

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Dendrobium antennatum*

1. Klasifikasi dan penyebaran

Menurut Dressler (1990: 201--231) klasifikasi *Dendrobium antennatum*

Lindl. ialah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Classis : Monocotyledoneae
Ordo : Liliales
Family : Orchidaceae
Subfamily : Epidendroideae
Tribe : Epidendreae
Subtribe : Dendrobiinae
Genus : *Dendrobium*
Spesies : *Dendrobium antennatum*

Dendrobium antennatum memiliki nama lain anggrek tanduk rusa (*antelope orchid*). Anggrek tersebut merupakan salah satu anggrek asli Indonesia. Penyebaran anggrek tersebut meliputi daerah *Papua New*

Guinea, Australia bagian utara dan pulau-pulau di sekitarnya (Fanfani & Rossi 1992: 41; Soon 2005: 108).

Dendrobium antennatum umumnya tumbuh di daerah dataran rendah (0--500 m dpl) hutan tropis. Anggrek tersebut tumbuh subur pada daerah bersuhu 16--19° C pada malam hari dan 24--32° C pada siang hari, dengan kisaran kelembapan antara 50% dan 80%, serta derajat keasaman media alami (pH) 7--7,5 (AOS 2007: 1).

2. Morfologi

Dendrobium antennatum merupakan anggrek epifit dan memiliki empat bagian utama, yaitu akar, batang, daun, dan perbungaan. Anggrek tersebut memiliki dua jenis akar, yaitu akar lekat dan akar gantung. Batang *D. antennatum* memiliki nodus-nodus yang terlihat jelas. Sementara itu internodus-internodus dapat terisi cadangan makanan (pati) sehingga membentuk umbi semu yang dikenal sebagai *pseudobulb* (Fanfani & Rossi 1992: 120; Comber 1994: 212). Daun *D. antennatum* merupakan daun tidak lengkap, karena tidak bertangkai daun. Daun umumnya berjumlah 4--18 helai pada setiap batang, bentuk bulat meruncing (Fanfani & Rossi 1992: 120). Perbungaan tumbuh pada ujung batang atau pada nodus batang dengan tipe *racemose*. Satu perbungaan terdiri dari 9--21 bunga. Bunga memiliki sepal mengeriting ke arah belakang, petal lateral yang tegak ke atas dan terpilin, dan labelum berwarna putih. Labelum memiliki lima *keels* dan

corak garis berwarna ungu. Tangkai bunga mengalami resupinasi (Wood 2003: 51; Soon 2005: 108) (Gambar 1).

Biji *Dendrobium antennatum* berjumlah jutaan dalam satu buah. Biji anggrek tersebut memiliki struktur yang sederhana, yaitu berupa kumpulan sel-sel homogen yang bersifat embrionik dan diselimuti oleh testa (*seed coats*). Testa merupakan lapisan sel mati memiliki struktur yang kaku dan kuat. Ukuran biji anggrek tersebut berkisar antara 0,3 mm dan 5 mm (Gandawidjaja & Sastrapradja 1980: 113; Dressler 1990: 71).

3. Sistem perbanyakan

Sistem perbanyakan konvensional pada anggrek *D. antennatum* biasanya dilakukan secara vegetatif, yaitu dengan memisahkan (memotong) tanaman anakan dari tanaman induknya. Tanaman anakan dapat berupa tunas yang tumbuh dari pangkal batang atau dapat juga berupa keiki. Keiki merupakan tunas yang tumbuh dari nodus batang atau tangkai bunga (Arditi & Ernst 1994: 467).

Perbanyakan secara generatif dapat terjadi melalui biji. Biji anggrek *D. antennatum* berkecambah secara alami dengan bantuan simbiosis mikorhiza untuk memperoleh nutrisi. Biji dapat disemai secara *in vitro* dengan menggunakan media sebagai penyedia nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan anakan (Arditi & Ernst 1994: 315).

4. Manfaat

Dendrobium antennatum biasanya digunakan dalam bentuk tanaman pot sebagai penghias ruangan atau pekarangan. Anggrek tersebut juga dapat digunakan sebagai salah satu pelengkap karangan bunga atau hiasan dekorasi dalam bentuk bunga potong. *Dendrobium antennatum* memiliki aroma yang wangi, sehingga berpotensi sebagai penghasil wangi-wangian. Selain itu, anggrek tersebut memiliki potensi sebagai tanaman obat. Potensi-potensi tersebut menyebabkan anggrek *D. antennatum* diminati oleh masyarakat (Fanfani & Rossi 1992: 120).

5. Kultur *in vitro* *Dendrobium*

Salah satu tujuan mikropropagasi adalah untuk menginduksi pertunasan. Induksi tunas anggrek *Dendrobium* dapat dilakukan secara langsung atau secara tidak langsung (Gambar 2). Induksi tunas secara langsung tidak melalui tahap pembentukan kalus. Talukder *dkk.* (2003: 1058) telah melakukan induksi tunas secara langsung dengan menggunakan eksplan tunas muda *Dendrobium*. Shiau *dkk.* (2005: 666) juga telah melakukan penelitian induksi tunas secara langsung dengan menggunakan nodus eksplan tunas muda *D. candidum* Wall. Ex. Lindl. Sementara itu, induksi tunas secara tidak langsung, terlebih dahulu melalui tahap induksi kalus sebelum membentuk tunas. Anjum *dkk.* (2006: 1738) menginduksi tunas secara tidak langsung dengan menggunakan eksplan daun *seedling*

Dendrobium malones 'Victory'. Nasiruddin *dkk.* (2003: 955) juga telah menginduksi tunas secara tidak langsung dengan menggunakan daun *D. formosanum*.

B. INDUKSI TUNAS ADVENTIF SECARA *in vitro*

Tunas adventif merupakan tunas yang tumbuh dari bagian tanaman selain dari embrio. Tunas adventif pada anggrek secara alami tumbuh pada nodus batang atau tangkai bunga. Secara *in vitro* tunas tersebut dapat diinduksi dari sel, jaringan, atau organ tanaman. Pembentukan tunas adventif secara *in vitro* dapat dilakukan pada eksplan yang bersifat diploid dan haploid. Eksplan yang bersifat diploid diperoleh dari bagian somatik tanaman, misalnya potongan daun, lapisan tipis epidermis, potongan tunas apikal, kotiledon, hipokotil, duri yang berumur muda, dan kuncup bunga atau nodus tangkai bunga. Eksplan yang bersifat haploid dapat diperoleh dari anter atau polen (Hartmant *dkk.* 2002: 657).

Proses induksi tunas secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya ialah pemilihan eksplan yang baik, pemilihan jenis media kultur yang tepat, penambahan zat organik yang sesuai, cara pemeliharaan kultur yang baik dan benar, dan penambahan zat pengatur tumbuh (auksin dan sitokinin) dengan komposisi dan konsentrasi yang tepat Park *dkk.* 2002: 168—171; Chen *dkk.* 2004: 11--15)

1. Eksplan

Eksplan merupakan bagian dari tanaman yang di kultur pada media. Perbanyak anggrek secara *in vitro* dapat dilakukan dengan menggunakan potongan daun sebagai eksplan. Daun planlet hasil perkecambahan atau induksi tunas secara *in vitro* dapat digunakan sebagai eksplan. Penggunaan eksplan hasil kultur *in vitro* tidak memerlukan proses sterilisasi, karena sudah dalam keadaan steril (Arditi & Ernst 1994: 347). Park *dkk.* (2002: 168) pernah melakukan penelitian induksi tunas dengan menggunakan eksplan daun hasil induksi tunas dari tangkai bunga *Phalaenopsis* secara *in vitro* eksplan tersebut berumur 4 minggu setelah hari tanam. Sementara itu, Chen *dkk.* (2004: 11) pernah melakukan penelitian induksi tunas dengan menggunakan planlet hasil perkecambahan secara *in vitro*. Planlet tersebut berumur 36 bulan setelah hari tanam.

2. Media

Pemilihan jenis media yang digunakan dalam kultur *in vitro* dapat menentukan keberhasilan perbanyak secara *in vitro*. Media yang baik merupakan media yang memiliki komponen yang lengkap dan komposisi yang tepat. Salah satu jenis media yang umum digunakan dalam kultur anggrek merupakan media MS (Lee & Lee 2003: 475). Media MS dapat digunakan dengan kadar makronutrien dan mikronutrien setengah dari resep aslinya ($\frac{1}{2}$ MS). Selain itu, media MS merupakan media yang lengkap,

karena di dalamnya terdapat zat-zat esensial dalam mendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Chen *dkk.* 2002: 44 & Shiau *dkk.* 2005: 666). Komposisi media $\frac{1}{2}$ MS modifikasi terdiri dari beberapa zat, di antaranya ialah:

a. Makronutrien dan mikronutrien

Makronutrien dan mikronutrien merupakan zat yang penting dan harus tersedia pada media untuk digunakan dalam kehidupan eksplan. Makronutrien dibutuhkan oleh eksplan dalam jumlah banyak, yaitu antara $0.5\text{--}3 \times 10^4$ ppm (*part per million*) dari berat kering tanaman. Sementara itu mikronutrien dibutuhkan tanaman dalam jumlah sedikit, yaitu 1--10 ppm dari berat keringnya. Unsur-unsur yang merupakan makronutrien di antaranya ialah Kalsium (Ca), Magnesium (Mg), Nitrogen (N), Fosfor (P), Kalium (K), dan Sulfur (S). Sementara itu, unsur-unsur yang merupakan mikronutrien ialah Klorida (Cl), Borium (B), Ferrum (Fe), Mangan (Mn), Zink (Zn), Cuprum (Cu), Nikel (Ni), Molibdenum (Mo), dan Cobalt (Co) (Arditi & Ernst 1994: 26,36).

Unsur-unsur makronutrien dan mikronutrien pada media tersedia dalam bentuk garam-garam organik. Pada media $\frac{1}{2}$ MS unsur-unsur makronutrien tersedia dalam bentuk NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan KH_2PO_4 . Sementara itu, unsur-unsur mikronutrien tersedia dalam bentuk KI, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, dan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

b. Vitamin dan asam amino

Tanaman pada keadaan normal dapat mensintesis vitamin yang berperan membantu proses pertumbuhan dan perkembangan. Vitamin berfungsi sebagai kofaktor pada aktivitas metabolisme sel, selain itu zat tersebut juga berperan sebagai anti oksidan dan pendukung proses proliferasi sel (Damayanti *dkk.* 2007: 52). Vitamin dibutuhkan oleh eksplan dalam kadar yang cukup, yaitu antara 0,1--1 mg^l⁻¹. Tanaman yang dikultur secara *in vitro* tidak mensintesis vitamin sebanyak dalam keadaan normal. Beberapa vitamin yang umum digunakan dalam kultur *in vitro* di antaranya merupakan *thiamine*, yang merupakan salah satu vitamin yang aktivitas biokimia terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan belum diketahui secara jelas. Beberapa contoh vitamin lainnya yaitu, *nicotinic acid*, *pyridoxine* dan Mio-inositol (Thorpe 1981: 25; George & Sherrington 1984: 213; Arditi & Ernst 1994: 40)

Selain vitamin, asam amino sangat penting bagi pertumbuhan dan perkembangan kultur dan tidak dapat digantikan oleh zat lain. Asam amino berperan dalam pembentukan enzim metabolisme dalam sel dan penyusun protein-protein dalam sel. Salah satu asam amino yang umum digunakan ialah Glisin. Glisin dapat disterilkan dengan cara sterilisasi panas (*autoclaving*), sterilisasi dingin, sterilisasi dengan filtrasi, atau dengan dilarutkan dalam pada alkohol (Arditi & Ernst 1994: 40 & Thorpe 1981: 25).

c. Sumber karbon

Sumber karbon yang umum digunakan pada media kultur *in vitro* anggrek merupakan sukrosa. Sukrosa merupakan sumber energi bagi pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Sukrosa biasanya digunakan dengan konsentrasi 2--3% pada media. Sumber karbon lain dapat digunakan sebagai pengganti sukrosa, contohnya laktosa, maltosa, galaktosa, glukosa, fruktosa, dan pati (Thorpe 1981: 24--25; Adriti & Ernst 1994: 41--42).

d. Zat pengatur tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh merupakan pemicu eksplan untuk tumbuh membentuk akar, kalus, atau tunas. Auksin dan sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang umum digunakan dalam kultur *in vitro*. Setiap sel tumbuhan memiliki auksin dan sitokinin endogen yang konsentrasinya sulit ditentukan. Sitokinin biasanya digunakan pada kisaran 0--10 ppm, sedangkan auksin biasanya digunakan pada kisaran 0--5 ppm (Earle & Demarly 1982: 40; Goralski *dkk.* 2005 : 122). Konsentrasi auksin yang lebih tinggi dari sitokinin akan memicu pertumbuhan perakaran, konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi dari auksin akan memicu pertumbuhan tunas, sedangkan konsentrasi sitokinin yang berimbang dengan auksin dalam kultur *in vitro* dapat memicu eksplan untuk membentuk kalus. Oleh karena itu untuk menginduksi pertunasan dibutuhkan sitokinin, tetapi jika sitokinin digunakan

melebihi 10 ppm dapat menyebabkan penurunan jumlah tunas yang terbentuk (Earle & Demarly 1982: 39--43; Rajasekaran *dkk.* 1987:13).

Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh pada tumbuhan yang dapat menstimulasi pembelahan dan diferensiasi sel tumbuhan. Secara alami sitokinin merupakan derivat dari adenin dan dapat dikelompokkan menjadi dua tipe, yaitu tipe adenin dan tipe phenylurea. Sitokinin tipe adenin memiliki cincin adenin sebagai bagian utama, sedangkan sitokinin tipe phenylurea memiliki struktur phenylurea sebagai bagian utama. Thidiazuron (TDZ) merupakan salah satu sitokinin tipe phenylurea sintetik yang memiliki kemampuan lebih baik dalam menginduksi tunas, di antara sitokinin lain seperti zeatin, benzylaminopurin, dan kinetin (Mok & Mok 2001: 95; Kuo *dkk.* 2005: 453). Hasil penelitian Chen *dkk.* (2004: 11) menunjukkan bahwa eksplan potongan daun *Phalaenopsis philippinensis* PH59 dapat menghasilkan jumlah tunas optimal pada perlakuan 4,54 μM (1 mg l^{-1}) TDZ. Pengurangan dan penambahan zat pengatur tumbuh tersebut dapat mengurangi jumlah tunas yang dihasilkan. Pada penelitian sebelumnya Lee & Lee (2003: 475) meneliti pertunasan dengan menggunakan eksplan kalus *Cypripedium formosanum*. Data yang dihasilkan menunjukkan bahwa perlakuan 1 mg l^{-1} TDZ menghasilkan jumlah tunas terbanyak.

Menurut Nasiruddin *dkk.* (2003: 956) dan Anjum *dkk.* (2006: 1738) benzylaminopurin merupakan salah satu sitokinin sintetik, sedangkan menurut Mok & Mok (2001: 95) benzylaminopurin merupakan sitokinin alami yang dapat disintesis. Sitokinin tersebut sering digunakan dalam kultur *in vitro*

pada berbagai jenis tumbuhan. Nasiruddin *dkk.* (2003: 956) telah meneliti pengaruh beberapa konsentrasi BAP (0; 1,25; 2,5; dan 5 mg^l⁻¹) terhadap jumlah tunas yang dihasilkan dari eksplan kalus *Dendrobium formosum*. Jumlah tunas terbanyak (2,74 tunas per plantlet) dihasilkan pada perlakuan 5 mg^l⁻¹ BAP. Pada penelitian berikutnya Anjum *dkk.* (2006: 1738) meneliti pengaruh BAP (0,5; 1; 2; dan 3 mg^l⁻¹) dalam media MS terhadap induksi perkecambahan biji *Dendrobium malones* 'Malones'. Penelitian tersebut menghasilkan perkecambahan terbanyak pada perlakuan 3 mg^l⁻¹ BAP (sebesar 100%).

Penggunaan TDZ dan BAP (tunggal) yang melebihi konsentrasi optimum dalam jumlah tunas yang dihasilkan, dapat menurunkan jumlah tunas yang terinduksi. Untuk dapat menghasilkan jumlah tunas yang lebih banyak dapat diusahakan dengan penelitian yang mengujikan pengaruh kombinasi antara kedua sitokinin tersebut atau dengan auksin (Earle & Demarly 1982: 39--43; Youmbi *dkk.* 2006: 255--259). Pengaruh kombinasi TDZ dan BAP dalam kultur *in vitro* pernah diteliti oleh Tefera dan Wannakrairoj (2006: 1894). Penelitian tersebut menggunakan tunas aksilar *Aframomum corrorima* (Braun) Jansen sebagai eksplan. Perlakuan yang diberikan ialah kombinasi TDZ (0; 0,25; 0,5; dan 0,75 mg^l⁻¹) dan BAP (0; 1,5; 3; dan 4,5 mg^l⁻¹). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa jumlah tunas terbanyak yang dihasilkan pada perlakuan zat pengatur tumbuh tunggal terhadap 0,5 mg^l⁻¹ TDZ (11,2 tunas per kultur). Jumlah tunas terbanyak pada

perlakuan kombinasi terdapat pada $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ dan 3 mg l^{-1} BAP (13,89 per kultur).

Sitokinin dapat menginduksi suatu sel melalui beberapa tahap, yaitu pengikatan sitokinin pada protein penerima atau *Cytokinin Binding Protein* (CBP) yang terdapat pada membran sel. Pengikatan tersebut mengaktifkan bagian sekitar pengikat protein yang dikenal dengan *Transmembrane Domain*. Hal tersebut menyebabkan terjadinya autofosforilasi pada kompleks protein *Histidine Kinase* (HK). Ikatan fosfat pada protein HK mengaktifkan kerja protein *Histidin Phosphotransfer* (HP). Protein HP yang telah mengikat gugus fosfat masuk ke dalam nukleus dan mengaktifkan efektor *Response Regulator* (ERR) dengan memberikan gugus fosfat kepada reseptor ERR. Efektor *Response Regulator* terdiri dari 3 bagian utama, yaitu reseptor fosfat, pengikat DNA, dan aktivator transkripsi. Setelah gugus fosfat terikat pada reseptor, bagian DNA yang terikat pada ERR akan ditranskripsi sebagai pemicu proses pembelahan sel, diferensiasi sel, dan pembentukan tunas (Lampiran 1). Hal tersebut akan mengaktifkan induksi pembelahan sel, diferensiasi sel, dan pembentukan tunas melalui transkripsi DNA (NIH 2008: 1).

Cytokinin binding protein atau protein pengikat sitokinin merupakan reseptor sitokinin yang memiliki dua sisi pengikat. Salah satu sisi pengikat digunakan untuk mengikat sitokinin tipe adenin, misalnya BAP. Sisi lainnya dapat digunakan untuk mengikat sitokinin tipe phenylurea, misalnya TDZ. Ikatan sitokinin tipe adenin dengan CBP memiliki pengaruh dalam

menstimulasi pembelahan sel. Sementara itu, TDZ dapat berperan dalam menstimulasi produksi sitokinin endogen (Tefera dan Wannakraioj 2006: 1897). Kende dan Zaavaart 1997 (lihat Tefera dan Wannakraioj 2006: 1897) lebih lanjut menjelaskan bahwa TDZ juga memiliki peran sebagai inhibitor sitokinin oksidase yang merupakan enzim menghilangkan keaktifan sitokinin tipe adenin bebas. Oleh karena itu TDZ dapat meningkatkan kerja sitokinin lain, baik sitokinin eksogen ataupun sitokinin endogen.

e. Bahan pematat

Bahan pematat berfungsi untuk memadatkan media. Tujuannya agar eksplan yang dikultur dalam keadaan yang statis. Pada media padat nutrisi terserap oleh eksplan dalam jumlah yang cukup. Setiap eksplan yang terdapat pada permukaan media padat akan mendapatkan nutrisi secara merata. Agar-agar merupakan bahan pangan yang dapat digunakan sebagai pematat dalam kultur *in vitro*, karena penggunaan agar-agar lebih ekonomis dibandingkan pematat media yang lain (*Gelrite*, *Phytoagar*, dan *Bactoagar*) (George & Sherington 1984: 184--185; Santoso & Nursandi 2003: 63).

3. Faktor lingkungan

Induksi tunas secara *in vitro* membutuhkan faktor-faktor lingkungan yang baik dan terkendali. Faktor-faktor lingkungan tersebut di antaranya ialah derajat keasaman media (pH), suhu, dan cahaya (Gunawan 1987: 85--86; Pierik 1987: 65--67). Kisaran suhu yang biasa digunakan untuk kultur *in*

vitro berkisar antara 20--27° C. Intensitas cahaya yang biasa digunakan pada kultur *in vitro* berkisar antara 40--80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$. Fotoperiode yang umum digunakan dalam kultur *in vitro* berkisar antara 12--16 jam per hari. Lampu yang digunakan untuk pencahayaan pada pemeliharaan kultur umumnya memiliki panjang gelombang 400--800 nm. Sementara itu, derajat keasaman yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* anggrek berkisar antara 5,6--5,8 (Arditi & Ernst 1994: 59--62).

