

INDUKSI KALUS PADA TANAMAN ANGGREK
***Vanda tricolor* Lindl. Var. *Suavis*, UPAYA PENYEDIAAN TARGET TRANSFORMASI**
MELALUI *Agrobacterium tumefaciens*

Rindang Dwiyani

Jurusan Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana
Jalan P.B. Sudirman, Denpasar. Telp. 0361 222 450
E-mail: rindangdwiyani@yahoo.co.id

ABSTRACT

CALLI INDUCTION ON *Vanda tricolor* ORCHIDS, PRODUCING TARGET FOR AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION. 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, 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*.

BAHAN DAN METODE

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.

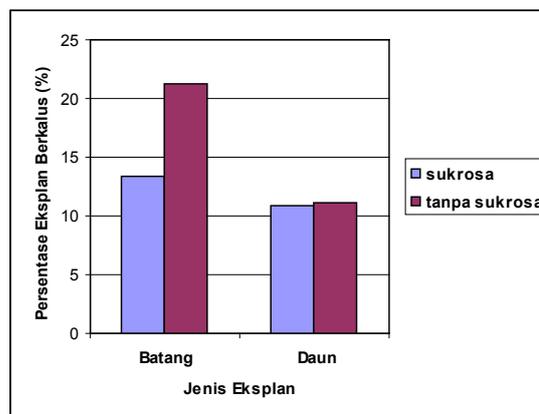
Percobaan terdiri dari 2 faktor, yaitu macam organ sebagai faktor 1 dan macam media sebagai faktor 2. Irisan organ berupa batang utuh (1,0 – 2,0 cm) dan daun utuh (0,5 – 1,0 cm) ditanam pada media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah 2 ppm 2,4-D untuk induksi kalus. Media dibuat dengan pH 5,6-5,8 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

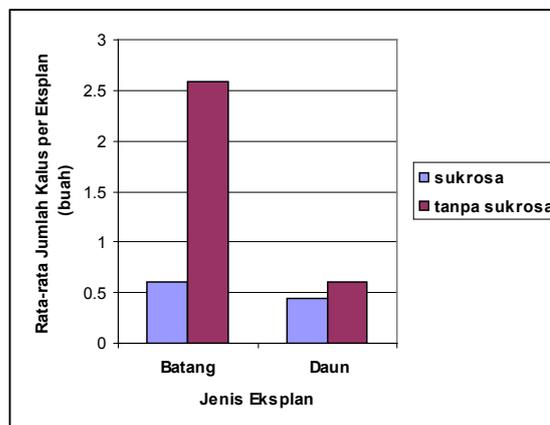
Jika dilihat dari faktor jenis eksplan, eksplan batang memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan eksplan daun terhadap dua peubah yang diamati, baik pada media dengan gula maupun tanpa gula (sukrosa). Dari faktor media, media tanpa gula memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan media dengan gula.

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 0,15µM NAA dan 5 µM 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 Arditti dan Ernst (1993) yang menyebutkan bahwa mikropropagasi anggrek *Vanda* dapat dilakukan pada media tanpa gula.

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

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.

UCAPAN TERIMAKASIH

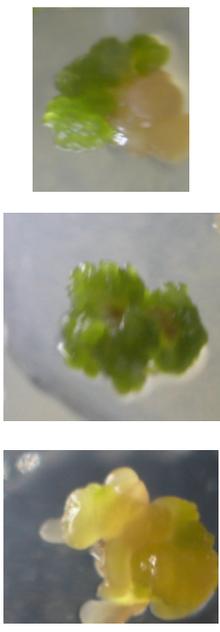
Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan (preliminary research) dari penelitian Hibah Bersaing (Desentralisasi) 2013. Ucapan terimakasih yang setinggi-tingginya disampaikan penulis kepada Departemen Pendidikan dan Kebudayaan melalui Dirjen Dikti dan LPPM UNUD atas dana Hibah Bersaing 2013 yang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

DAFTAR PUSTAKA

- Alimohammadi, M. and M.B. Bagherih-Najjar. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants : Basic principles and influencing factors. *African J. Biotechnol.* 8 : 5142-5148.
- Arditti, J. and A.D. Krikorian. 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. 689 p.
- Arditti, J. and R. Ernst. 1993. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 682 p.
- Banks, D.P. 1999. *Tropical Orchids of Indonesia*. Periplus Edition (HK) Ltd, Singapore. 64p.
- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1983. *Plant Tissue Culture. Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo. 502 p.
- Departemen Pertanian RI. 2007. *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis: Rangkuman Kebutuhan Investasi*. Edisi Kedua. 83 p.
- Desjardins, Y., C. Hdider, and J. de Riek. 1995. Carbon nutrition *in vitro*. Regulation and manipulation of carbon assimilation in micro-propagated systems. In: Aitken-Christie, J., T. Kozai, M.A.L. Smith (eds) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p 441-472.
- Dwiyani, R. 2012. *Mikropropagasi Tanaman Anggrek Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali yang Membawa Gen *KNOTTED1- LIKE Arabidopsis thaliana (KNATI)*. Disertasi Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Indrianto, A. 2003. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Fakultas Biologi Universitas Gadjahmada, Yogyakarta.
- Irawati. 2002. *Pelestarian jenis anggrek Indonesia*. Buku panduan Seminar Anggrek Indonesia 2002. p 34-45.

Dwiyani: Induksi kalus pada tanaman anggrek *Vanda tricolor*

- Kannan, N. 2009. An In vitro Study on Micropropagation of Cymbidium Orchids. *Current Biotica* 3(2) : 244-250.
- Lang, N.T. and N.T. Hang. 2006. Using Biotechnological Approaches for Vanda Orchid Improvement. *Omonrice* 14: 140-143
- Lestari, E.S. 2010. Karakterisasi Morfologis dan Molekuler Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* Asal Merapi dan Bali. Skripsi. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Naing, A.H., J.D. Chung, and K.B. Lim. 2011. Plant Regeneration through Indirect Somatic Embryogenesis in *Coelogyne cristata* orchid. *Am.J.of Plant Sci.* 2: 262-267.
- Wu, C.H., Y.S. Dewir, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *J. Plant Biol.* 49: 193-199.

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