

**BIDANG ILMU :  
BIOTEKNOLOGI PERTANIAN DAN PERKEBUNAN**

**LAPORAN TAHUNAN  
PENELITIAN HIBAH BERSAING**



**Menciptakan Kultivar Baru Anggrek  
*Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali yang Cepat Berbunga  
melalui Rekayasa Genetika**

**Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun**

**TIM PENGUSUL**

**Dr. Ir. Rindang Dwiyani, MSc. (NIDN : 0007056203)  
Ir. Hestin Yuswanti, M.P. (NIDN: 0015035904)  
Ida Ayu Putri Darmawati, S.P., M.Si.(NIDN: 0015097110 )**

**UNIVERSITAS UDAYANA  
NOVEMBER 2013**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Menciptakan Kultivar Baru Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*  
forma Bali yang Cepat Berbunga melalui Rekayasa Genetika

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. Ir. Rindang Dwiyani, M.Sc.

NIDN : 0007056203

Jabatan Fungsional : Lektor Kepala

Program Studi : Agroekoteknologi

Nomor HP : 0811386265

Alamat e-mail : rindangdwiyani@yahoo.co.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Ir. Hestin Yuswanti, M.P.

NIDN : 0015035904

Perguruan Tinggi : Universitas Udayana

Anggota (2)

Nama Lengkap : Ida Ayu Putri Darmawati, S.P., M.Si.

NIDN : 0015097110

Perguruan Tinggi : Universitas Udayana

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun

Biaya Tahun berjalan : Rp 50,000,000,-(Lima puluh juta rupiah)

Biaya Keseluruhan : Rp 150,000,000,- (Seratus lima puluh juta rupiah)

Denpasar, 30 Agustus 2013

Ketua Peneliti

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian dan  
Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Udayana

(Prof. Dr. Ir. I Ketut Satriawan, MT)  
NIP: 19640717 198903 1 001

(Dr. Ir. Rindang Dwiyani, M.Sc.)  
NIP 19620507 198801 2 001

## RINGKASAN

Anggrek merupakan salah satu komoditas hortikultura unggulan yang ditetapkan pemerintah Indonesia untuk dikembangkan sejak tahun 2007. Salah Satu anggrek alam Indonesia yang berasal dari Bali adalah *Vanda tricolor* Lindl. var *suavis* forma Bali. Permasalahan utama dalam budidaya anggrek, khususnya genus *Vanda* adalah masa vegetatif yang panjang, sehingga membutuhkan waktu yang relatif lama untuk mencapai masa berbunga. Tujuan dari penelitian ini adalah menciptakan kultivar baru tanaman anggrek *V. tricolor* forma Bali yang memiliki kemampuan berbunga lebih cepat .

Penelitian ini akan dilaksanakan dalam 3 tahap. Tahap pertama adalah mendapatkan metode untuk menghasilkan sistem regenerasi yang tepat yang akan digunakan sebagai metode untuk transfer gen di tahun kedua. Tahap kedua adalah transformasi transfer gen *Hd3a* (Hd=heading date=flowering time) ke genom tanam dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* dengan sistem regenerasi yang didapat tahap 1. Pada tahap 2 ini akan dilakukan penyisipan gen *Hd3a* yaitu gen pembungaan yang berasal dari tanaman padi. Dari penelitian tahap 2 akan diperoleh kandidat transforman. Selanjutnya dilakukan regenerasi terhadap kandidat transforman yang dihasilkan, ditumbuhkan hingga menjadi plantlet. Tahap ketiga adalah analisis molekuler terhadap tanaman kandidat transforman yang dihasilkan dari penelitian tahap 2. Pada tahap ini dilakukan isolasi DNA tanaman kandidat transforman, kemudian dilakukan deteksi transgen pada kandidat transforman dengan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dengan primer spesifik.

Pada tahun pertama dilakukan 4 macam penelitian yaitu: 1) Perlakuan ekstrak tomat dan air kelapa untuk menghasilkan seedling anggrek *V. tricolor* yang akan digunakan sebagai sumber eksplan; 2) Induksi kalus dengan 2,4-D (konsentrasi 0, 5.0, 1.0, 1.5, 2.0 ppm) pada irisan organ pangkal daun, ujung daun, pangkal batang dan ujung tunas; 3) Induksi kalus dengan 2 ppm 2,4-D dengan perlakuan sukrosa, yaitu 0% dan 3% menggunakan 2 jenis eksplan (daun utuh dan batang utuh); dan 4) Induksi organogenesis dengan perlakuan jenis eksplan (pangkal daun, ujung daun, pangkal batang dan ujung batang) dan konsentrasi GA3 (0, 5, 10, 15 dan 20 ppm). Penelitian 1) mendapatkan bahwa ekstrak tomat menstimulasi pertumbuhan seedling anggrek *V. tricolor* forma Bali, sedangkan air kelapa memiliki efek menghambat. Penelitian 2) tidak dihasilkan kalus, namun yang dihasilkan tunas. Pada konsentrasi 2 ppm 2,4D dihasilkan kalus namun berwarna coklat dan mati, sehingga dilakukan penelitian 3). Dari penelitian 3) dihasilkan kalus, hasil terbaik diperoleh dari eksplan batang dengan media tanpa sukrosa. Induksi organogenesis dengan GA3 (penelitian 4) mendapatkan hasil yang memuaskan. Eksplan pangkal daun pada GA3 20 ppm dan eksplan ujung tunas pada 15 ppm GA3 memberikan hasil terbaik untuk pertumbuhan tunas.

Rencana tahun kedua, transformasi akan dilakukan melalui sistem regenerasi organogenesis. Gen akan dimasukkan lewat pangkal daun dan ujung tunas, kemudian dirangsang untuk terjadi organogenesis, sehingga seleksi awal transforman akan dilakukan terhadap tunas-tunas yang tumbuh pada higromisin.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa kami panjatkan atas selesainya sebagian penelitian dari suatu rangkaian penelitian panjang yang akan kami kerjakan pada anggrek *Vanda tricolor* Lindl. Spesies anggrek ini merupakan kekayaan plasma nutfah Indonesia yang layak mendapat perhatian dari kita semua, termasuk para peneliti di perguruan tinggi.

Untuk itu kami haturkan terimakasih yang tak berhingga kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan melalui Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi dan LPPM Universitas Udayana yang telah berkenan membiayai penelitian kami.

Hasil penelitian pada tahap 1 ini memberikan harapan yang besar untuk keberhasilan penelitian pada tahap berikutnya. Harapan kami, pada tahap ke 2 kami berhasil mentransfer gen ke genom tanaman *V. tricolor* melalui *Agrobacterium* menggunakan sistem regenerasi yang ditemukan pada tahap 1. Harapan kami, di akhir penelitian (tahap 3) kami akan mendapatkan tanaman transgenik *V. tricolor* yang berbunga lebih cepat dibanding spesies lainnya dalam genus *Vanda*, yang umumnya berbunga 5-7 tahun setelah semai.

Namun kami tetap berharap doa dan masukan dari pembaca untuk keberhasilan penelitian kami pada tahap selanjutnya. Mudah-mudahan Tuhan Yang Maha Esa senantiasa meridhoi pekerjaan kami.

Denpasar, 16 November 2013

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

	<u>Halaman</u>
HALAMAN SAMPUL	1
HALAMAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN	3
PRAKATA	4
DAFTAR ISI	5
DAFTAR TABEL	6
DAFTAR GAMBAR	7
BAB 1. PENDAHULUAN	8
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	9
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
BAB 4. METODE PENELITIAN	11
BAB 5. HASIL YANG DICAPAI PADA TAHUN PERTAMA	13
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	22
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN	26

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Jumlah plantlet yang dihasilkan pada 19 minggu setelah tanam dari 1 gram biji	13
Tabel 2. Rata-rata panjang tunas (cm)	14
Tabel 3. Rata-rata panjang akar (cm)	14
Tabel 4. Pengamatan pada Eksplan Pangkal Batang	18
Tabel 5. Pengamatan pada Eksplan Pangkal Daun	18
Tabel 6. Pengamatan pada Eksplan Ujung Tunas	19
Tabel 7. Pengamatan pada Eksplan Ujung Daun	19

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Seedling Anggrek <i>V. tricolor</i> var. <i>suavis</i> forma Bali pada 24 Minggu Setelah Semai	15
Gambar 2. Pertumbuhan berbagai jenis eksplan pada perlakuan 2,4-D 0,5 ppm	15
Gambar 3. Persentase Eksplan Berkalus pada Perlakuan Jenis Eksplan dan Sukrosa	16
Gambar 4. Rata-rata Jumlah Kalus per Eksplan pada Perlakuan Jenis Eksplan dan Sukrosa	16
Gambar 5. Kalus yang terbentuk dari organ batang dan daun pada media dengan dan tanpa sukrosa	17
Gambar 6. Pertumbuhan beragam eksplan pada media MS yang ditambah GA3 dengan beragam konsentrasi	20
Gambar 7. Pertumbuhan tunas adventif dari eksplan pangkal daun pada Media MS (+arang aktif) dengan GA3 20 ppm	21
Gambar 8. Pertumbuhan tunas aksilar dari eksplan ujung tunas pada Media MS (+arang aktif) dengan GA3 15ppm	21

## BAB 1. PENDAHULUAN

Anggrek merupakan salah satu komoditas hortikultura unggulan RI dan ditetapkan sebagai komoditas yang memiliki prospek untuk dikembangkan (Departemen Pertanian RI, 2007). Di dunia terdapat lebih dari 30 000 spesies anggrek alam (Banks, 1999), 5000 spesies di antaranya terdapat di Indonesia (Irawati, 2002).

Bali merupakan salah satu daerah di Indonesia dimana usaha tanaman hias berkembang pesat. Pengembangan florikultura di Bali diperlukan tidak hanya untuk menunjang Bali sebagai daerah tujuan wisata, namun hal ini juga akan berdampak terhadap peningkatan ilmu pengetahuan dan *income* para petani, khususnya petani tanaman hias.

*Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali adalah anggrek alam pulau Bali, salah satu sumber kekayaan hayati pulau Bali yang perlu mendapat perhatian kita semua. Spesies ini merupakan induk persilangan dari anggrek *Vanda* hibrida yang yang diperjualbelikan secara komersial saat ini dan dengan harga yang relatif tinggi..

Dwiyani (2012) menndapatkan bahwa forma Bali memiliki karakter spesifik dibandingkan forma Merapi dan forma Jawa Barat, yakni ukuran bunga dan buah yang lebih besar serta totol-totol dan labelum yang berwarna ungu kemerahan, sementara forma Merapi berwarna ungu dan forma Jawa Barat berwarna coklat. Lestari (2010) melaporkan bahwa forma Bali memiliki tingkat keharuman bunga yang lebih tinggi dibanding forma Merapi.

Salah satu permasalahan dalam budidaya anggrek, khususnya genus *Vanda*, adalah masa vegetatif yang panjang, sehingga saat (waktu) pembungaan (*flowering*) membutuhkan waktu yang relatif lama. *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* membutuhkan waktu kurang lebih 5 tahun setelah disemai untuk menghasilkan bunga pertama kali, padahal sebagai tanaman hias, bunga merupakan organ tanaman penting yang dinikmati nilai estetikanya.

Perbaikan sifat-sifat (karakter) tanaman dapat dilakukan secara konvensional melalui *plant breeding* maupun secara lebih modern dengan rekayasa genetika. Penelitian ini akan menggunakan rekayasa genetika untuk memperbaiki karakter pembungaan dari anggrek *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali. Pada penelitian ini akan dilakukan transfer gen *Hd3a* yang berasal dari tanaman padi ke genom tanaman anggrek *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* forma Bali. Gen *Hd3a* (Hd=heading date=flowering time) adalah gen pembungaan yang diisolasi dari tanaman padi yang fungsinya menstimulasi pembungaan lebih awal ('early flowering') dalam kondisi hari pendek (Yano, *et al*, 2001). Tanaman padi transgenik dengan *35S::Hd3a* memperlihatkan fenotipe tanaman yang berbunga lebih cepat secara ekstrem tanpa dipengaruhi fotoperiod (panjang hari) (Kojima, *et al.*, 2002). Pada penelitian ini, diharapkan terjadi hal serupa, yaitu dihasilkan tanaman transgenik *35S::Hd3a V. tricolor* Lindl. var.



*suavis* forma Bali yang berbunga lebih cepat dan dapat berbunga tanpa dipengaruhi fotoperiod.

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

Transformasi tanaman dengan perantara *A. tumefaciens* merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk induksi gen asing ke dalam sel tanaman untuk selanjutnya dihasilkan tanaman transgenik (Alimohamdi dan Bagherieh-Najjar, 2009).

Secara alamiah, *A. tumefaciens* menginokulasi bagian yang luka dari tanaman dikotil dan menyebabkan terbentuknya tumor. Strain virulen dari *A. tumefaciens* memiliki plasmid yang besar (> 200kb) disebut Ti (*Tumor inducing*) plasmid yang berperan dalam induksi tumor. Selama inokulasi, suatu segmen DNA yang bersifat *mobile* dari Ti plasmid (disebut T-DNA) ditransfer ke inti sel tanaman dan terintegrasi ke dalam genom tanaman (Zupan dan Zambryski, 1995) dan 95% dari sel-sel tumor tersebut tertransformasi (Deeken *et al.*, 2006). Sifat alamiah *A. tumefaciens* dalam menginduksi tumor pada tanaman seperti tersebut di atas kemudian dimanfaatkan dalam rekayasa genetika tumbuhan. Tiga hal penting yang mendasari proses transfer T-DNA ke sel tanaman adalah sebagai berikut.

1. Pembentukan tumor, merupakan suatu proses transformasi yang dihasilkan dari transfer dan integrasi T-DNA ke sel tanaman dan ekspresi gen-gen pada T-DNA.
2. Gen-gen pada T-DNA ditranskripsi hanya dalam sel tanaman dan tidak berperan selama proses transfer.
3. Suatu DNA asing yang disisipkan diantara T-DNA border dapat ditransfer ke sel-sel tanaman (Opabode 2006).

Pada tanaman anggrek, transformasi genetik dengan perantara *A. tumefaciens* sudah berhasil dilakukan untuk anggrek *Dendrobium nobile* (Men *et al.*, 2003), *Phalaenopsis* hibrida (Chai *et al.*, 2002); Mishiba *et al.*, 2005), anggrek *Cymbidium* (Chin *et al.*, 2007), *Phalaenopsis amabilis* (Semiarti *et al.*, 2007), *Vanda* hibrida 'Tokyo Blue' (Shresta *et al.*, 2007) dan *Vanda tricolor* Lindl. (Dwiyani dkk., 2011). Transformasi genetik tersebut pada tanaman anggrek dilakukan pada target transformasi berupa *protocorm like bodies / plb* yang berasal dari sel somatik (Men *et al.*, 2003; Chin *et al.*, 2007; Shresta *et al.*, 2007) serta *protocorm* yang berasal dari biji (Mishiba *et al.*, 2005; Semiarti *et al.*, 2007; Dwiyani dkk., 2011).

Penelitian ini menggunakan anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali seperti yang dilakukan oleh Dwiyani dkk. (2012), akan tetapi menggunakan target transformasi yang lebih bervariasi yakni *protocorm* dan *plb*. Sedangkan Dwiyani (2012)

hanya menggunakan *protocorm* sebagai target transformasi. Meskipun relatif lebih sulit untuk menghasilkan *plb* (dari sel somatik) dibandingkan menghasilkan *protocorm* (dari biji), namun diharapkan dengan target berupa *plb*, terjadinya *chimera* dapat dihindarkan. Selain itu, seleksi transforman dalam penelitian ini menggunakan higromisin, sedangkan Dwiyani dkk. (2011) menggunakan kanamisin sebagai agen penyeleksi transforman. Hasil seleksi menggunakan kanamisin bersifat sangat bias, sehingga banyak ditemukan adanya tanaman non-transforman diantara kandidat transforman yang dihasilkan (Dwiyani, 2012), sedangkan menggunakan antibiotik higromisin hasilnya lebih akurat, karena jaringan tanaman umumnya bersifat sensitif terhadap antibiotik higromisin..

Gen yang akan disisipkan ke genom tanaman anggrek *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali untuk mempercepat pembungaan adalah gen *Hd3a*. Gen *Hd3a* (Hd=heading date=flowering time) adalah gen pembungaan yang diisolasi dari tanaman padi yang fungsinya menstimulasi pembungaan lebih awal ('early flowering') dalam kondisi hari pendek (Yano, *et al*, 2001). Gen *Hd3a* pada padi merupakan ortholog dari gen *FT* (*Flowering Locus T*) yaitu gen pembungaan dari *Arabidopsis thaliana* (yang lebih dulu ditemukan) yang fungsinya menyebabkan pembungaan lebih awal dalam kondisi hari panjang (Kojima, *et al.*, 2002). Tanaman padi transgenik dengan *35S::Hd3a* memperlihatkan fenotipe tanaman yang berbunga lebih cepat secara ekstrem tanpa dipengaruhi fotoperiod (panjang hari) (Kojima, *et al.*, 2002).

### **BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan kultivar baru anggrek *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali yang memiliki kemampuan mencapai masa berbunga lebih cepat melalui rekayasa genetika.

Tanaman transgenik *V. tricolor* ini dihasilkan melalui 3 tahap penelitian. Penelitian tahap 1 terfokus untuk mendapatkan sistem regenerasi yang tepat yang akan digunakan untuk transfer gen di tahun kedua.

Pada tahap 2 (tahun ke 2) akan dilakukan transformasi genetik melalui *Agrobacterium tumefaciens* melalui sistem regenerasi yang dihasilkan dari penelitian tahap 1. Penelitian tahap 2 akan mengadopsi metode transformasi melalui *A. tumefaciens* yang ditemukan oleh Dwiyani, dkk. (2011) untuk *V. tricolor*, namun dengan modifikasi untuk meningkatkan efisiensi transformasi. Tujuan penelitian tahap 2 adalah mendapatkan kandidat transforman melalui transfer gen yang mengikuti sistem regenerasi yang dihasilkan tahap 1. Pada tahap 3

(tahun ke 3) akan dilakukan regenerasi tanaman kandidat transforman yang dihasilkan pada penelitian tahap 2, kemudian dilakukan analisis molekuler terhadap kandidat transforman tersebut yang dihasilkan dari penelitian tahap 2. Tujuan penelitian tahap 3 adalah mendeteksi keberadaan transgen *Hd3a* pada genom tanaman melalui analisis PCR dengan primer spesifik untuk gen *Hd3a*. Selanjutnya kandidat transforman yang positif mengandung gen *Hd3a* disebut transforman.

### **Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini akan berguna secara aplikatif karena kultivar baru anggrek yang dihasilkan dapat dikembangkan untuk kepentingan agribisnis florikultura di pulau Bali. Kultivar baru anggrek *V. tricolor* Lidl. forma Bali yang dihasilkan melalui penelitian ini dapat dijadikan tanaman induk untuk menghasilkan hibrida-hibrida baru genus *Vanda* yang berbunga lebih cepat. Rhodora dan Thomas (1996) menyatakan bahwa gen asing yang ada pada tanaman transgenik yang dihasilkan melalui transformasi dengan *Agrobacterium* diturunkan pada progeninya.

Metode transformasi yang juga dihasilkan dari penelitian ini dapat memperkaya hasil-hasil penelitian Universitas Udayana di bidang bioteknologi dan biomolekuler, sehingga diharapkan dapat bersaing secara nasional maupun internasional dalam pengembangan IPTEK.

## **BAB 4. METODE PENELITIAN**

### **Penelitian Tahap 1**

Penelitian tahap 1 akan dilakukan di UPT Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Udayana yang berlokasi di Pegok, Denpasar selatan. Penelitian akan berlangsung kurang lebih selama 10 bulan.

Penelitian tahap 1 akan memfokuskan bagaimana menghasilkan sistem regenerasi yang baik untuk mendapatkan plantlet melalui mikropropagasi. Sistem regenerasi ini akan digunakan sebagai sistem regenerasi mendapatkan tanaman transgenik pada penelitian tahap 2. Modifikasi perlakuan dilakukan dengan modifikasi zat pengatur tumbuh (ZPT) dan jenis organ yang digunakan sebagai sumber eksplan.

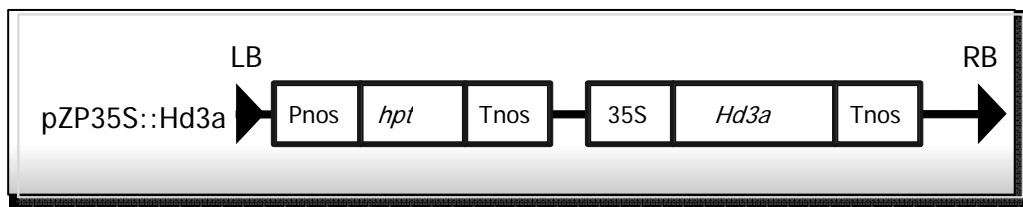
Pada penelitian tahap 1 ini dicoba sistem regenerasi melalui kalus (kalogenesis) dan menumbuhkan organ secara langsung dari eksplan (organogenesis). Kalogenesis menggunakan 2,4-D, sedangkan organogenesis langsung menggunakan GA3.

Sebagai penelitian awal pada tahun pertama ini juga dilakukan penelitian pembuatan seedling yang akan digunakan sebagai sumber eksplan. Biji disemai pada media MS yang

diperkaya dengan air kelapa dan atau ekstrak tomat dengan beragam konsentrasi. Selanjutnya seedling *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali yang dihasilkan ini digunakan sebagai sumber eksplan dalam kalogenesis dan organogenesis. Hal ini dilakukan untuk meminimalisir adanya faktor kontaminan. Sterilisasi eksplan tidak diperlukan karena bahan tanam bersifat steril, sehingga penelitian menjadi lebih efisien.

## Penelitian Tahap 2

Penelitian tahap 2 akan dilakukan transfer gen *Hd3a* ke genom tanaman *V. tricolor*. Target transformasi berupa organ terbaik serta sistem regenerasi terbaik yang dihasilkan dari penelitian tahap 1. Gen *Hd3a* dikonstruksi dalam vektor pZP. Strain *Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan adalah GV 301. Konstruksi gen didapat dari Dr. Endang Semiarti (Fakultas Biologi UGM). Konstruksi tersebut dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Keterangan gambar :

Plasmid pZP digunakan sebagai vektor. Gen *Hd3a* dikontrol oleh promoter 35S dari *Cauli flower Mosaic Virus* (CaMV). RB = *Right Border*; LB = *Left Border*; Pnos = promoter dari gen nopalinsynthase; Tnos = *polyadenylation site* dari gen nopalinsynthase; *hpt* = Gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin untuk seleksi transforman

Tahapan transformasi yang akan dilakukan pada tahap 2 adalah sebagai berikut:

1. Inokulasi target (organ) dengan *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa gen *Hd3a*.
2. Ko-kultivasi
3. Eliminasi bakteri
4. Seleksi awal transforman pada media higromisin.

## Penelitian Tahap 3.

Pada penelitian tahap 3 akan dilakukan regenerasi tanaman kandidat transforman yang dihasilkan dengan jalan menumbuhkan hingga berumur 8 bulan. Kemudian dilakukan perbanyak kandidat melalui mikropropagasi. Kandidat-kandidat ini selanjutnya diseleksi secara molekuler dengan PCR menggunakan primer spesifik untuk gen *Hd3a*.

## BAB 5. HASIL YANG DICAPAI PADA TAHUN PERTAMA

### Penelitian 1. Pembuatan seedling sebagai sumber eksplan

Hasil penelitian mendapatkan bahwa ekstrak tomat memberikan efek stimulatif terhadap jumlah plantlet, panjang akar dan panjang tunas dari seedling (bibit) yang dihasilkan. Air kelapa tanpa ekstrak tomat tidak memberikan efek positif terhadap pertumbuhan bibit. Namun sebaliknya, ekstrak tomat tanpa air kelapa memberikan efek positif terhadap pertumbuhan bibit. Hasil tersebut dirangkum pada Tabel 1, 2 dan 3 dan Gambar 1.

**Tabel 1. Jumlah plantlet yang dihasilkan pada 19 minggu setelah tanam dari 1 gram biji**

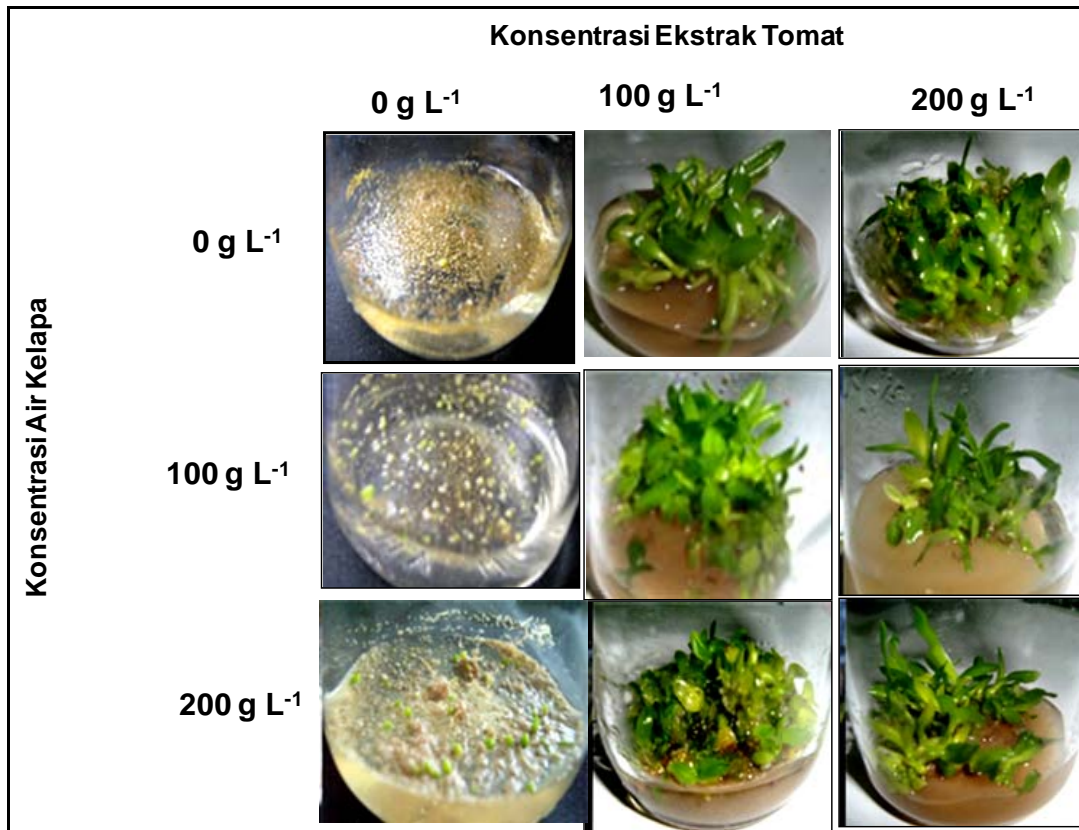
Ekstrak Tomat (g L <sup>-1</sup> )	Air Kelapa (ml L <sup>-1</sup> )			Rata-rata tomat	Notasi tomat
	0	100	200		
0	0.00	20.00	30.00	1.67	b
100	190.00	130.00	110.33	143.44	a
200	130.00	110.00	120.33	120.11	a
Rata-rata Air Kelapa	106.67	86.67	86.89		
Notasi Air Kelapa	a	a	a		

**Tabel 2. Rata-rata panjang tunas (cm)**

Ekstrak Tomat (g L <sup>-1</sup> )	Air Kelapa (ml L <sup>-1</sup> )			Rata-rata tomat	Notasi tomat
	0	100	200		
0	0.00	1.53	3.03	1.52	b
100	9.87	4.43	7.90	7.40	a
200	10.07	7.77	7.87	8.57	a
Rata-rata Air Kelapa	6.64	4.58	6.27		
Notasi Air Kelapa	a	a	a		

**Tabel 3. Rata-rata panjang akar (cm)**

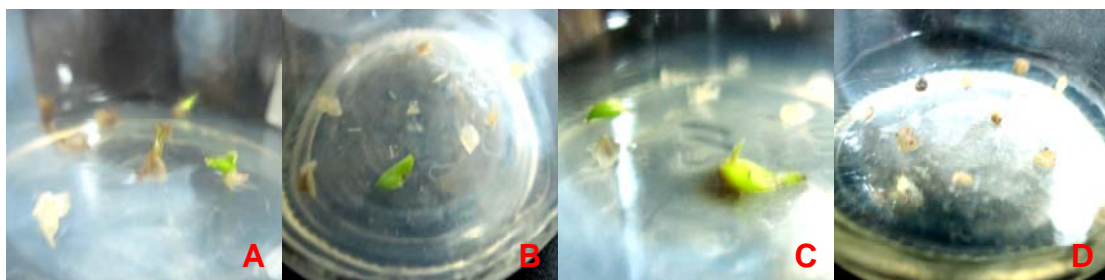
Ekstrak Tomat (g L <sup>-1</sup> )	Air Kelapa (ml L <sup>-1</sup> )			Rata-rata tomat	Notasi tomat
	0	100	200		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	b
100	5.40	3.90	6.33	5.21	a
200	7.33	3.20	5.70	5.41	a
Rata-rata Air Kelapa	4.24	2.37	4.01		
Notasi Air Kelapa	a	a	a		



**Gambar 1.** Seedling Anggrek *V. tricolor* var. *suavis* forma Bali pada 24 Minggu Setelah Semai

**Penelitian 2. Induksi Kalus Menggunakan 2,4-D dengan Perlakuan Konsentrasi 2,4-D dan Jenis Eksplan**

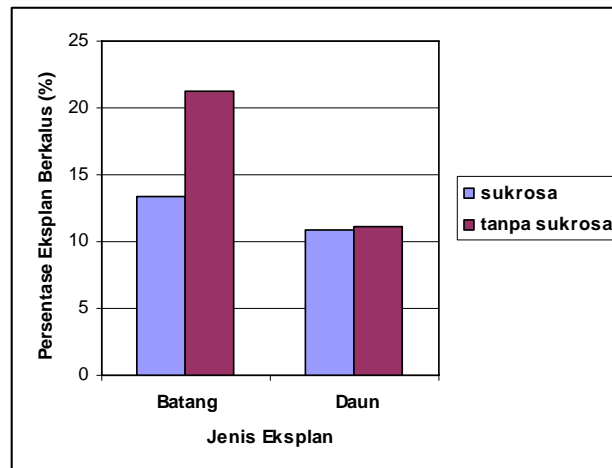
Diantara perlakuan konsentrasi 2,4-D yang memberikan pertumbuhan hingga hari ke 30 adalah 0,5 ppm 2,4-D, sedangkan eksplan pada perlakuan 1 ppm dan 1,5 ppm berubah menjadi putih tanpa mengalami pertumbuhan. Perlakuan 2 ppm 2,4-D menghasilkan kalus berwarna coklat namun kemudian mati. Pertumbuhan yang dihasilkan pada 0,5 ppm 2,4-D adalah tunas, bukan kalus, mengindikasikan jaringan eksplan memiliki hormon penginduksi tunas endogen (sitokinin) yang relatif tinggi (Gambar 2).



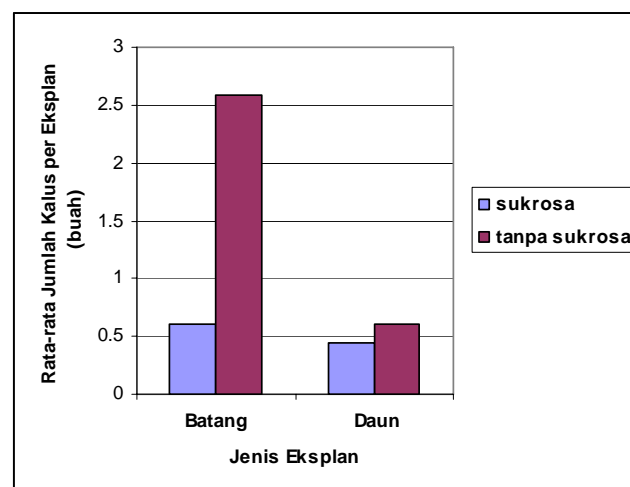
**Gambar 2.** Pertumbuhan berbagai jenis eksplan pada perlakuan 2,4-D 0,5 ppm; A = eksplan ujung tunas; B = eksplan pangkal daun; C = eksplan ujung daun; D = eksplan pangkal batang; skala = 1 cm

### Penelitian 3. Induksi kalus dengan perlakuan konsentrasi sukrosa

Penelitian kalogenesis diulang dengan menggunakan satu konsentrasi 2,4-D, yakni 2 ppm namun dengan perlakuan konsentrasi sukrosa (0% dan 3 %) serta menggunakan hanya 2 macam eksplan saja, yakni irisan daun utuh dan irisan batang utuh. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa untuk pembentukan kalus pada *V. tricolor*, eksplan batang (yang mengandung bakal tunas atau meristem apikal) memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan daun. Media tanpa gula memberikan hasil yang lebih baik untuk pembentukan kalus secara kuantitatif maupun kualitatif, dibandingkan dengan media yang mengandung 3 % sukrosa. Hasil ini dirangkum pada Gambar 3, Gambar 4 dan Gambar 5.
















Gambar 3. Persentase Eksplan Berkalus pada Perlakuan Jenis Eksplan dan Sukrosa



Gambar 4. Rata-rata Jumlah Kalus per Eksplan pada Perlakuan Jenis Eksplan dan Sukrosa



Konsentrasi Sukrosa	Macam Organ	
	Daun	Batang
0 % (tanpa sukrosa)		
		
		
3 % (30 g/liter)		
		
		

Gambar 5. Kalus yang terbentuk dari organ batang dan daun pada media dengan dan tanpa sukrosa. Skala:  = 1cm

#### **Penelitian 4. Organogenesis Menggunakan GA3**

Organogenesis menggunakan GA3 berhasil dilakukan pada penelitian ini. Tunas tumbuh pada 7 hari setelah tanam. Hasil pengamatan pada hari ke 14 dapat dilihat pada Tabel 4 hingga Tabel 7.

**Tabel 4. Pengamatan pada Eksplan Pangkal Batang**

Konsentrasi GA3 (ppm)	Jumlah Eksplan ditanam	Jumlah Eksplan Hijau	Jumlah Eksplan bertunas	Rata-rata Jumlah tunas per eksplan
0	10	4	3	1
5	9	0	0	0
10	12	1	1	1
15	12	3	3	1
20	13	2	2	1.5

**Tabel 5. Pengamatan pada Eksplan Pangkal Daun**

Konsentrasi GA3 (ppm)	Jumlah Eksplan ditanam	Jumlah Eksplan Hijau	Jumlah Eksplan bertunas	Jumlah tunas per eksplan
0	10	9	0	0
5	11	8	2	1
10	11	5	1	1
15	13	6	1	1
20	16	7	4	1

**Tabel 6. Pengamatan pada Eksplan Ujung Tunas**

Konsentrasi GA3 (ppm)	Jumlah Eksplan ditanam	Jumlah Eksplan Hijau	Jumlah Eksplan bertunas	Rata-rata Jumlah tunas per eksplan
0	8	8	4	0
5	14	10	9	2
10	10	5	5	1.4
15	14	11	9	1.3
20	12	10	10	1.2

**Tabel 7. Pengamatan pada Eksplan Ujung Daun**

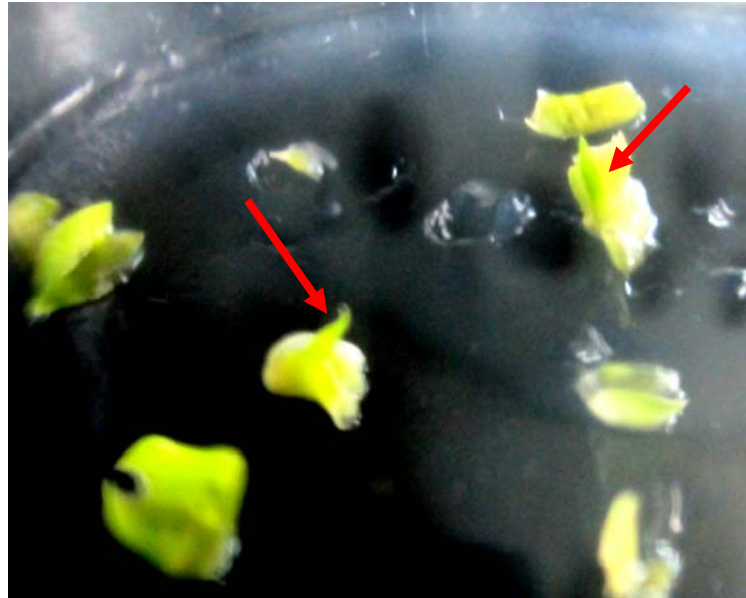
Konsentrasi GA3 (ppm)	Jumlah Eksplan ditanam	Jumlah Eksplan Hijau	Jumlah Eksplan bertunas	Rata-rata Jumlah tunas per eksplan
0	8	4	0	0
5	13	5	0	0
10	14	8	0	0
15	12	8	0	0
20	20	10	0	0

Ada dua hal yang bisa disimpulkan dari data tersebut. Yang pertama, eksplan ujung tunas memberikan hasil yang terbaik untuk induksi tunas dengan GA3 dibandingkan jenis eksplan lainnya, sedangkan eksplan ujung daun tidak menghasilkan tunas sama sekali. Yang kedua, GA3 dapat digunakan untuk menginduksi organogenesis pada kultur organ anggrek *Vanda tricolor*. Selain tunas aksilar dari ujung tunas, tunas adventif juga berhasil diinduksi dari pangkal daun dan pangkal batang. Gambar 6 menunjukkan hasil pengamatan pada 14 hari setelah tanam.

Bahan Eksplan	Konsentrasi GA3 (ppm)				
	0	5	10	15	20
Ujung Daun					
Pangkal Daun					
Pangkal Batang					
Ujung Batang					

**Gambar 6. Pertumbuhan beragam eksplan pada media MS yang ditambah GA3 dengan beragam konsentrasi ; Skala =1 cm**

Gambar 7 dan Gambar 8 menunjukkan secara lebih jelas pertumbuhan tunas adventif dan tunas aksilar dengan pemberian GA3.



**Gambar 7. Pertumbuhan tunas adventif dari eksplan pangkal daun pada Media MS (+arang aktif) dengan GA3 20 ppm (Ditunjukkan oleh anak panah)**



**Gambar 8. Pertumbuhan tunas aksilar dari eksplan ujung tunas pada Media MS (+arang aktif) dengan GA3 15ppm (ditunjukkan oleh anak panah)**

## **BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA**

Pada tahap 1 ditemukan 2 sistem regenerasi untuk dihasilkannya tanaman transgenik, yakni kalogenesis dan organogenesis. Pada tahap 2 akan digunakan organogenesis saja karena kalogenesis membutuhkan waktu lebih lama untuk dihasilkannya plantlet. Dengan demikian maka pada tahap kedua akan dilakukan transfer gen berdasarkan temuan hasil pada penelitian tahap 1. Adapun transfer gen tersebut dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Irisan organ berupa pangkal daun dan ujung tunas di prekulturi selama 3-5 hari pada media MS dengan GA3.
2. Irisan organ tersebut kemudian diinokulasi dengan *Agrobacterium* yang membawa gen *Hd3a* dengan jalan merendam padalarutan suspensi *Agrobacterium* (perlakuan lama perendaman).
3. Selanjutnya, dikultivasi selama 3-7 hari (perlakuan) pada media MS dengan GA3 (pangkal daun 20 ppm; ujung tunas 5 ppm).
4. Bakteri dieliminasi dengan cefotaksime, kemudian ditanam kembali pada media yang sama. Diulang eliminasi ini sampai *Agrobacterium* benar-benar hilang dari eksplan.
5. Ditumbuhkan terus hingga berhasil tumbuh tunas.
6. Dipindah ke media seleksi, yaitu media MS+GA3 yang ditambah higromisin.
7. Tunas yang tetap hijau selanjutnya dipindah ke media MS tanpa higromisin.
8. Selanjutnya dipindah ke media akar (MS + NAA) agar tumbuh akar dan menjadi plantlet.
9. Plantlet ini dapat disebut sebagai kandidat transforman dan akan digunakan sebagai bahan penelitian pada tahap 3.

## BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian tahap 1 ini berhasil ditemukan dua sistem regenerasi pada tanaman anggrek *Vanda tricolor* yakni : melalui kalogenesis pada media MS tanpa sukrosa yang ditambah dengan 2ppm 2,4-D; serta organogenesis dengan hormon GA3. Selanjutnya, pada tahap 2 akan digunakan organogenesis saja karena kalogenesis membutuhkan waktu lebih lama untuk dihasilkannya plantlet.

Disarankan selalu menggunakan arang aktif pada media karena kandungan penolik yang tinggi dari organ anggrek *V. tricolor*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alimohammadi,M., Bagherih-Najjar,M.B. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants : Basic principles and influencing factors. African J. Biotechnol. 8 : 5142-5148.
- Banks,D.P. 1999. Tropical Orchids of Indonesia. Periplus Edition (HK) Ltd, Singapore. 64p.
- Chai,ML., Xu,CJ., Senthil,KK., Kim,JY., Kim,H. 2002. Stable transformation of protocorm like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Sci. Hort.96:213-224.
- Chin,DP., Mishiba,K., Mii,M. *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cymbidium*. 2007. Plant Cell Rep. 26: 735-743.
- Deeken,R., Engelmann,J.C., Efetova,M., Czirjak,T., Muller,T., Kaiser,W.M., Tietz, Krischke,M.O., Mueller,M.J., Palme,K., Dandekar,T., Hedricha, R. 2006. An Integrated View of Gene Expression and Solute Profiles of *Arabidopsis* Tumors: A Genome-Wide Approach. Plant Cell, 18:3617-3634.
- Departemen Pertanian RI. 2007. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis: Rangkuman Kebutuhan Investasi . Edisi Kedua. 83 hal.
- Dwiyani,R., Purwantoro,A., Indrianto,A., Semiarti,E. 2009. Peningkatan kecepatan pertumbuhan embrio anggrek *Vanda tricolor* Lindl. pada medium diperkaya dengan ekstrak tomat. Prooceding Seminar Biologi Nasional XX, UIN Malang 24-25 Juli 2009. Hal. 590 - 597.
- Dwiyani,R. 2012. Mikropropagasi Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var *suavis* forma Bali yang membawa gen *KNOTTED1-LIKE Arabidopsis thaliana (KNAT1)*. Disertasi. Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Indrianto,A. 2003. Kultur Jaringan Tumbuhan (Bahan Ajar). Fakultas Biologi Universitas Gadjahmada, Yogyakarta.



- Irawati. 2002. Pelestarian jenis anggrek Indonesia. Buku panduan Seminar Anggrek Indonesia 2002. Hal: 34-45.
- Islam,MO., Ichihasi,S., Matsui,S. 1998. Control of growth and development of protocorm like body derived from callus by carbon sources in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnol* 15:183-187.
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., and Yano, M. 2002. Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol.* 43, 1096–1105.
- Lestari, E.S. 2010. Karakterisasi Morfologis dan Molekuler Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* Asal Merapi dan Bali. Skripsi. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Men,S., Ming,X., Liu,R., Wei,C., Li,Y. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 63-71.
- Mishiba,K., Chin,DP., Mii,M. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep.* 24: 297-303.
- Opabode,J.T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants : emerging factors that influence efficiency, Review. *Biotechnol. and Mol. Biol.* 1: 12-20.
- Semiarti,E., Indrianto,A., Purwantoro,A., Isminingsih,S., Suseno,N., Ishikawa,N.T., Yoshioka,Y. Machida,Y., Machida,C. 2007. *Agrobacterium*-mediated transFormation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnol.*24 : 265-272.
- Shrestha,B.R., Chin,D.P., Tokuhara,K., Mii,M. 2007. Efficient production of transgenic plants of *Vanda* through sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies. *Plant Biotechnol.* 24: 429-434.
- Yano, M., Kojima, S., Takahashi, Y., Lin, H., and Sasaki, T. 2001. Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. *Plant Physiol.* 127, 1425–1429.
- Zupan,J.R., Zambryski,P.C., 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047.



## **LAMPIRAN**

## **LAMPIRAN 1. INSTRUMEN**

Penelitian tahun 1 dan tahun 2 dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Udayana yang beralamat di Jalan Pulau Moyo Denpasar. Peralatan yang dimiliki Laboratorium adalah sebagai berikut:

- Laminar Air Flow Cabinet (meja kerja steril) sebanyak 2 buah
- Autoclave listrik dan manual
- Shaker
- Refrigerator
- Timbangan digital
- Peralatan kecil lainnya

Sedangkan ruangan yang dimiliki:

- Ruang Preparasi
- Ruang Tanam
- Ruang Kultur
- Ruang Baca

**LAMPIRAN 2. PERSONALIA TENAGA PENELITI DAN KUALIFIKASINYA**

<b>NO</b>	<b>NAMA</b>	<b>NIDN</b>	<b>KUALIFIKASI</b>	<b>KETERANGAN</b>
1	Dr.Ir.Rindang Dwiyani, M.Sc.	0007056201	S1 : Agronomi (IPB) S2 : Hortikultura (Adelaide Univ.) S3 : Bioteknologi Tanaman (Univ. Gadjah Mada)	Mata Kuliah Pokok: Hortikultura, Teknik Kultur Jaringan dan Bioteknologi Pertanian Penelitian: Tanaman hortikultura (aspek kultur jaringan dan bioteknologi)
2	Ir. Hestin Yuswanti, MP.	0015035904	S1: Agronomi (UPN Surabaya) S2: Agronomi (Univ. Sumatera Utara)	Mata Kuliah Pokok: Fisiologi Tumbuhan dan Teknik Kultur Jaringan Penelitian : Tanaman hias (aspek kultur jaringan)
3	Ida Ayu Putri Darmawati, SP., Msi.	0015097110	S1: Agronomi (Univ. Udayana) S2: Bioteknologi (Univ. Gadjah Mada)	Mata Kuliah Pokok: Pemuliaan Tanaman ,Teknik Kultur Jaringan, Bioteknologi Pertanian Penelitian : Tanaman hias (aspek kultur jaringan)

## LAMPIRAN 3. PUBLIKASI

### 1) DRAFT NASKAH UNTUK JURNAL BIONATURA

(NASIONAL TERAKREDITASI) -SUBMITTED 16 NOVEMBER 2013

**Induksi Kalus pada Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis*,  
Upaya Penyediaan Target Transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens***

Rindang Dwiyani <sup>\*)</sup>, Hestin Yuswanti <sup>\*)</sup> dan Ida Ayu Putri Darmawati <sup>\*)</sup>

<sup>\*)</sup>Jurusan Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Udayana, Jalan  
P.B. Sudirman ,Denpasar. Telp. 0361 222 450  
e-mail : rindangdwiyani@yahoo.co.id

#### ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan metode untuk menghasilkan kalus pada tanaman anggrek *V. tricolor* sebagai upaya penyediaan target transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens*. *Seedling* berumur 6-7 bulan setelah semai digunakan sebagai bahan tanam. Percobaan terdiri dari 2 faktor perlakuan yaitu macam organ sebagai faktor 1 dan macam media sebagai faktor 2. Irisan organ berupa batang dan daun utuh ditanam pada media dasar Murashige dan Skoog yang ditambah 2 ppm 2,4-D untuk induksi kalus. Perlakuan media yang diberikan adalah dengan gula (3 % sukrosa) serta tanpa gula (0 % sukrosa). Hasil penelitian menyimpulkan bahwa untuk pembentukan kalus pada mikropropagasi *V. tricolor*, eksplan batang (yang mengandung bakal tunas atau meristem  $\square$  pical) memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan daun. Media tanpa gula memberikan hasil yang lebih baik untuk pembentukan kalus secara kuantitatif maupun kualitatif, dibandingkan dengan media yang mengandung 3 % sukrosa.

---

Kata kunci : Kalus, *Vanda tricolor* , batang, daun, sukrosa

#### **Calli Induction on *Vanda tricolor* Orchid, Producing Target for *Agrobacterium*-Mediated Transformation**

#### ABSTRACTS

The aim of the current research was to find out a method in producing calli of *Vanda tricolor* orchid for target on *Agrobacterium*-mediated transformation. Six to seven months (after sowing) of orchid seedlings were used as source of planting material. Seedlings were sliced into small parts i.e. leaves, shoots and roots. Roots were discharged, while leaves and shoots were used as explants. Explants then were planted on the Murashige and Skoog Medium added with 2ppm 2,4-D for calli induction. Two kinds of sugar concentration i.e. 0% sucrose and 3% sucrose were used as treatment and each was added on those calli induction medium. The results showed that the appropriate method for producing calli on *V. tricolor* orchid was using shoots as source of explants and planting them on Murashige and Skoog Medium added with 2ppm 2,4-D and with no sucrose.

---

Keywords: calli, *V. tricolor* orchid, shoots, leaves and sucrose.

#### PENDAHULUAN

Anggrek merupakan salah satu komoditas hortikultura unggulan RI dan ditetapkan sebagai komoditas yang memiliki prospek untuk dikembangkan (Departemen Pertanian RI, 2007). Di dunia terdapat lebih dari 30 000 spesies anggrek alam (Banks, 1999), 5000 spesies di antaranya terdapat di Indonesia (Irawati, 2002).

Bali merupakan salah satu daerah di Indonesia dimana usaha tanaman hias berkembang pesat. Pengembangan florikultura di Bali diperlukan tidak hanya untuk menunjang Bali sebagai daerah tujuan wisata, namun hal ini juga akan berdampak terhadap peningkatan ilmu pengetahuan dan *income* para petani, khususnya petani tanaman hias.

*Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali adalah anggrek alam pulau Bali, salah satu sumber kekayaan hayati pulau Bali yang perlu mendapat perhatian kita semua. Spesies ini merupakan induk persilangan dari anggrek *Vanda* hibrida yang yang diperjualbelikan secara komersial saat ini dan dengan harga yang relatif tinggi..

Dwiyani (2012) menndapatkan bahwa forma Bali memiliki karakter spesifik dibandingkan forma Merapi dan forma Jawa Barat, yakni ukuran bunga dan buah yang lebih besar serta totol-totol dan labelum yang berwarna ungu kemerahan, sementara forma Merapi berwarna ungu dan forma Jawa Barat berwarna coklat. Lestari (2010) melaporkan bahwa forma Bali memiliki tingkat keharuman bunga yang lebih tinggi dibanding forma Merapi.

Salah satu permasalahan dalam budidaya anggrek, khususnya genus *Vanda*, adalah masa vegetatif yang panjang, sehingga saat (waktu) pembungaan (*flowering*) membutuhkan waktu yang relatif lama. *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* membutuhkan waktu kurang lebih 5 tahun setelah disemai untuk menghasilkan bunga pertama kali, padahal sebagai tanaman hias, bunga merupakan organ tanaman penting yang dinikmati nilai estetikanya.

Perbaikan sifat-sifat (karakter) tanaman dapat dilakukan secara konvensional melalui *plant breeding* maupun secara lebih modern dengan rekayasa genetika. Salah satu cara untuk melakukan rekayasa genetika adalah melakukan transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Transformasi tanaman melalui *A.tumefaciens* merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk induksi gen asing ke dalam sel tanaman untuk selanjutnya dihasilkan tanaman transgenik ( Alimohamdi dan Bagherieh-Najjar, 2009). Dalam transformasi tanaman melalui *A.tumefaciens* dibutuhkan target transformasi, dapat berupa kalus atau tunas, yang akan menjadi

target untuk inokulasi dengan *A. tumefaciens*. Selanjutnya, akan didapatkan sistem regenerasi dari pembuatan tanaman transgenik. Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk mendapatkan target transformasi berupa kalus. Target transformasi ini akan digunakan untuk melakukan penyisipan gen asing ke genom tanaman melalui *A. tumefaciens* pada penelitian selanjutnya. Melalui transformasi ini nantinya diharapkan dihasilkan tanaman transgenik anggrek *V. tricolor* yang memiliki karakter cepat berbunga melalui overekspresi gen pembungaan. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan metode untuk menghasilkan kalus pada tanaman anggrek *V. tricolor* sebagai upaya penyediaan target transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens*.

## **METODE PENELITIAN**

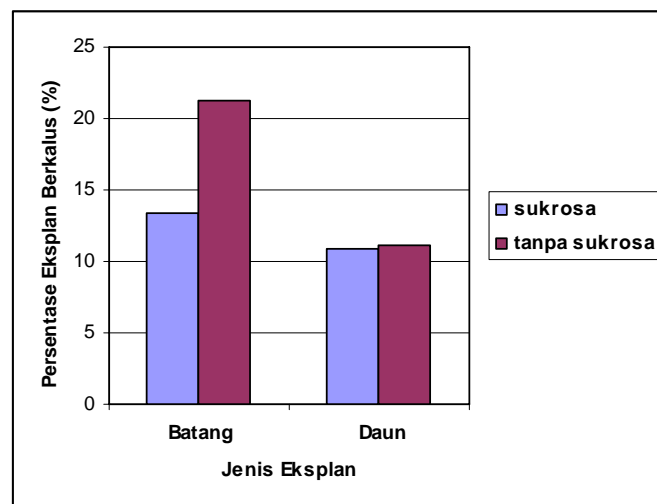
Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Udayana di Denpasar pada Desember 2012- Juli 2013. *Seedling* berumur 12 bulan setelah semai digunakan sebagai bahan tanam.

Percobaan terdiri dari 2 faktor, yaitu macam organ sebagai faktor 1 dan macam media sebagai faktor 2. Irisan organ berupa batang utuh ( 1,0 – 2,0 cm) dan daun utuh (0,5 – 1,0 cm) ditanam pada media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah 2 ppm 2,4-D untuk induksi kalus. Media dibuat dengan Ph 5,6-5,8 dan diautoclave selama 30 menit pada suhu 121°C. Perlakuan media yang diberikan adalah dengan 3 % gula (30 gram/liter sukrosa) serta tanpa gula. Dengan demikian ada 4 macam perlakuan (2 macam organ x 2 macam media) yang diulang sebanyak 4 kali, sehingga dalam penelitian ini seluruhnya ada 16 botol kultur. Jumlah eksplan untuk masing-masing botol berkisar dari 10 hingga 18 buah. Observasi dilakukan terhadap peubah 'persentase eksplan yang menghasilkan kalus' dan 'jumlah kalus per eksplan' yang diamati 6 minggu setelah penanaman. Persentase eksplan yang menghasilkan kalus adalah jumlah eksplan yang berkalus dibagi dengan jumlah eksplan yang ditanam, dikalikan 100%.

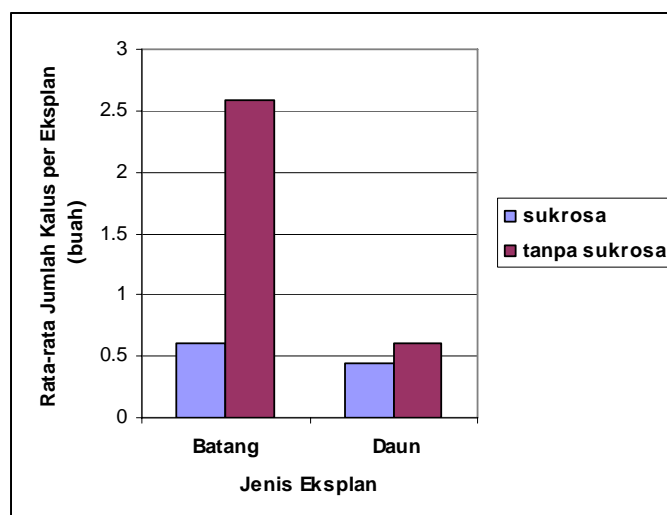
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Jika dilihat dari faktor jenis eksplan, eksplan batang memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan eksplan daun terhadap dua peubah yang diamati, baik pada media dengan gula maupun tanpa gula (sukrosa), Dari faktor media, media tanpa gula memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan media dengan gula.

Secara keseluruhan, eksplan batang yang ditanam pada media tanpa gula memberikan persentase eksplan berkalus dan rata-rata jumlah kalus per eksplan yang paling tinggi dibandingkan tiga perlakuan kombinasi lainnya (Gambar 1 dan Gambar 2). Organ yang lebih meristematik memiliki daya regenerasi yang lebih tinggi dalam kultur in vitro (Bhojwani dan Razdan, 1983), sehingga eksplan batang (dari seedling) dalam penelitian ini memiliki daya regenerasi tinggi karena mengandung tunas apikal dengan meristem apikal di dalamnya. Lang dan Hang (2006) mendapatkan bahwa pada kultur anggrek *Vanda coerulea*, eksplan dari organ batang menghasilkan persentase kalus embriogenik tertinggi dibandingkan eksplan dari organ daun dan akar. Meskipun penelitian ini tidak melakukan observasi lanjutan hingga terjadinya embriogenesis atau organogenesis dari kalus yang dihasilkan, namun kalus tersebut menghasilkan tunas setelah dipindahkan ke media MS yang ditambah 0,15 $\mu$ M NAA dan 5  $\mu$ M 2-IP (untuk induksi tunas), mengindikasikan kalus tersebut tidak rekalsitran terhadap lingkungan kultur dan dapat ditumbuhkan menjadi plantlet.



**Gambar 1. Persentase Eksplan Berkalus pada Perlakuan Jenis Eksplan dan Sukrosa**






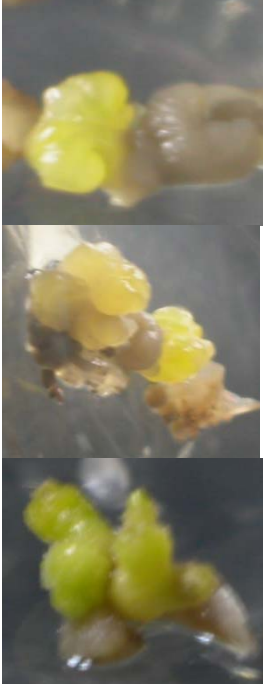
**Gambar 2. Rata-rata Jumlah Kalus per Eksplan pada Perlakuan Jenis Eksplan dan Sukrosa**


Sukrosa merupakan komponen penting dalam media kultur jaringan karena merupakan sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Desjardins *et al.*, 1995), namun sebaliknya konsentrasi gula yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan (Wu *et al.*, 2006). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pembentukan dan pertumbuhan kalus lebih baik pada media tanpa gula (0% sukrosa) dibandingkan media dengan gula (3% sukrosa). Namun perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk beragam konsentrasi sukrosa yang digunakan, mengingat persentase kalus tertinggi yang dihasilkan hanya mencapai 20,13% yaitu pada organ batang yang dikulturkan pada media tanpa gula. Kemungkinan konsentrasi sukrosa 3 % terlalu tinggi dan konsentrasi 0% (tanpa gula) belum efektif untuk pembentukan kalus.

Gambar 3 memperlihatkan kalus yang dihasilkan oleh masing-masing perlakuan. Terlihat bahwa struktur kalus yang lebih remah dan berwarna hijau dihasilkan oleh perlakuan dengan media tanpa gula. Indrianto (2003) menyebutkan bahwa struktur kalus yang remah bersifat embriogenik, dan yang berwarna hijau menunjukkan kalus yang sehat dan berpotensi untuk beregenerasi membentuk tanaman. Pembentukan kloroplas (warna hijau pada tumbuhan) pada protokorm anggrek (dari biji) sangat tergantung dengan adanya gula karena biji anggrek tidak atau sedikit memiliki cadangan makanan (Arditti, 1991), sehingga adanya gula pada media merupakan suatu keharusan. Akan tetapi pembentukan kloroplas pada kalus yang berasal dari sel-sel somatik seperti dalam penelitian ini, ternyata keberadaan



gula tidak mutlak diperlukan. Ini sejalan dengan pendapat Ardiiti dan Ernst (1993) yang menyebutkan bahwa mikropropagasi anggrek *Vanda* dapat dilakukan pada media tanpa gula.

Konsentrasi Sukrosa	Macam Organ	
	Daun	Batang
0 % (tanpa sukrosa)		
3 % (30 g/liter)		

Gambar 3. Kalus yang terbentuk dari organ batang dan daun pada media dengan dan tanpa sukrosa. Skala:  = 1cm

Pembentukan warna hijau pada kalus dapat terjadi pada media tanpa gula, diduga karena organ seperti batang dan daun sudah memiliki cadangan makanan sehingga pertumbuhan propagul seperti kalus dapat terjadi dengan memanfaatkan cadangan makanan tersebut. Warna hijau yang lebih intens pada media tanpa gula dibandingkan dengan gula, dapat ditinjau dari segi biomolekuler. Diduga gen yang bertanggung jawab terhadap pembentukan kloroplas menjadi lebih tereksresi dalam keadaan stress (tanpa gula). Namun pernyataan ini membutuhkan penelitian lebih lanjut.

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa untuk pembentukan kalus pada *V. tricolor*, eksplan batang (yang mengandung bakal tunas atau meristem apikal) memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan daun. Media tanpa gula memberikan hasil yang lebih baik untuk pembentukan kalus secara kuantitatif maupun kualitatif, dibandingkan dengan media yang mengandung 3 % sukrosa.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan perlakuan beragam konsentrasi gula, karena pembentukan kalus dengan 0 % sukrosa belum efektif dan dengan konsentrasi 3 % terlalu tinggi.

## **UCAPAN TERIMAKASIH**

Ucapan terimakasih yang setinggi-tingginya disampaikan penulis kepada Departemen Pendidikan dan Kebudayaan melalui Dirjen Dikti dan LPPM UNUD atas dana Hibah Bersaing (Desentralisasi) 2013 yang digunakan untuk membiayai penelitian ini.

## **PUSTAKA**

- Alimohammadi, M., Bagherih-Najjar, M.B. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants : Basic principles and influencing factors. *African J. Biotechnol.* 8 : 5142-5148.
- Arditti J, Krikorian AD. 1996. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigations. *Bot J Linn Soc* 122:183–241
- Arditti, J. 1991. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 689p.
- Arditti, J., Ernst, R. 1993. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 682p.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1983. *Plant Tissue Culture. Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo. 502p.

- Departemen Pertanian RI. 2007. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis: Rangkuman Kebutuhan Investasi. Edisi Kedua. 83 hal.
- Desjardins Y, Hdider C, de Riek J . 1995. Carbon nutrition *in vitro*. Regulation and manipulation of carbon assimilation in micro-propagated systems. In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (ed) Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 441-472
- Indrianto, A. 2003. Kultur Jaringan Tumbuhan (Bahan Ajar). Fakultas Biologi Universitas Gadjahmada, Yogyakarta.
- Irawati. 2002. Pelestarian jenis anggrek Indonesia. Buku panduan Seminar Anggrek Indonesia 2002. Hal: 34-45.
- Kannan, N. 2009. An In vitro Study on Micropropagation of Cymbidium Orchids. Current Biotica vol.3.Issue 2 : 244-250
- Lang, N.T., Nang, N.T. 2006. Using Biotechnological Approaches for Vanda Orchid Improvement. Omonrice 14: 140-143
- Naing, A.H., Chung, J.D., Lim, K.B. 2011. Plant Regeneration through Indirect Somatic Embryogenesis in *Coelogyne cristata* orchid. Am.J.of Plant Sci. 2 : 262-267
- Wu CH, Dewir YS, Hahn EJ, Paek KY. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. J Plant Biol 49: 193-199

## 2) SEBAGAI PEMAKALAH DI SEMINAR NASIONAL

-Surat dari Panitia Melalui *e-mail*

Sen, 12 Agt 2013 pada 11:25

Sen, 11:25

[Pesan berbintang](#)

### **Pengumuman abstrak Seminar PERHORTI 2013**

DARI PERHORTI Kongres KEPADA Anda

[Tampilkan Detail](#)

Dari

- [PERHORTI Kongres](#)
- 

Ke

- [Rindang Dwiyani](#)

Yth. Ibu Rindang,

Abstrak Ibu dgn judul "Penggunaan Ekstrak Tomat dan Air Kelapa untuk Memacu Pertumbuhan Bibit Anggrek (*Vanda tricolor* Lindl. Var. *suavis*) dalam Botol" Diterima untuk **Presentasi Oral**

#### **INFORMASI PENTING :**

1. Bagi pemakalah yang ingin dimasukkan ke dalam prosiding, makalah lengkap paling lambat diterima panitia **10 September 2013 pukul 14.00**, bila lewat tenggat waktu tersebut tidak mengirim, kami anggap peserta tidak ingin makalahnya dimasukkan ke dalam prosiding
2. Pembayaran seminar paling lambat tgl 10 September 2013 sebesar **Rp 450.000,-** untuk Akademisi/Peneliti, **Rp 350.000,-** untuk Mahasiswa. Pembayaran tgl 10-17 September 2013 dikenakan biaya tambahan Rp 50.000,- menjadi Rp 500.000,- untuk Akademisi/Peneliti, dan Rp 400.000,- untuk Mahasiswa. Kami tidak menerima pembayaran di hari-H (9-10 oktober 2013). Pembayaran dapat dikirimkan ke Rekening **BRI No. rek 059 501 003 896 500 a.n. Perhimpunan Hortikultura Indonesia**
3. Setelah melakukan pembayaran, harap melakukan konfirmasi melalui email ini, atau sms ke nomor **085213122812**. Bukti transfer harap disimpan dan dibawa saat hari-H (9-10 oktober 2013)
4. Bagi pemakalah yang memenuhi syarat, akan diundang untuk diterbitkan di Jurnal Hortikultura Indonesia
5. Komentar panitia tentang abstrak akan dikirimkan kemudian

Atas kerjasama yang baik, kami ucapkan terimakasih.

Hormat kami,  
Sekretariat Kongres dan Seminar PERHORTI 2013

**-Abstrak yang dikirim**

**Penggunaan Ekstrak Tomat dan Air Kelapa untuk Memacu Pertumbuhan Bibit Anggrek (*Vanda tricolor* Lindl.var. *suavis*) dalam Botol**

Oleh Rindang Dwiyani, Hestin Yuswanti dan Ida Ayu Putri Darmawati

Staf Pengajar Jurusan Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Univ.Udayana, Bali  
e-mail: rindangdwiyani@yahoo.co.id

**Abstrak**

*Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* merupakan anggrek alam Indonesia yang keberadaannya di alam dilaporkan mulai langka karena kerusakan hutan akibat bencana alam dan ulah manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan konservasi *ex situ* dengan perbanyak melalui biji di luar habitatnya dan menemukan jenis serta bahan organik yang tepat untuk pertumbuhan bibit dalam botol. Percobaan ini disusun secara faktorial, dengan dua faktor yakni air kelapa dan ekstrak tomat. Masing-masing faktor terdiri dari 3 macam konsentrasi, yaitu 0, 100 dan 200 gL<sup>-1</sup>. Jadi ada 9 macam kombinasi perlakuan yang diulang sebanyak 3 kali. Pengamatan pada 9 minggu setelah semai terhadap faktor tunggal menunjukkan bahwa ekstrak tomat sampai dengan konsentrasi 200 gL<sup>-1</sup> masih menunjukkan peningkatan panjang tunas dan panjang akar, sedangkan air kelapa memberikan efek menghambatterhadap pertumbuhan tunas maupun akar. Jika dilihat dari kombinasi perlakuan, maka kombinasi ekstrak tomat 200 gL<sup>-1</sup> dan tanpa air kelapa menghasilkan tunas dan akar terpanjang.

Kata kunci : *Vanda tricolor*, bibit, ekstrak tomat, air kelapa, panjang tunas, panjang akar

**Abstracts**

*Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* is an Indonesian wild orchid that was reported to be rare in nature due to forrest destruction. Aims of this study was to find out type and concentration of organic matter that can stimulate the growth of seedlings of *V. tricolor* orchid for *ex-situ* conservation purposes. The research was designed in factorial with two factors, ie. coconut water and tomato extracts, with concentration of 0, 100 dan 200 gL<sup>-1</sup> each. The results showed that coconut water inhibited growth of seedlings, however, tomato extract had stimulation effect on growth of seedlings. Tomato extract of 200 gL<sup>-1</sup> without any coconut water resulted in longest shoots as well as roots of seedlings of *V. tricolor*.

Key words: *Vanda tricolor*, seedlings, tomato extract, coconut water, shoot length, root length

- Sertifikat



Perhimpunan Hortikultura Indonesia  
(PERHORTI)

# SERTIFIKAT

Diberikan kepada  
**Rindang Dwiyani**  
sebagai PRESENTER ORAL  
pada  
Kongres dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Hortikultura Indonesia  
(PERHORTI) Tahun 2013



Bogor, 9 Oktober 2013

Ditukung Oleh:



Ketua Perhorti  
  
Prof. Dr. Ir. Roedhy Poerwanto, MSc.

Ketua Panitia  
  
Dr. Ir. M. Rahmad Suhartanto, MSi.