

# Regenerasi Protokorm secara *In Vitro* dan Aklimatisasi Planlet Anggrek *Cymbidium hartinahianum* J.B. Comber & Nasution (*In Vitro* Regeneration of Protocorms and Plantlet Acclimatisation of *Cymbidium hartinahianum* J.B. Comber & Nasution)

Elizabeth Handini<sup>1,2</sup>, Dewi Sukma<sup>2</sup>, Sudarsono<sup>2</sup>, dan Ika Roostika<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya, LIPI, Jl. Ir. Haji Djuanda No. 13, Paledang, Bogor Tengah, Bogor 16122 Indonesia  
Telp. (0251) 8311362; Faks. (0251) 8311362; E-mail: lizahandini@yahoo.com

<sup>2</sup>Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680 Indonesia

<sup>3</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia

Diajukan: 15 Mei 2017; Direvisi: 20 Juli 2017; Diterima: 23 Oktober 2017

## ABSTRACT

*Cymbidium hartinahianum* J.B. Comber & Nasution is an endangered Indonesian orchid. The research objectives were to obtain an appropriate medium for protocorm multiplication and a method for plantlet acclimatization of *C. hartinahianum*. In the first passage of protocorm multiplication, 0.5 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA) combined with benzyladenine (BA) (0, 5, 10, 15, 20 mg/l) were added to Knudson C (KC) medium. In the second passage, thidiazuron (TDZ) (0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l) were used. Root induction was carried out on KCA medium with addition of NAA or indole butyric acid (IBA) (0, 1, 3, 5 mg/l). The plantlets were hardened on KCA medium with addition of sucrose (0, 20, 40 g/l) and incubated at 16–18°C for 1 month, then at 22–27°C for 1 month, and moved to 27–29°C incubator for 1 month before acclimatization. The results revealed that 3.1 shoots and 11.16 protocorm-like bodies (PLBs) (survival rate of 72%) were generated on 5 mg/l of BA. Increased BA concentrations above 5 mg/l did not significantly affect the number of PLBs. The treatment of 0.3 mg/l TDZ provided 2.33 PLBs (survival rate of 99.63%). Increased TDZ concentrations above 0.3 mg/l affected PLBs number. The best treatment for root induction used 3 mg/l NAA, but there was no significance of root number with control. The best hardening treatment was incubation of the plantlets on KCA medium with 20 g/l sucrose at 16–18°C for 1 month, then transferred to 22–27°C (survival rate of 44.6%).

**Keywords:** Acclimatization, *Cymbidium hartinahianum*, orchid, protocorm, regeneration.

## ABSTRAK

*Cymbidium hartinahianum* J.B. Comber & Nasution merupakan spesies anggrek asli Indonesia yang terancam punah. Penelitian ini bertujuan menentukan formulasi media yang sesuai untuk multiplikasi protokorm dan metode aklimatisasi planlet *C. hartinahianum*. Pada tahap pertama multiplikasi protokorm, media Knudson C (KC) ditambah dengan *naphthaleneacetic acid* (NAA) 0,5 mg/l dikombinasikan dengan *benzyladenine* (BA) (0, 5, 10, 15, 20 mg/l). Pada tahap kedua, digunakan *thidiazuron* (TDZ) (0, 0,1, 0,3, 0,5 mg/l). Induksi akar dilakukan dengan menggunakan media KCA dengan penambahan NAA atau *indolebutyric acid* (IBA) (0, 1, 3, 5 mg/l). Planlet diberi perlakuan *hardening* pada media KCA dengan perlakuan sukrosa (0, 20, 40 g/l) dan diinkubasi pada 16–18°C selama 1 bulan, kemudian dipindahkan ke 22–27°C selama 1 bulan, dan selanjutnya dipindahkan ke 27–29°C selama 1 bulan sebelum aklimatisasi. Sebanyak 3,1 tunas dan 11,16 *protocorm-like body* (PLB) (daya hidup 72%) dihasilkan dengan BA 5 mg/l. Penggunaan BA lebih dari 5 mg/l tidak berpengaruh secara nyata terhadap kenaikan jumlah PLB. Perlakuan TDZ 0,3 mg/l menghasilkan 2,33 PLB (daya hidup 99,63%). Penggunaan TDZ lebih dari 0,3 mg/l menyebabkan kenaikan jumlah PLB. Induksi akar optimal pada perlakuan NAA 3 mg/l, namun jumlah akarnya tidak berbeda nyata dengan kontrol. Perlakuan *hardening* terbaik adalah inkubasi planlet pada media KCA yang ditambah gula 20 g/l di ruang kultur dengan suhu 16–18°C selama 1 bulan dilanjutkan dengan 1 bulan di ruang persiapan dengan suhu 22–27°C (daya hidup 44,6%).

**Kata kunci:** Aklimatisasi, anggrek, *Cymbidium hartinahianum*, protokorm, regenerasi.

## PENDAHULUAN

Salah satu spesies anggrek Indonesia yang berstatus terancam punah adalah anggrek Tien Soeharto atau anggrek Hartinah (*Cymbidium hartinahianum* J.B. Comber & Nasution). Anggrek ini mempunyai potensi komersial sebagai induk silangan karena mempunyai warna bunga yang menarik, yaitu hijau dengan bibir ungu, tandan bunga yang besar dan tegak. Anggrek ini hanya dapat ditemukan di dataran tinggi dan kering di Sumatra Utara. Upaya untuk mengonservasi anggrek *C. hartinahianum* telah dilakukan, namun masih terdapat kesulitan. Anggrek tanah (*terrestrial*) dengan tipe tanaman *sympodial* ini semakin sulit dijumpai di alam.

Pada umumnya, anggrek berkembang biak dengan biji. Biji anggrek sangat kecil dan tidak mempunyai endosperma (Tawaro et al. 2008). Oleh karena itu, anggrek bersimbiosis dengan mikoriza di alam. Peran mikoriza sebagai pemasok sumber karbon untuk perkecambahan benih anggrek secara umum telah dapat digantikan dengan media kultur jaringan, di antaranya media Knudson C (KC) (Rasmussen et al. 2015). Benih anggrek akan tumbuh menjadi protokorm pada media perkecambahan. Protokorm dapat membentuk protokorm sekunder (*protocorm-like body*/PLB). Protokol regenerasi protokorm anggrek *C. hartinahianum* secara *in vitro* yang efisien belum ada dan aklimisasinya masih sering mengalami kegagalan. Keterbatasan materi dalam hal ketersediaan biji sebagai bahan perbanyakan mendorong perlunya penelitian multiplikasi tunas untuk perbanyakan tanaman anggrek ini secara *in vitro*. Kultur jaringan merupakan solusi untuk mencegah hilangnya jenis-jenis anggrek di alam, yaitu membantu dalam perbanyakan skala besar (Sagaya dan Divakar 2015). Pemahaman yang baik terhadap perkecambahan dan pembentukan bibit diperlukan untuk mengonservasi populasi anggrek (Rasmussen et al. 2015).

Perbanyakan *C. hartinahianum* secara *in vitro* telah dimulai di Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya, LIPI. Penelitian berupa perlakuan fisik dengan pelukaan protokorm induk diduga dapat menginduksi multiplikasi protokorm, namun perlakuan ‘pencet dan sayat’ pada protokorm induk *C. hartinahianum* yang dilakukan oleh Handini dan Garvita (2014) masih kurang optimal karena daya hidup protokorm rendah, hanya sekitar 60%. Meskipun demikian, dari protokorm yang berhasil hidup dihasilkan lima tunas per protokorm. Penambahan *thidiazuron* (TDZ) ke dalam media yang mengandung *benzyladenine* (BA) menimbulkan pengaruh yang sinergis (Hajong et al. 2013). Penambahan TDZ pada media dilakukan bila

penggunaan BA dianggap kurang optimal. Pemberian TDZ dilakukan pada konsentrasi rendah (0,1, 0,3, 0,5 mg/l).

Aklimatisasi yang pernah dilakukan beberapa kali mengalami kegagalan karena terjadi pembusukan pada 3 bulan setelah tanam (BST). Upaya memperbaiki keragaan tanaman mulai dari semai hingga pembesaran pada tahap *in vitro* juga telah dilakukan, namun belum memberikan hasil saat diaklimatisasi. Perlakuan *hardening* atau pra-aklimatisasi pada planlet belum pernah dilakukan sehingga penelitian ini diperlukan agar persentase daya hidupnya dapat meningkat saat aklimatisasi. Pra-aklimatisasi (*in vitro hardening*) merupakan tahap mengondisikan planlet sehingga dapat meningkatkan keberhasilan aklimatisasi. Tujuan penelitian adalah menentukan formulasi media yang sesuai untuk multiplikasi protokorm dan metode aklimatisasi planlet *C. hartinahianum*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan dari bulan Januari 2015 sampai dengan Oktober 2017 dalam beberapa tahap pertumbuhan secara *in vitro*, yaitu percobaan multiplikasi protokorm, optimasi media untuk multiplikasi, induksi akar, dan aklimatisasi yang didahului dengan *hardening C. hartinahianum* secara *in vitro*.

### Multiplikasi Protokorm *C. hartinahianum* Menggunakan BA dan Optimasi dengan TDZ secara *In Vitro*

Percobaan pada tahap ini menggunakan bahan kecambah biji anggrek, yaitu protokorm. Percobaan terdiri atas dua tahap, yaitu tahap pertama berupa multiplikasi protokorm pada lima taraf konsentrasi BA (0, 5, 10, 15, 20 mg/l) dan tahap kedua berupa multiplikasi protokorm dari perlakuan terbaik pada tahap pertama ditambah dengan empat taraf konsentrasi TDZ (0, 0,1, 0,3, 0,5 mg/l). Media dasar yang digunakan adalah media KC yang ditambah unsur mikro/*Knudson C with micronutrient* (KCA). Komposisinya terdiri atas H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,056 mg/l, MoO<sub>3</sub> 0,016 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> 0,331 mg/l, dan CuSO<sub>4</sub> 0,624 mg/l (Seaton dan Ramsay 2005), ditambah gula 20 g/l, BA (0, 5, 10, 15, 20 mg/l), *naphthaleneacetic acid* (NAA) 0,5 mg/l, agar 9 g/l, dengan pH 5,6.

Pada tahap pertama, percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor yang diuji, yaitu media dan asal protokorm (dari biji dengan masa simpan 0 bulan dan 2 bulan di dalam *freezer*). Setiap kombinasi perlakuan terdiri atas empat ulangan. Setiap ulangan berupa satu botol yang berisi sepuluh protokorm. Kultur protokorm diinkubasi di ruang kultur dengan suhu 22–27°C. Peng-

amatan dilakukan setiap 1 bulan sekali hingga 6 BST terhadap peubah jumlah eksplan yang hidup (daya hidup), jumlah *protocorm-like body* (PLB) yang terbentuk, dan jumlah tunas.

Pada tahap kedua, percobaan menggunakan RAL faktorial dengan dua faktor, yaitu empat taraf konsentrasi TDZ dan dua macam media semai, yaitu media KC (ditambah bahan organik ekstrak taoge 150 g/l dan air kelapa 150 ml/l) dan media KCA. Percobaan diulang sebanyak tiga kali dan setiap ulangan berupa satu botol yang berisi lima protokorm. Pengamatan dilakukan setiap 1 bulan sekali hingga 6 BST terhadap peubah jumlah eksplan yang hidup, jumlah PLB, dan jumlah tunas.

#### **Induksi Akar *C. hartinahianum* Menggunakan IBA dan NAA secara *In vitro***

Percobaan induksi akar menggunakan eksplan tunas *C. hartinahianum* hasil regenerasi dari protokorm pada percobaan tahap pertama. Media perlakuan yang digunakan adalah media KCA tanpa zat pengatur tumbuh (ZPT) sebagai kontrol dan media KCA dengan penambahan *indole-3-butyric acid* (IBA) atau NAA dengan taraf konsentrasi 1, 3, 5 mg/l. Percobaan menggunakan RAL satu faktor, yaitu tujuh komposisi media pengakaran. Percobaan diulang sebanyak empat kali, setiap ulangan berupa satu botol yang berisi dua tunas. Pengamatan dilakukan setiap 1 bulan sekali hingga 6 BST terhadap peubah jumlah akar dan panjang akar terpanjang.

#### **Pra-aklimatisasi (*Hardening*) dan Aklimatisasi Planlet *C. hartinahianum***

Pada tahap *hardening*, proses adaptasi planlet dilakukan terhadap suhu ruang kultur. Percobaan dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri atas tiga metode *hardening* dengan tiga variasi kadar gula (0, 20, 40 g/l) pada media KCA. Planlet ditanam secara aseptik pada media. Ukuran tinggi planlet yang digunakan adalah 8–10 cm sebanyak lima tanaman per botol. Setiap perlakuan diulang sebanyak sepuluh kali. Setiap satuan percobaan terdiri atas lima tanaman. Kultur ditempatkan secara bergiliran di ruang dengan suhu yang berbeda-beda untuk adaptasi, yaitu:

1. Tipe *hardening* I: dari ruang kultur dengan suhu 16–18°C selama 1 bulan langsung diaklimatisasi.
2. Tipe *hardening* II: dari ruang kultur dengan suhu 16–18°C selama 1 bulan, dipindah ke ruang persiapan dengan suhu 22–27°C selama 1 bulan, selanjutnya diaklimatisasi.

3. Tipe *hardening* III: dari ruang kultur dengan suhu 16–18°C selama 1 bulan dipindahkan ke ruang persiapan dengan suhu 22–27°C selama 1 bulan, selanjutnya dipindahkan ke luar laboratorium dengan suhu 27–29°C. Tanaman diaklimatisasi setelah 1 bulan.

Aklimatisasi dilakukan secara serempak dari tipe *hardening* masing-masing dengan cara planlet dikeluarkan dan dicuci. Planlet direndam dalam campuran larutan fungisida (Benlate®) dan bakterisida (Agrept®) masing-masing 1 g/l selama 10 menit untuk melindungi dari patogen. Planlet ditanam di dalam gelas plastik bening yang dilubangi. Media aklimatisasi yang digunakan adalah *sterofoam* dan *moss*. Planlet kemudian disimpan di dalam boks plastik dan disungkup rapat dengan plastik agar dapat bertahan hingga 10 hari (Pradhan et al. 2014). Penyiraman dilakukan setelah bibit dikeluarkan dari boks dan dipindahkan ke meja dengan naungan plastik di dalam rumah paranet. Penyiraman dilakukan seperlunya (tidak terlalu basah) karena kondisi dinding sel dalam hipokotil tanaman masih beradaptasi. Pemeliharaan dilakukan dengan menyemprotkan vitamin B1 selama 6 bulan.

Pengamatan dilakukan terhadap persentase kelulusan planlet yang diamati pada setiap tahap perpindahan ruangan, awal aklimatisasi atau 0 bulan setelah aklimatisasi (BSA) dan 1 BSA. Jumlah stomata dihitung dengan cara diamati di bawah mikroskop pada sampel daun yang ditempel dengan selotip dan dikerok hingga tersisa lapisan epidermis daun (Papuangan dan Djurumudi 2014). Kandungan klorofil tanaman diamati sebelum dan setelah aklimatisasi dengan *CCM-200 plus Chlorophyll Content Meter*. Jumlah planlet yang hidup diamati hingga 6 BSA.

#### **Analisis Statistik**

Data dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA. Dalam percobaan faktorial, jika terdapat interaksi yang nyata antarfaktor maka perlakuan terbaik ditentukan melalui respons yang terbaik. Jika interaksi antarfaktor tidak nyata maka ditentukan faktor tunggal apa yang memberikan pengaruh yang nyata. Untuk perlakuan yang memberikan pengaruh nyata dilakukan uji Tukey HSD pada taraf 5%. Analisis korelasi dan regresi dilakukan menggunakan *Microsoft Excel 2010* dan *CurveExpert 1.3* untuk menggambarkan grafik besarnya pengaruh perlakuan terhadap eksplan.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Multiplikasi Protokorm *C. hartinahianum* Menggunakan BA dan Optimasi dengan TDZ secara *In vitro***

Percobaan multiplikasi tunas menggunakan dua sumber protokorm *C. hartinahianum* dari biji dengan masa simpan 0 bulan dan 2 bulan. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa media dan masa simpan biji berpengaruh terhadap jumlah tunas, jumlah PLB, dan persentase daya hidup karena nilai  $P < 0,05$ . Hasil analisis statistik untuk interaksi antara dua faktor, yaitu masa simpan biji dan perlakuan media tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ). Hasil terbaik diperoleh dari media KCA dengan penambahan BA 5 mg/l, yaitu 3,1 tunas, 11,16 PLB, dan daya hidup 72%. Hasil terbaik menggunakan bahan protokorm dari biji dengan masa simpan 2 bulan di dalam freezer (Tabel 1).

Kultur yang diberi perlakuan BA tinggi, yaitu 10–20 mg/l, mengalami penghambatan pertumbuhan tunas seperti terlihat pada Gambar 1. ZPT merupakan senyawa organik yang dapat mempercepat pertumbuhan dan perkembangan jaringan dan organ dalam konsentrasi yang relatif rendah. Hasil penelitian Latip et al. (2010) menyebutkan bahwa penambahan BA (0,5–4 mg/l) pada anggrek *Phalaenopsis gigantea*

menyebabkan persentase pertumbuhan pro-tokorm baru menurun dari 30% menjadi 5% dalam 80 hari setelah tanam (HST). Hasil analisis regresi menunjukkan hubungan antara persentase daya hidup dan tunas dengan peningkatan BA bersifat linier dan bernilai negatif seperti terlihat pada Gambar 2A dan 2C.

Penurunan nilai persentase daya hidup dan jumlah tunas dipengaruhi oleh peningkatan BA dengan nilai  $r^2$  sebesar 0,44 atau 44% eksplan. Penurunan tersebut dipengaruhi oleh konsentrasi BA. Hubungan antara peningkatan konsentrasi BA dan jumlah PLB bersifat linier positif, namun tidak tinggi dengan nilai  $r^2 = 0,34$  atau sebesar 34% eksplan yang terpengaruh oleh peningkatan konsentrasi BA (Gambar 2B). Tingginya konsentrasi sitokinin diduga bersifat fitotoksik sehingga dapat menghambat pertumbuhan kultur. Auksin, NAA khususnya, yang dikombinasikan dengan BA telah diketahui dapat menstimulasi inisiasi tunas *C. eburneum* (Gogoi et al. 2012).

Hasil analisis statistik pada tahap optimasi multiplikasi (tahap kedua) *C. hartinahianum* dengan perlakuan media ditambah konsentrasi BA terbaik (5 mg/l) (tahap pertama), ditambah empat taraf konsentrasi TDZ (hingga 0,5 mg/l) tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah tunas, namun berpengaruh nyata terhadap peningkatan jumlah PLB dan persen-

**Tabel 1.** Persentase jumlah eksplan yang hidup (daya hidup), jumlah PLB, dan jumlah tunas *C. hartinahianum* dengan dua perlakuan pada 6 BST.

Faktor	Daya hidup (%)	Jumlah PLB	Jumlah tunas
BA (mg/l): <sup>1</sup>			
0	96,96 a	3,37 b	1,46 bc
5	72,00 b	11,16 a	3,10 a
10	75,83 b	9,50 a	1,51 b
15	75,00 b	10,14 a	0,71 bc
20	73,75 b	9,57 a	0,50 c
Masa simpan biji: <sup>2</sup>			
0 bulan simpan	65,48 b	7,94 b	0,97 b
2 bulan simpan	91,94 a	9,56 a	1,95 a
Interaksi BA × asal biji <sup>3</sup>	P = 0,81 tidak nyata		

Angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Tukey HSD.

<sup>1</sup>Media KCA ditambah lima taraf konsentrasi BA dan NAA 0,5 mg/l.

<sup>2</sup>Asal protokorm dari biji dengan masa simpan 0 bulan dan 2 bulan.

<sup>3</sup>Interaksi faktor 1 dan 2.



**Gambar 1.** Keragaan multiplikasi protokorm *C. hartinahianum* pada media KCA ditambah NAA 0,5 mg/l dengan variasi konsentrasi BA pada 6 BST. Lima taraf konsentrasi BA: A = 0 mg/l, B = 5 mg/l, C = 10 mg/l, D = 15 mg/l, E = 20 mg/l.

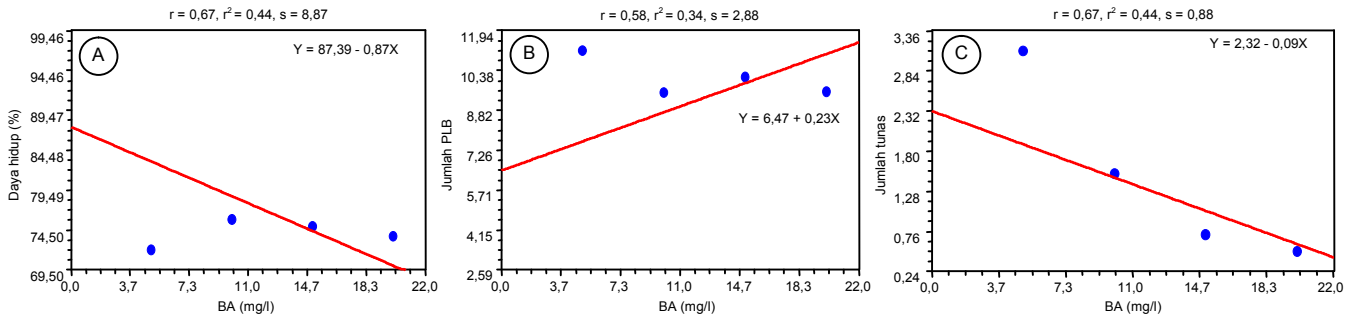
tase daya hidup per eksplan. Hasil optimal diperoleh pada konsentrasi TDZ 0,3 mg/l, yaitu 2,33 PLB dan daya hidup 99,63% (Tabel 2).

Hasil analisis regresi pada pengaruh konsentrasi TDZ menunjukkan bahwa perbedaan media semai asal bibit yang digunakan, yaitu KC dan KCA, tidak berpengaruh nyata, baik terhadap persentase daya hidup, jumlah PLB maupun jumlah tunas, dengan  $P > 0,05$ . Peningkatan konsentrasi TDZ sangat berpengaruh positif terhadap jumlah PLB. Sekitar 92% eksplan terpengaruh peningkatan jumlah PLB-nya seiring dengan peningkatan konsentrasi TDZ. Peningkatan konsentrasi TDZ memengaruhi 61% eksplan yang menurun persentase daya hidupnya (Gambar 3).

Penggunaan TDZ masih mampu meningkatkan jumlah PLB daripada penggunaan BA seperti terlihat

pada Gambar 4. Penelitian Latip et al. (2010) juga membuktikan bahwa penambahan TDZ pada konsentrasi rendah (0,1–0,3 mg/l) dapat meningkatkan persentase proliferasi protokorm secara nyata mulai dari 58% hingga 66% dalam 80 HST.

Aplikasi TDZ pada beberapa tanaman lebih efektif daripada senyawa golongan adenin, yaitu untuk menginduksi tunas aksilar atau adventif. Auksin dan sitokinin, keduanya dibutuhkan dalam pertumbuhan dan morfogenesis (Gaspar et al. 1996). Suatu proses pertumbuhan dan perkembangan kultur tidak hanya dipacu oleh satu ZPT saja, tetapi dapat dikombinasikan dengan ZPT lain dengan rasio yang terkecil bergantung pada tahapan pertumbuhan dan perkembangan.

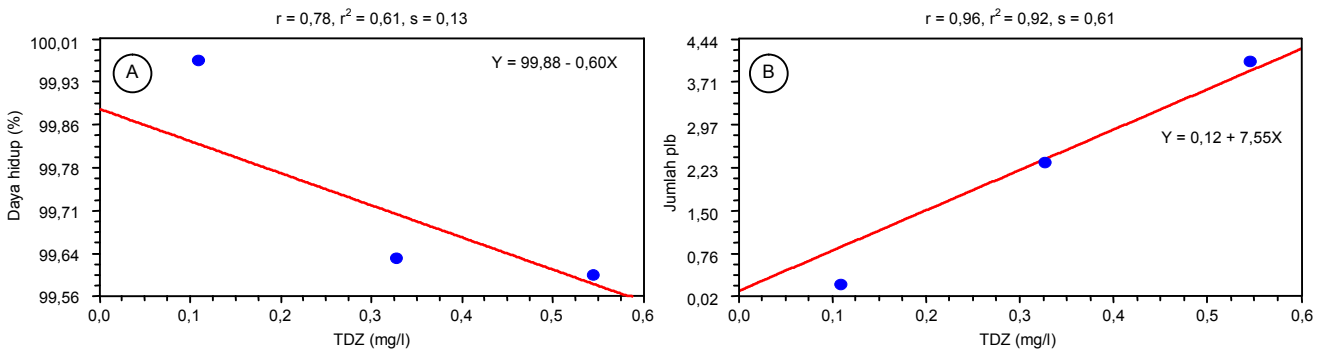


**Gambar 2.** Hasil analisis regresi antara media KCA ditambah NAA 0,5 mg/l dengan variasi konsentrasi BA pada tahap multiplikasi *C. hartinahianum* pada 6 BST. A = persentase daya hidup, B = jumlah PLB, C = jumlah tunas.

**Tabel 2.** Persentase daya hidup dan jumlah PLB pada optimasi media multiplikasi protokorm *C. hartinahianum* (KCA ditambah NAA 0,5 mg/l dan BA 5 mg/l) dengan variasi konsentrasi TDZ pada 6 BST.

TDZ (mg/l)	Daya hidup (%)	Jumlah PLB
0,0	99,80 ab	0,66 bc
0,1	99,97 a	0,23 c
0,3	99,63 ab	2,33 ab
0,5	99,60 b	4,06 a

Angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Tukey HSD.



**Gambar 3.** Hasil analisis regresi antara media *C. hartinahianum* (KCA ditambah NAA 0,5 mg/l dan BA 5 mg/l) dan variasi konsentrasi TDZ pada optimasi media multiplikasi protokorm pada 6 BST. A = persentase daya hidup, B = jumlah PLB.

**Tahap Induksi Akar**

Hasil analisis statistik untuk tahap induksi akar *C. hartinahianum* menunjukkan bahwa konsentrasi IBA dan NAA masing-masing sebesar 0, 1, 3, 5 mg/l tidak memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah akar dan panjang akar. Meskipun demikian, perlakuan paling optimal untuk induksi akar ini adalah NAA 3 mg/l pada media KCA (Gambar 5) karena memiliki jumlah dan panjang akar paling tinggi. Planlet masih mampu menumbuhkan akar pada media tanpa ZPT seperti terlihat pada Gambar 6, namun kualitas perakarannya terlihat lebih muda (hijau) dan mudah patah dibanding dengan NAA 3 mg/l yang memiliki akar tua (putih) dan liat (tidak mudah patah).

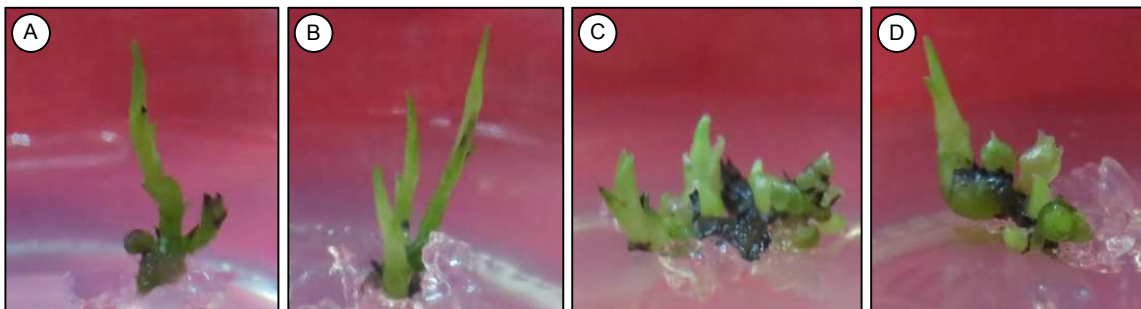
Penelitian Tao et al. (2011) tentang pengaruh ZPT pada perbanyakan *in vitro* anggrek *C. faberi* mendapatkan konsentrasi terbaik untuk induksi akar dengan menggunakan IBA 0,5 mg/l. Tunas adventif yang diuji telah mencapai 2–3 cm dapat disubkultur ke media perakaran untuk membentuk akar. Menurut Bhattacharjee dan Islam (2014), untuk perakaran dapat digunakan beberapa ZPT, seperti 3-indoleacetic

acid (IAA), IBA, dan NAA masing-masing 0,5–2 mg/l. Kondisi kurang nutrisi juga dapat menginduksi perkembangan akar pada beberapa jenis anggrek (Hossain dan Pathak 2009).

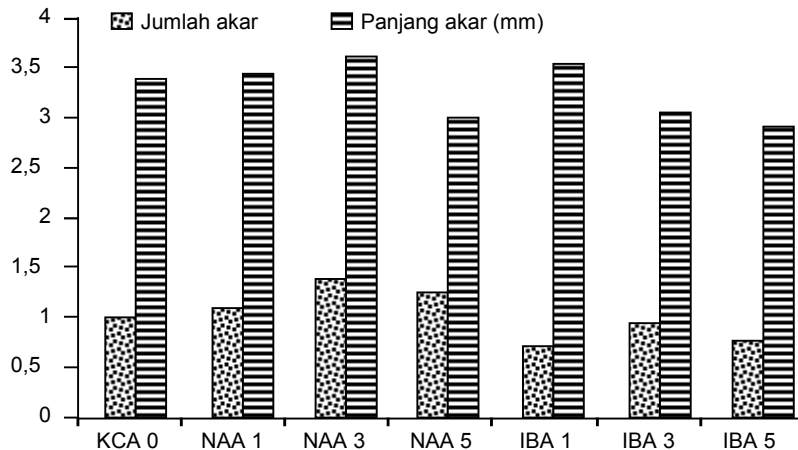
**Tahap Hardening dan Aklimatisasi**

Kondisi planlet berdasarkan media *hardening* dapat dilihat pada ketiga tipe setelah 10 hari disungkup plastik secara rapat yang menunjukkan perbedaan, terutama pada tipe *hardening* III. Planlet tipe *hardening* III pada media KCA dengan gula 0 g/l sebagai kontrol terlihat makin layu dan membusuk. Planlet tipe ini pada media KCA dengan gula 20 g/l dan 40 g/l masih menunjukkan ketegaran, meskipun terdapat daun yang layu (Gambar 7).

Hasil analisis statistik terhadap peningkatan persentase kelayuan, yaitu jumlah daun yang layu dari total daun yang ada selama 1 BSA dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan media, namun tidak nyata oleh tipe *hardening*. Peningkatan persentase daya hidup dipengaruhi oleh kedua faktor, yaitu media dan tipe *hardening*, namun interaksi kedua faktor tidak berpengaruh nyata. Media *hardening* terbaik hingga 1 BSA



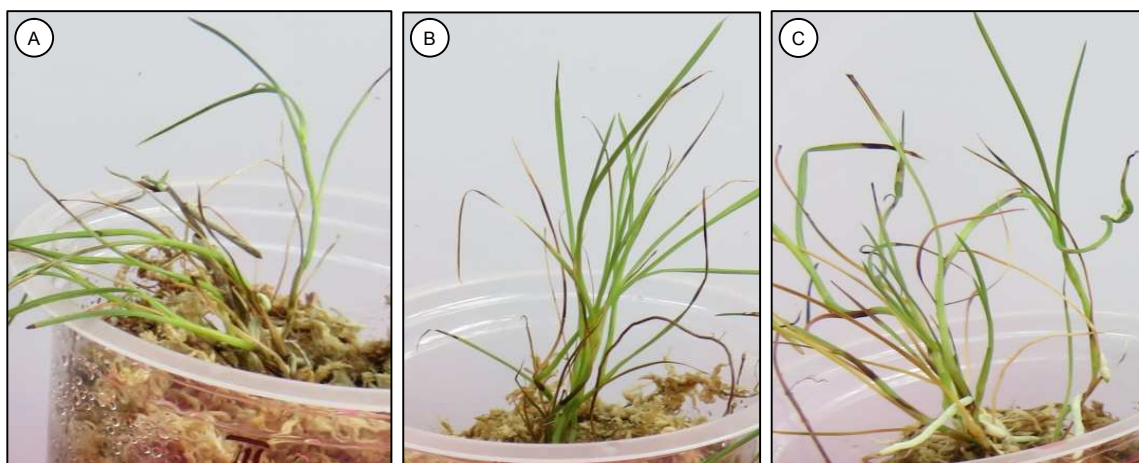
**Gambar 4.** Pertumbuhan dan perkembangan tahap multiplikasi tunas *C. hartinahianum* pada media KCA ditambah BA 5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l dengan variasi konsentrasi TDZ pada 6 BST. Empat taraf konsentrasi TDZ: A = 0 mg/l, B = 0,1 mg/l, C = 0,3 mg/l, D = 0,5 mg/l.



**Gambar 5.** Jumlah dan panjang akar planlet *C. hartinahianum* pada media KCA dengan penambahan IBA dan NAA pada 5 BST.



**Gambar 6.** Hasil induksi akar *C. hartinahianum* pada media KCA ditambah ZPT auksin hingga 6 BST yang menunjukkan tidak berbeda nyata. Atas: ditambah IBA, bawah: ditambah NAA. Empat taraf konsentrasi IBA atau NAA: A = 0 mg/l, B = 1 mg/l, C = 3 mg/l, D = 5 mg/l.



**Gambar 7.** Kondisi planlet *C. hartinahianum* pada tipe *hardening* III setelah 10 hari disungkup. Tiga taraf kadar gula: A = 0 g/l, B = 20 g/l, C = 40 g/l.

adalah KCA dengan gula 40 g/l dengan persentase daya hidup tertinggi (98,67%) dan peningkatan kelayuan terendah (23,37%). Tipe *hardening* terbaik hingga 1 BSA adalah tipe *hardening* II dengan per-

sentase daya hidup 89,40% (Tabel 3). Kondisi ini menunjukkan bahwa planlet menemukan adanya sumber energi yang besar dari gula sehingga dapat melaksanakan proses fotosintesis yang normal.

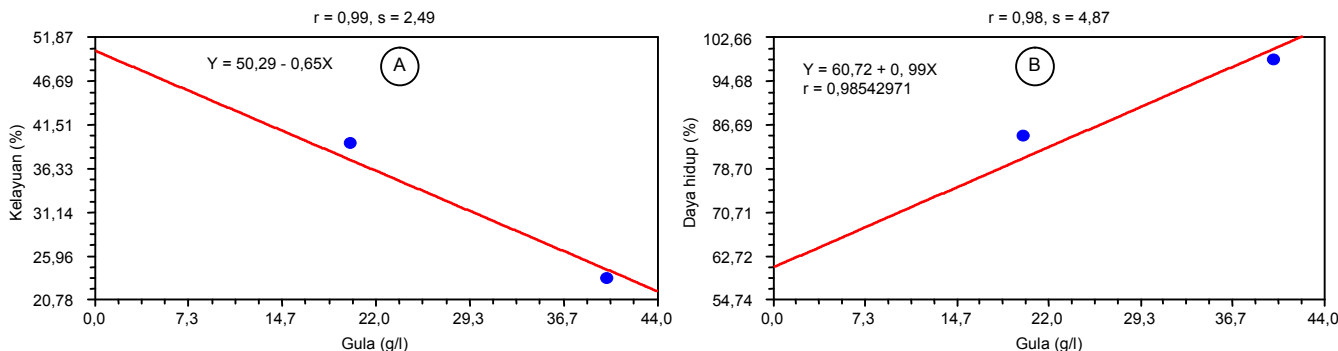
Hasil analisis regresi dan korelasi antara media dengan persentase kelayuan dan daya hidup menunjukkan hubungan yang erat. Persentase kelayuan daun menurun tajam seiring dengan meningkatnya kadar gula dalam media dengan koefisien korelasi ( $r = 0,99$ ). Jumlah planlet yang terpengaruh tingkat kelayuannya juga banyak, yaitu 98%. Persentase daya hidup meningkat tajam selaras dengan meningkatnya kadar gula media ( $r = 0,98$ ). Jumlah planlet yang terpengaruh mempunyai daya hidup sekitar 97%. (Gambar 8).

Kondisi planlet yang digunakan pada umumnya homogen, ditinjau dari jumlah stomata yang tidak berbeda nyata antar perlakuan media dengan  $P = 0,62$  untuk perlakuan media dan  $P = 0,85$  untuk tipe *hardening* dari pengamatan sebelum dan setelah aklimatisasi (1 BSA). Hasil pengukuran klorofil pada daun sampel planlet dari tipe *hardening* II pada waktu sebelum dan setelah aklimatisasi menunjukkan kandungan klorofil yang paling tinggi pada media KCA dengan gula 20 g/l, yaitu 1,19 *chlorophyll content index* (CCI) (Tabel 4). Hasil analisis regresi kandungan klorofil pada tipe *hardening* II dan media ternyata

**Tabel 3.** Persentase planlet layu dan hidup pada tahap aklimatisasi *C. hartinahianum* pada tiga perlakuan gula dan tipe *hardening*.

Faktor	Planlet layu (%)	Planlet hidup (%)
Gula (g/l):		
0	49,28 a	58,73 a
20	39,38 a	84,67 b
40	23,37 b	98,67 c
Tipe <i>hardening</i> :		
I	34,28	86,67 a
II	33,62	89,40 a
III	44,13	66,00 b

Angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Tukey HSD.



**Gambar 8.** Hasil regresi antara media *hardening* *C. hartinahianum* (KCA ditambah gula 0, 20, 40 g/l) dan kelayuan pada 1 BSA. A = planlet layu (%), B = planlet hidup (%).

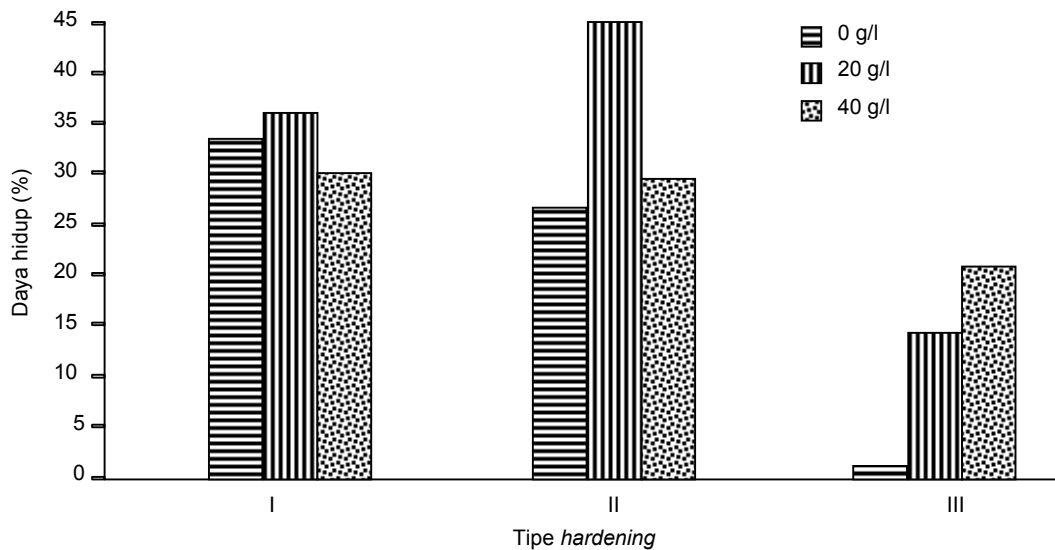
**Tabel 4.** Kandungan klorofil pada daun *C. hartinahianum* sebelum dan setelah aklimatisasi pada tiga tipe *hardening*.

Faktor	Tipe Hardening		
	I	II	III
Gula (g/l):			
0	1,04	1,11 ab	1,12
20	1,07	1,19 a	1,07
40	1,10	1,07 b	1,06
Waktu:			
0 BSA	1,07	1,15	1,12 a
1 BSA	1,07	1,09	1,04 b

BSA = bulan setelah aklimatisasi.

Angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Tukey HSD.





**Gambar 9.** Daya hidup planlet *C. hartinahianum* pada tiga tipe *hardening* dengan variasi taraf kadar gula pada 6 BSA.

lemah dan hanya 10% planlet yang terpengaruh perlakuan media sehingga tidak dapat digunakan sebagai data pendukung. Klorofil berfungsi sebagai tempat menyimpan energi cahaya dalam proses fotosintesis, sedangkan sukrosa berfungsi sebagai sumber karbon organik dalam proses pertumbuhan tanaman.

Kondisi planlet terlihat paling baik setelah 6 BSA pada tipe *hardening* II dengan gula 20 g/l. Gula pada media sangat berperan dalam menjaga ketegaran tanaman yang terlihat pada kondisi planlet tipe *hardening* III (Gambar 9).

### KESIMPULAN

Penelitian ini mengawali perbanyakan massal *C. hartinahianum* yang dimulai dari multiplikasi protokorm menggunakan media dasar KCA dengan BA 5 mg/l dan induksi akar hingga tahap pembesaran pada media KCA dengan gula 20 g/l, dilanjutkan dengan perlakuan *hardening* selama 2 bulan dengan suhu 16–27°C pada media KCA dengan gula 20 g/l kemudian diaklimatisasi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya, LIPI.

### DAFTAR PUSTAKA

Bhattacharjee, B. & Islam, S.M. (2014) Effects of plant growth regulators on multiple shoot induction in *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. Ex G. Don, an endangered medicinal orchid. *International Journal of Science and Nature*, 5 (4), 707–712.

Gaspar, T., Kever, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. & Thorpe, T.A. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32, 272–289.

Hajong, S., Kumaria, S. & Tandon, P. (2013) Effect of plant growth regulators on regeneration potential of axenic nodal segments of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1425–1435.

Handini, E. & Garvita, V. (2014) *In vitro* culture of propagation *Cymbidium hartinahianum*. Dalam: Kartika, J.G., Suwarno, W.B., Ardhi, S.W., Sanura, P.E. & Fitriana (editor) *Membangun Sistem Baru Agribisnis Hortikultura Indonesia pada Era Pasar Global. Prosiding Seminar Ilmiah PERHORTI (2013)*. hlm. 702–708.

Hossain, M.M. & Pathak, M.S.P. (2009) Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.- a medicinally important orchid. *Engineering in Life Sciences*, 9 (6), 444–453.

Gogoi, K., Kumaria, S. & Tandon, P. (2012) *Ex situ* conservation of *Cymbidium eburneum* Lindl.: A threatened and vulnerable orchids, by asymbiotic seed germination. *3 Biotech*, 2, 337–343.

Latip, M.A., Murdad, R., Aziz, Z.A., Ting, L.H., Govidasamy, L.M. & Ripin, R. (2010) Effect of N<sup>6</sup>-benzyladenine and thidiazuron on proliferasi *Phalaenopsis gigantea* protocorms. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 18 (1), 217–220.

Papuangan, N., Nurhasanah & Djurumudi, M. (2014) Jumlah dan distribusi stomata pada tanaman penghijauan di kota Ternate. *Jurnal Bioedukasi*, 4 (1), 287–292.

Pradhan, S., Tiruwa, B., Subedee, B.R. & Pant, B. (2014) *In vitro* germination and propagation of a threatened medicinal orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.

- through artificial seed. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (12), 971–976.
- Rasmussen, H.N., Dixon, K.W., Jersakova, J. & Tesitelova, T. (2015) Viewpoint: Part of highlight in orchid biology. Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116, 391–402.
- Sagaya, S. & Divakar, M. (2015) *In vitro* seed germination studies and flowering in micropropagated plantlets of *Dendrobium ovatum* Lindl. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 1 (3), 04–09.
- Tao, J., Yu, L., Kong, F. & Zhao, D. (2011) Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe. *African Journal of Biotechnology*, 10 (69), 15639–15646.
- Tawaro, S., Suraninpong, P. & Chanprame, S. (2008) Germination and regeneration of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. on a medium supplemented with some organic sources. *Walailak Journal of Science and Technology*, 5 (2), 125–135.
-