan Sherington (1984) [14], di dalam Nursyamsi (2010) [15], kultur jaringan tanaman adalah suatu teknik dalam mengisolasi sel, jaringan atau organ tanaman yang selanjutnya dipindahkan dari

lingkungan alamnya pada media buatan yang sesuai dengan kondisi aseptik. Bagian-bagian tanaman tersebut selanjutnya memperbanyak diri dan menjadi tanaman utuh.

Kultur jaringan tanaman anggrek sudah diperkenalkan sejak tahun 1891 namun secara modern dimulai pada tahun 1949, ketika teknik kultur jaringan baru yang mudah dan praktis diaplikasikan pada propagasi vegetatif anggrek bulan dikembangkan di Universitas Cornell, USA oleh Rotor dengan menggunakan media yang diformulasikan oleh Lewis Knudson (Media Knudson C) [16]. Sampai saat ini metode teknik kultur jaringan pada tanaman anggrek terus dikembangkan yang dibuktikan dengan banyaknya publikasi tentang penelitian dalam hal ini. Kultur tunas anggrek adalah eksplan yang paling sering digunakan dibandingkan dengan kultur biji karena dikhawatirkan akan adanya variasi genetik yang menyebabkan plantlet yang dihasilkan tidak seragam [17]. Selain eksplan tunas, terdapat juga beberapa eksplan yang juga sering digunakan yaitu, daun, tangkai bunga, dan pangkal batang.

Kultur Daun

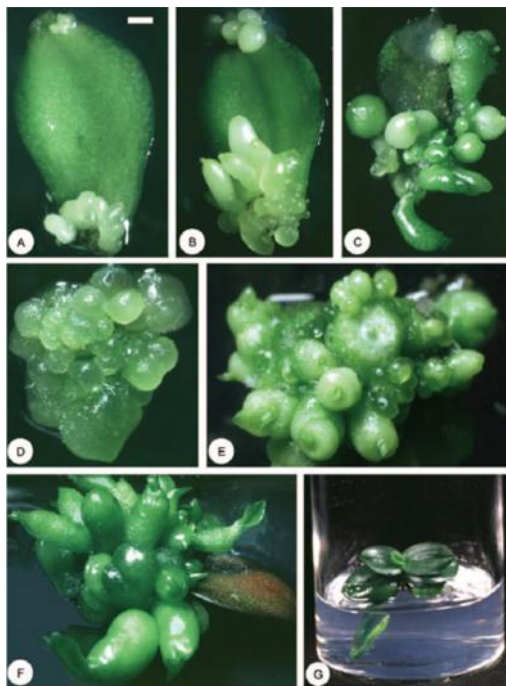
Eksplan daun sangatlah mudah didapat pada tanaman dan ketersediaannya tidak bergantung pada musim, seperti pada bunga [18]. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ramdan (2011) [19], menunjukkan bahwa kultur daun pada *Phalaenopsis gigantea* menghasilkan kalus setelah 12 MSI dengan menggunakan media $\frac{1}{2}$ MS dengan 1 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA, akan tetapi kalus tersebut mati pada hari ke-20. Sedangkan *protocorm like bodies* (PLBs) muncul setelah 12 MSI pada media $\frac{1}{2}$ MS dengan 2 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA dan selanjutnya mati pada hari ke-15 MSI.



Gambar 2 Formasi PLBs yang dikulturkan pada media NDM dengan kombinasi BA (A-C) dan TDZ (D-F) [20]

Penelitian terhadap *P. gigantea* lainnya mampu menghasilkan PLBS hingga 66% dengan menggunakan media New Dogashima medium

(NDM) dengan 0,1–0,3 mg/l TDZ (Gambar 2) [20]. Observasi yang dilakukan oleh Niknejad dkk (2011) [21], pada eksplan daun yang berasal dari plantlet *in vitro* *P. gigantea* dapat menumbuhkan kalus dan PLBs dalam waktu enam minggu setelah dikulturkan pada media NDM dikombinasikan dengan sitokinin seperti BAP, TDZ, dan KIN saja dan bersama auksin (NAA). Embrio somatik terbentuk langsung dari sel epidermis eksplan daun muda *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* tanpa diawali dengan pembentukan kalus setelah 20–30 hari masa inkubasi, media yang digunakan adalah $\frac{1}{2}$ MS yang dikombinasikan dengan 0,1, 1 dan 0,3 mg dm^{-3} TDZ (Gambar 3).



Gambar 3 Regenerasi tanaman melalui embrio somatik langsung dari eksplan daun *Phalaenopsis amabilis*. (A) embrio somatik yang terbentuk setelah 20 dikulturkan (B) Embrio tersebut membesar dan memanjang setelah 30 hari dikulturkan (bar = 750 μm) (C) Embrio berwarna hijau dibawah pencahayaan dan berkembang menjadi protokorm somatik muda setelah 45 hari dikulturkan (D) Embrio somatik terbentuk dari subkultur massa nodular (bar=950 μm) (E) Embrio membentuk tunas dan sebagian lainnya membentuk embrio sekunder (bar=1,2 mm) (F) Embrio membentuk tunas (bar=2 mm) (G) Embrio membentuk plantlet (bar=2 mm) [22]

Sedangkan pada saat eksplan daun diinkubasi pada media bebas ZPT atau media yang dikombinasikan dengan NAA pada konsentrasi 0,1 dan 1 mg dm^{-3} eksplan mengalami nekrosis

dan tidak ada embrio yang terbentuk [22]. Kultur jaringan *Phalaenopsis hybrid* 'Pink' menggunakan segmen daun dapat memunculkan kalus dan juga plantlet dalam kurun waktu 8 minggu dengan 60% *survival rate*, eksplan ini dikulturkan pada media $\frac{1}{2}$ MS dengan kombinasi 0 mg/l NAA dan 2 mg/l TDZ. Sementara itu, eksplan daun yang dikulturkan pada media $\frac{1}{2}$ MS dengan kombinasi 0 mg/l NAA dan 3 mg/l BAP sukses membentuk plantlet dalam kurun waktu 10 minggu setelah inkubasi dengan *survival rate* mencapai 70% [23]. Masalah yang berkaitan dengan pencoklatan eksplan daun dan nekrosis adalah salah satu kendala yang banyak dilaporkan dalam beberapa publikasi [19,23]. Kalus, PLBs dan bahkan plantlet sempat terbentuk, namun dalam jangka waktu yang singkat bisa mengalami kematian. Bagian area yang dipotong mengeluarkan getah warna coklat dan mampu mempengaruhi warna media dan penyerapan unsur hara dari media. Warna coklat ini diduga adalah fenol yang menyebabkan pencoklatan dan nekrosis. Setelah eksplan mengalami pencoklatan, lalu jaringan pengangkut akan dipenuhi oleh tanin dan bagian epidermis atas akan layu [24]. Untuk mencegah kematian akibat fenol ini, maka sebaiknya sub kultur ke media baru dilakukan 2 sampai 3 minggu dalam sekali atau dengan meneteskan asam askorbat ke dalam media setelah sterilisasi [23].

Kesuksesan mikropropagasi anggrek bulan dengan eksplan daun tergantung dari beberapa faktor seperti komposisi nutrisi dalam media, pertumbuhan hormon, sumber eksplan (*in vitro* atau *in vivo*), bagian sisi mana daun yang diambil, orientasi eksplan dan yang paling penting adalah umur eksplan daun [18].

Kultur Tangkai Bunga

Anggrek bulan *Phalaenopsis* sp menjadi primadona sebagai penghias ruang perkantoran, perhotelan, bank, rumah sakit yang umumnya dibeli atau disewa dari nurseri. Setelah masa sewa habis dan bunga rontok, tangkai bunga akan dibuang sebagai limbah, sedangkan tanaman induk akan dirangsang untuk berbunga lagi. Untuk memenuhi permintaan pasar maka teknik kultur jaringan sangatlah tepat dilakukan karena akan menghasilkan tanaman yang banyak dan seragam, serta limbah tangkai bunga tadi dapat dikulturkan untuk menghasilkan tanaman baru lagi melalui teknik ini [4].

Mikropropagasi *Phalaenopsis* sp. menggunakan eksplan tangkai bunga sudah banyak dilakukan secara komersial dengan

tingkat keberhasilan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kultur daun. Penelitian yang dilakukan oleh Yuswanti, dkk (2015) [4] terhadap *Phalaenopsis* anggrek menunjukkan bahwa eksplan yang dikulturkan pada media MS+IBA (1 ppm)+BAP (2 ppm)+air kelapa (150 ml)+arang aktif (2 g/l) menunjukkan pembengkakan mata tunas tercepat yaitu 32,77 hari setelah tanam (HST), paling cepat terjadi pembentukan tunas (49,33 HST) dan memiliki tunas tertinggi (2,12 cm). Tangkai bunga *Phalaenopsis* yang dikulturkan pada media NDM dengan kombinasi NAA dan BAP mampu menghasilkan tunas yang bagus, yang selanjutnya 73% tunas tersebut dikulturkan kembali dan membentuk kalus [25]. Penggunaan NAA juga mampu menginisiasi pembentukan regenerasi tunas langsung dari eksplan buku tangkai bunga *Phalaenopsis* anggrek [6].

Tangkai bunga *Phalaenopsis* hibrida 'Pink' yang dikulturkan pada media Vacin dan Went (VW) dikombinasikan dengan sukrosa (10 g/l)+ekstrak kentang (15 g/l)+ekstrak pisang (15 g/l) mampu menghasilkan plantlet (tanaman utuh) dalam waktu 3 bulan, dengan tinggi tanaman 2 cm dan dua helai daun [23]. Jumlah tunas yang dihasilkan pada mikropropagasi eksplan tangkai bunga *Phalaenopsis amabilis* cv Cool 'Breeze' tertinggi (15,3) pada media MS+BA (4,40 mg/l)+ NAA (1 mg/l), sedangkan jumlah akar terbanyak dihasilkan pada eksplan yang dikultur pada media MS+NAA (1 mg/l). Usia eksplan adalah salah satu faktor penting dalam keberhasilan teknik ini, dan sangat berpengaruh terhadap regenerasinya. Hasil beberapa penelitian menunjukkan, apabila eksplan tangkai bunga yang digunakan adalah tangkai dengan semua bunga sedang mekar, maka hanya 10, 20 dan 30% saja yang mampu menghasilkan tunas lateral pada anggrek *Oncidium*, *Dendrobium* dan *Phalaenopsis* [26].

KESIMPULAN

Eksplan daun dan tangkai bunga merupakan jenis eksplan yang paling sering digunakan pada kultur jaringan bunga anggrek *Phalaenopsis*. Namun demikian tingkat keberhasilannya masih tergolong minim dikarenakan beberapa persoalan seperti fenol yang dikeluarkan oleh eksplan, penggunaan PGR yang tepat, variasi *somaklonal* dan lain-lain. Oleh karenanya masih diperlukan penelitian lanjutan untuk menemukan teknik yang tepat dan cepat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonymous. Orchid (*Orchidaceae*). Diakses tanggal 13 Januari 2013 dari <http://www.rainforest-alliance.org/kids/species-profiles/orchid>. Rainforest Alliance. 2002.
2. Pillon, Y.; Chase, M. W. Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. *Conservation Biology*. 2007, 21, 263–265.
3. Thengane, S. R.; Deodhar, S. R.; Bhosle, S. V.; Rawal, S. K. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in *Garcinia indica* Chois'. *Current Science*. 2006, 91(8), 1074–1078.
4. Yuswanti, H.; Dharma, I. P.; Utama, ; Wiraatmaja, I. W. Mikropropagasi anggrek *Phalaenopsis* dengan menggunakan eksplan tangkai bunga. *AGROTROP*. 2015, 5(2): 161–166.
5. Raynalta, E.; Sukma, D. Pengaruh komposisi media dalam perbanyakan protocorm like bodies, pertumbuhan plantlet, dan aklimatisasi *Phalaenopsis amabilis*. *J. Hort. Indonesia*. 2013, 4(3): 131–139.
6. Kosir, P.; Skof, S.; Luthar, Z. Direct Shoot Regeneration from Nodes of *Phalaenopsis* of Orchids. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2004, 83, 233–242.
7. Arditti, J. R. ; Ernst. Micropropagation of Orchids. Wiley-Interscience. New York, 1993.
8. Park, Y. S.; Kakuta, S.; Kano, A.; Okabe, M. Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1996, 45, 79–85.
9. Park, S. Y. ; Yeung, E. C.; Chakrabarty, D. ; Paek, K. Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Reports*. 2002, 21, 46–51.
10. Zahara, M.; Datta, A.; Boonkorkaew, P. Effects of sucrose, carrot juice and culture media on growth and net CO₂ exchange rate in *Phalaenopsis* hybrid 'Pink'. *Scientia Horticulturae*. 2016, 205, 17–24.
11. Hee, K. H.; Loh, C. S.; Yeoh, H. H. *In vitro* flowering and rapid *in vitro* embryo production in *Dendrobium* Chao Praya Smile (*Orchidaceae*). *Plant Cell Reports*. 2007, 26, 2055–2062.
12. Kannan, N. An *in vitro* study on micropropagation of *Cymbidium* orchids. *Current Biotica*. 2009, 3, 244–250.

13. Steward, Jr. N. C. *Plant Biotechnology and Genetics*. Wiley, A John Wiley & Sons, INC., Publication. 2008.
14. George, E. F.; Sherington, P. D. *Biotechnology by tissue culture*. Exegetics Ltd. 1994.
15. Nursyamsi. Teknik kultur jaringan sebagai alternatif perbanyakan tanaman untuk mendukung rehabilitasi lahan. Makalah pada ekspose hasil-hasil penelitian balai penelitian kehutanan makasar. Makasar, 2010.
16. Aditi, J. F. L. S.; Krikorian, A. D. *Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators*. Botanical Journal of the Linnean Society. 1996, 122: 183-241.
17. Gunawan, L. W. Teknik Kultur Jaringan Tanaman. Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi IPB. 1998. Bogor.
18. Chugh, S. Guha, S.; Rao, I. U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*. 2009, 122, 507–520.
19. Ramdan. Kultur daun dan pangkal batang in vitro anggrek bulan raksasa (*Phalaenopsis gigantea* J.J.Smith) pada beberapa media kultur jaringan. Departemen agronomi dan hortikultura, Fakultas pertanian IPB. 2011.
20. Latip, M. A. R.; Murdad, Z. A.; Aziz, L. H.; Ting, L. M.; Govindasamy.; R. Pipin. Effects of N6-Benzyladenine and Thidiazuron on Poliferation of *Phalaenopsis gigantea* Protocorm. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol*. 2010, 18(1): 217-220 p.
21. Niknejad, A.; Kadir, M. A.; Kadzimin, B. S. *In vitro* plant regeneration from protocorms-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (*Epidendroidaceae*: *Orchidaceae*). *African Journal of Biotechnology*. 2010, 10, 11808–11816.
22. Chen, J. T.; Chang, W. C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*. 2006, 50, 169–173.
23. Zahara, M. Disertasi doktor: The Effects of Plant Growth Regulators and Natural Additives on Direct Shoot Regeneration and Plantlet Growth of *Phalaenopsis* hybrid 'Pink'. Asian Institute of Technology, Pathumthani. Thailand. 2016.
24. Xu, C. J.; Li, H.; Zhang, M. G. Preliminary studies on the elements of browning and the changes in cellular texture of leaf explant browning in *Phalaenopsis*. *Acta Horticulturae Sinica*. 2005, 32, 1111–1113.
25. Tokuhara, K; Mii, M. Induction of embryonic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant*. 2001, 37, 457–461
26. Balilashaki, K.; Naderi, R.; Kalantari, S.; Soorni, A. Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* cv Cool 'Breeze' with using flower stalk nodes and leaves of sterile obtained from node cultures. *IJFAS*, 2014.
27. Semiarti, E.; Indrianto, A.; Purwanto, A. Agrobacterium-Mediated transformation of Indonesian orchids for micropropagation, genetic transformation, Prof. MarÁa Alvarez (Ed.), ISBN: 978-953-307-364-4, InTech, 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/genetic-transformation/agrobacterium-mediated-transformation-of-indonesian-orchids-for-micropropagation>.