



Teknologi Perbanyak *Phalaenopsis* Secara *In Vitro* Menggunakan Rachis Bunga Sebagai Sumber Eksplan

Phalaenopsis merupakan salah satu komoditas anggrek yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan sangat penting, baik di dunia maupun di Indonesia. Anggrek ini umumnya dijual sebagai bunga potong maupun tanaman pot dan negara produsen tertinggi hingga mencapai 70% ialah Belanda dan diikuti oleh Taiwan dengan 23% dari total produksi anggrek di pasar internasional (Plasmeijer & Yanai 2012). Sementara di Indonesia, meski data produksi dan konsumsi anggrek ini belum tersedia, namun kebutuhan pasar Indonesia akan anggrek *Phalaenopsis* warna putih standar dengan lidah kuning menempati urutan tertinggi mencapai 70% (Komunikasi pribadi dengan PT Eka Graha Flora). *Phalaenopsis* dewasa yang sudah berbunga umumnya dijual antara Rp35.000,00 – 80.000,00 per pot. Meski kebutuhan dan nilai ekonomi anggrek ini sangat tinggi, namun pengembangan anggrek ini pada skala komersial masih dihadapkan pada keterbatasan benih.

Anggrek *Phalaenopsis* termasuk pada golongan anggrek monopodial yang hanya memiliki satu tunas sehingga perbanyakannya secara vegetatifnya sulit dilakukan (Ishii *et al.* 1998). Secara konvensional, anggrek ini diperbanyak secara vegetatif melalui inisiasi keiki pada tangkai bunga yang sudah gugur

bunganya. Meski cara ini menghasilkan anakan yang sesuai dengan tanaman induknya, namun benih yang dihasilkan sangat terbatas. Cara perbanyakannya yang umum digunakan ialah perbanyakannya menggunakan biji. Cara ini mampu menghasilkan benih dalam jumlah yang banyak, namun benih yang dihasilkan sangat beragam sehingga cara ini tidak sesuai untuk tujuan komersialisasi (Park *et al.* 2002). Oleh karena itu cara perbanyakannya yang paling potensial digunakan untuk menghasilkan benih dalam jumlah yang banyak, seragam, dan dalam waktu yang lebih cepat ialah perbanyakannya melalui penerapan teknologi kultur jaringan. Berbagai metode perbanyakannya *Phalaenopsis* menggunakan infloresen bunga memang sudah dilaporkan oleh Gnasekaran *et al.* 2010, Murdad *et al.* 2006, Niknejad *et al.* 2011, Tavares *et al.* 2012, dan Rittirat *et al.* 2014 dengan tingkat keberhasilan yang bervariasi. Keberhasilan teknologi tersebut sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, sejak pemilihan tanaman induk hingga aklimisasinya. Berikut diuraikan teknologi yang berhasil dikembangkan di Balai Penelitian Tanaman Hias. Teknologi ini juga sudah diaplikasikan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Benih Induk Hortikultura (BBIH), Dinas Pertanian Jawa Barat yang ada di Pasir Banteng, Sumedang.



Gambar 1. Tanaman induk dan kondisi infloresen yang sesuai untuk sumber eksplan. (A) tanaman induk sehat, (B) tanaman induk dengan infloresen yang sesuai untuk sumber eksplan, dan (C-D) kondisi infloresen yang baik sebagai sumber eksplan

Memilih Sumber Eksplan yang Baik

Salah satu faktor penentu keberhasilan dalam memperbanyak anggrek menggunakan kultur jaringan adalah bagaimana memilih sumber eksplan yang baik. Pada teknik perbanyakan ini, kondisi infloresen bunga yang sesuai sebagai sumber eksplan yang baik adalah:

1. Infloresen bunga berasal dari tanaman induk yang sehat, tumbuh vigor, dan tidak ada gejala serangan hama penyakit
2. Tanaman induk tidak banyak disemprot dengan pestisida
3. Infloresen masih muda
4. Kuncup bunga belum mekar atau paling banyak satu kuncup bunga yang sudah mekar

Semakin sesuai kondisi eksplan dengan persyaratan tersebut, semakin besar tingkat keberhasilan yang akan dicapai.

Panen dan Sterilisasi Eksplan

Panen eksplan yang tepat juga berpengaruh terhadap keberhasilan kultur jaringan. Setelah berhasil menyiapkan dan mendapatkan kondisi eksplan yang sesuai dengan persyaratan tersebut, pemanenan eksplan dilakukan dengan cara memotong infloresen bunga menggunakan pisau atau gunting yang bersih dan steril, 1–2 cm di atas pangkal infloresen. Pemanenan infloresen sebaiknya dilakukan pada pagi hari, pada pukul 07.00 – 09.00 WIB. Setelah dipanen, eksplan diberi label dengan jelas, terlebih jika infloresen yang dipanen lebih dari satu. Hal ini dilakukan untuk menghindari tercampurnya benih pada proses berikutnya. Infloresen direndam dalam air untuk tetap menjaga kesegarannya.

Sterilisasi eksplan merupakan salah satu tahap kritis dalam kultur *in vitro Phalaenopsis*. Keberhasilan sterilisasi sangat dipengaruhi oleh jenis, konsentrasi, waktu, dan cara aplikasi bahan sterilisasi. Pada teknologi ini, sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Ambil kapas dan basahi atau celup ke dalam alkohol 96%
2. Ambil infloresen yang telah dipanen dan usap infloresen dengan kapas yang telah dibasahi/dicelup dengan alkohol 96% secara berulang dan merata ke seluruh bagian permukaan infloresen dari pangkal hingga ujung
3. Buang kuncup bunga yang melekat pada infloresen dengan pisau kultur dengan menyisakan sedikit tangkai kuncup
4. Potong tiap ruas yang mengandung kuncup bunga (rachis) menggunakan pisau kultur, usahakan bagian pangkal lebih panjang. Rachis yang baik, produktif, dan mudah diinisiasi menghasilkan embrio adalah rachis ke-1 s/d ke-4, yang dihitung dari kuncup bunga yang paling bawah
5. Potongan-potongan rachis kemudian diletakkan di bawah air mengalir selama 1 – 2 jam
6. Rendam rachis dalam larutan air sabun 1% selama 30 menit sambil digojok, diikuti dengan perendaman dalam larutan fungisida dan bakterisida 1% dengan waktu dan cara yang sama, setelah itu dibilas dengan air hingga bersih
7. Potongan rachis yang sudah bersih dibawa ke dalam *laminar air flow cabinet* (L AFC) dan direndam dalam 0,05% larutan merkuri

- klorida (HgCl_2) selama 5 menit sambil digojok
8. Bilas dengan air steril 3 – 4 kali, masing-masing selama 3 menit sambil digojok
 9. Lakukan pembuangan seludang yang menutupi tangkai kuncup bunga menggunakan pisau kultur secara hati-hati, setelah seluruh seludang pada rachis dilakukan
 10. Lakukan sterilisasi lanjutan dengan merendam rachis dalam 0,01% HgCl_2 selama 3 menit sambil digojok, kemudian bilas dengan air steril 4 – 5 kali, masing-masing 3 menit
 11. Potong bagian ujung rachis yang rusak karena bahan sterilisasi menggunakan pisau kultur, kemudian potong tangkai kuncup yang melekat secara mendatar/rata dengan permukaan rachis dan segera tanam di atas media inisiasi.

Inisiasi Embrio

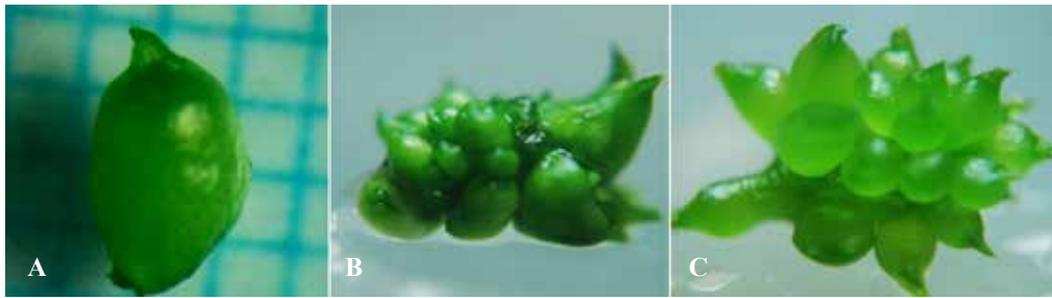
Inisiasi embrio dari rachis dilakukan dengan cara menanam rachis yang telah dipersiapkan sebelumnya di atas medium $\frac{1}{2}$ Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan 1,5 mg/l thidiazuron (TDZ), 0,25 mg/l benzylaminopurine (BAP), 20 g/l sukrosa, dan 7 g/l agar swallow. Penanaman rachis dilakukan dengan cara meletakkan rachis secara



Gambar 2. Kondisi dan penyiapan rachis sebagai sumber eksplan. (A) posisi rachis yang optimal untuk sumber eksplan, (B) cara pemotongan kuncup bunga yang menyisakan sebagian tangkai bunga, (C) potongan rachis yang terpilih dan akan digunakan untuk sterilisasi, (D) posisi seludang bunga yang harus dibuang, (E) seludang yang telah dipisahkan dari pangkal tangkai kuncup bunga, dan (F) rachis yang telah dipersiapkan sebagai sumber eksplan dan siap ditanam di atas media



Gambar 3. Inisiasi hingga embrio dewasa yang berasal dari rachis infloresen *Phalaenopsis*. (A) kondisi rachis saat awal kultur, (B) bakal embrio yang terbentuk \pm 25 hari setelah kultur, (C) embrio berumur 1,5 bulan saat dikeluarkan dari inkubasi gelap, dan (D) embrio dewasa berumur \pm 3 bulan hasil inisiasi yang siap diperbanyak



Gambar 4. Perbanyakan embrio melalui subkultur embrio tunggal. (A) embrio tunggal yang dipersiapkan untuk perbanyakan, (B) embrio hasil perbanyakan dari embrio tunggal 1,5 bulan setelah kultur, dan (C) embrio dewasa yang siap untuk diperbanyak melalui subkultur

horizontal/mendatar di atas permukaan media dan posisikan bekas irisan kuncup bunga berada pada posisi di atas. Isi satu botol kultur dengan 1 – 4 rachis per botol, tergantung dari besar kecilnya ukuran botol kultur. Botol kultur kemudian disimpan pada ruang gelap selama 1 – 1,5 bulan, dan dipindahkan pada tempat terang dengan 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ hingga embrio menjadi dewasa/masak, selama ± 3 bulan. Pada tahap ini dari satu embrio akan dihasilkan embrio baru antara 3 – 12 embrio, tergantung respon varietas.

Perbanyakan Embrio

Perbanyakan embrio dilakukan dengan cara memisahkan embrio dewasa yang dihasilkan pada tahap inisiasi satu per satu dengan hati-hati agar tidak merusak/melukai permukaan embrio. Embrio yang sudah dipisahkan selanjutnya ditanam tegak lurus pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,75 mg/l TDZ, 0,25 mg/l BAP, 20 g/l sukrosa, dan 7 g/l agar swallow, di mana bagian pangkal/bawah embrio sedikit tertanam dalam media. Satu botol kultur dapat ditanam 8–12 embrio. Botol kultur yang berisi embrio kemudian disimpan dengan cara yang sama seperti tahap inisiasi embrio. Perbanyakan embrio dengan cara subkultur embrio tunggal dapat dilakukan 4–6 kali subkultur. Penurunan konsentrasi hormon TDZ dapat dilakukan sesuai respons pembentukan embrio pada tahap subkultur. Pada tahap ini dari satu embrio akan dihasilkan embrio baru antara 3–15 embrio, tergantung respon varietas.

Perkecambahan Embrio dan Penyiapan Plantlets

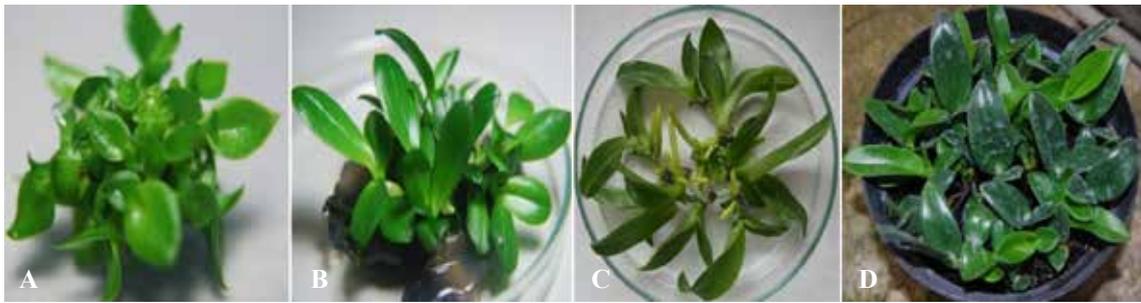
Perkecambahan embrio dilakukan dengan cara menanam embrio hasil perbanyakan pada

medium $\frac{1}{2}$ MS dengan vitamin penuh dengan 20 g/l sukrosa dan 7 g/l agar swallow atau medium Growmore (2 g/l 32N:10P:10K) atau Hyponex (1 g/l 6,5 N: 4,5 P: 19 K + 2 g/l 20 N: 20 P: 20 K) yang ditambah dengan 100 ml/l air kelapa. Tiap botol dapat diisi dengan 15 – 30 embrio tergantung ukuran botol kultur dan luas permukaan media. Botol kultur yang berisi embrio kemudian disimpan pada tempat terang dengan 16 jam fotoperiode dan intensitas yang sama selama ± 2 bulan masa simpan. Pada tahap ini keberhasilan perkecambahan embrio berkisar antara 65 – 85%.

Embrio yang berkecambah tidak selalu disertai dengan pembentukan akar yang maksimal. Oleh karena itu untuk meningkatkan pertumbuhan kecambah embrio dan menyiapkan plantlet yang baik untuk proses aklimatisasi, kecambah embrio ditanam ulang pada medium yang sama yang telah ditambah dengan 2 g/l arang aktif. Tiap botol kultur diisi dengan 5 – 25 kecambah embrio, tergantung ukuran botol dan luas permukaan media. Botol kultur selanjutnya disimpan seperti tahap perkecambahan embrio selama ± 2 bulan. Pada tahap ini, kecambah embrio umumnya tumbuh dengan 2–5 daun dengan 2–4 akar yang siap untuk diaklimatisasi pada akhir masa inkubasi.

Aklimatisasi Plantlets

Aklimatisasi plantlets merupakan tahap kritical lain pada perbanyakan anggrek menggunakan kultur jaringan. Kualitas plantlets dan cara penanganan yang baik menjadi kunci keberhasilan tahap ini. Plantlets yang baik untuk proses aklimatisasi adalah plantlets yang sehat, tumbuh vigor, daun hijau-hijau gelap dan ujung



Gambar 5. Perkecambahan, penyiapan, dan aklimatisasi plantlets. (A) embrio berkecambah pada medium $\frac{1}{2}$ MS dengan vitamin penuh, (B) plantlets yang tumbuh baik pada medium yang ditambah arang aktif, (C) plantlets siap aklimatisasi, dan (D) plantlets hasil aklimatisasi

Tabel 1. Beberapa klon *Phalaenopsis* yang berhasil diperbanyak dengan rachis hasil kegiatan penelitian 2012

Kode silangan	Embrio hasil inisiasi	Embrio hasil perbanyakan
KD 69.11	4	64
KD 27.1	3	24
KD 69.274	10	256
KD 69.262	3	34
KD 58.137	6	145
KD 182.69	9	235
KD 58.67	3	32
KD 58.115	6	78
D 802-14	8	256
D 804-23	9	221
D 816-69	12	341
D 815-23	5	121
D 814-52	3	21
D 814-51	6	128
D 802-9	4	56
D 802-5	3	27
D 819-164	9	243
D 817-2	3	29
D 804-50	3	13
D 814-82	4	34
D 816-18	8	86

akar yang mengilap. Proses aklimatisasi plantlet dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Keluarkan plantlets dari dalam botol menggunakan pinset dan letakkan di atas piring/wadah lainnya
2. Bersihkan akar dari sisa-sisa agar yang melekat dengan air mengalir
3. Rendam akar plantlets dalam 1% larutan fungisida dan bakterisida selama 3 menit

untuk menghindarkan plantlets dari busuk plantlets oleh jamur maupun bakteri

4. Kering-anginkan plantlets di atas kertas beberapa saat
5. Siapkan pot/bak plastik dan isi dengan media pakis dan siram dengan air bersih secukupnya
6. Tanam plantlets dalam pot/bak plastik yang berisi pakis dan tutup seluruh akar dengan pakis
7. Letakkan pot/bak plastik yang berisi plantlets pada tempat yang teduh, namun masih cukup cahaya
8. Biarkan plantlets hingga beradaptasi dan tumbuh dengan baik
9. Penyiraman dilakukan sesuai kebutuhan, baik pada plantlets maupun media tanamnya.

Keberhasilan aklimatisasi ditandai dengan terus tumbuhnya plantlets selama masa aklimatisasi yang terlihat dengan adanya pertambahan panjang lebar daun, panjang akar, dan jumlah daun maupun akar. Tingkat keberhasilan aklimatisasi bervariasi antara 50 – 100%, namun jika seluruh persyaratan aklimatisasi terpenuhi dan prosesnya ditangani dengan baik, keberhasilan aklimatisasi yang tinggi hingga 100% dapat dengan mudah dicapai.

Potensi Produksi Benih

Potensi produksi benih berkualitas yang dihasilkan menggunakan teknologi ini cukup menjanjikan. Jika dari satu sumber eksplan dalam bentuk rachis rerata menghasilkan embrio hingga lima embrio pada tahap inisiasi, kemudian pada tahap perbanyakan tiap embrio tunggal

yang disubkultur rerata juga menghasilkan lima embrio per 3 bulan, maka dalam waktu 1 tahun akan dihasilkan 625 embrio. Jika persentase perkecambahan embrio mencapai 80% dan berhasil disiapkan menjadi plantlets, maka akan dihasilkan 500 plantlets. Jika keberhasilan aklimatisasi mencapai 80%, maka akan dihasilkan 400 tanaman hasil aklimatisasi dari satu sumber eksplan yang berhasil diinisiasi dalam waktu 16 bulan karena ada penambahan waktu untuk penyiapan plantlets dan proses aklimatisasi \pm 4 bulan. Teknologi ini telah berhasil diaplikasikan pada perbanyakan klon-klon terseleksi *Phalaenopsis* hasil pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Hias dengan tingkat keberhasilan yang berbeda.

KESIMPULAN

Teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* menggunakan rachis sebagai sumber eksplan merupakan teknologi penyediaan benih berkualitas yang potensial dikembangkan dan diaplikasikan pada berbagai jenis *Phalaenopsis*. Aplikasi dimulai sejak pemilihan tanaman induk, penyiapan sumber dan sterilisasi eksplan, inisiasi, perbanyakan dan perkecambahan embrio, penyiapan dan aklimatisasi plantlets. Satu siklus produksi memerlukan waktu 16 bulan, dan satu eksplan menghasilkan lebih kurang 400 tanaman hasil aklimatisasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gnasekaran, P, Poobathy, R, Mahmood, M, Samian, MR & Subramaniam, S 2012, 'Effects of complex organic additives on improving the growth of PLBs of *Vanda* Kasem's Delight', *Aust. J. Crop Sci.*, no. 6, pp. 12-8
2. Ishii Y, Takamura T, Goi, M & Tanaka, M 1998, Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*', *Plant Cell Reps*, no. 17, pp. 446-50.

3. Murdad, R, Hwa, KS, Seng, CK, Latip, MA, Aziz, ZA & Ripin, R 2006, 'High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique', *Sci. Hort.*, no. 111, pp. 73-9.
4. Murdad, R, Latip, MA, Aziz, ZA & Ripin, R 2010, 'Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*', *Asia-Pac. J. Mol. Biol*, vol. 11, no.1 pp. 199-202
5. Niknejad, A, Kadir, MA & Kadzimin, SB 2011, 'In vitro plant regeneration from protocorms like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (Epidendroideae: Orchidaceae)', *Afr J Biotechnol*, vol. 10. no 56, pp. 11808-5616.
6. Park, SY, Murthy, HN & Paek, KY 2002, 'Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk derived leaves', *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, no. 38, pp. 168-72.
7. Plasmeijer, J & Yanai, Y 2012, 'Floriculture products report, issue No. M12-2011, 9 January 2012, Market News Service of International Trade Center.
8. Rittirat, S, Thammasiri, K & Te-chato, S 2014, 'Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume and Rechb. f', *J. Agric Technol*, vol.8, no.6 pp. 2075-85.
9. Tavares, AR, Young, JLM, Ori SS, Kanashiro, S, Lima, GPP, Chu, EP & Suzuki, RM 2012, 'Orchid *in vitro* growth as Affected by nitrogen levels in the culture medium', *Hortic Bras*, no. 30, pp. 119-24.

Budi Winarto

Balai Penelitian Tanaman Hias
 Jln. Raya Ciharang-Segunung, Pacet Cianjur,
 PO Box 8 SDL, Jawa Barat 43253
 E-mail: budi_winarto67@yahoo.com