

Pengaruh Konsentrasi Hormon Paklobutrazol Terhadap Pertumbuhan Biji Sintetis Anggrek Tebu (*Grammatophyllum speciosum*) Secara *In Vitro*

Effect of Paclobutrazol Hormone Concentration on In Vitro Growth of Synthetic Seeds of Sugarcane Orchid (Grammatophyllum speciosum)

Theresia Amelia Prasayu*, Evie Ratnasari

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: theresiaprasayu98@gmail.com

Abstrak. Anggrek tebu (*Grammatophyllum speciosum*) dikenal sebagai anggrek spesies yang memiliki ciri khas perawakan dan perbungaan yang besar. Namun, keberadaannya di alam mengalami kepunahan akibat kegiatan eksploitasi, fragmentasi lahan, dan adanya kendala dalam hal perbanyakan, sehingga diperlukan teknologi biji sintetis melalui penambahan retardan paklobutrazol sebagai solusinya. Tujuan penelitian yaitu untuk mendeskripsikan pengaruh konsentrasi hormon paklobutrazol terhadap pertumbuhan biji sintetis anggrek tebu secara *in vitro*. Metode penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel manipulasi berupa konsentrasi paklobutrazol (0 mg/l, 1 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, 7 mg/l, dan 9 mg/l), menggunakan 4 kali pengulangan (setiap unit terdiri dari 10 biji sintetis). Variabel responnya berupa pertumbuhan biji sintetis anggrek tebu meliputi kondisi fisik di setiap tahap, persentase daya tembus, daya hidup, kontaminasi dan *browning*, data dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Hasil dari penelitian menunjukkan adanya pengaruh pemberian paklobutrazol dengan berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan biji sintetis *G. speciosum*. Paklobutrazol 9 mg/l adalah konsentrasi optimal dalam menghambat pertumbuhan biji sintetis *G. speciosum* dengan tingkat daya hidup tertinggi dan daya tembus, kontaminasi serta *browning* terendah saat tahap regenerasi.

Kata kunci: anggrek tebu; biji sintetis; paklobutrazol

Abstract. Sugarcane orchid (*Grammatophyllum speciosum*) is known as an orchid species with large stature and inflorescent characteristic. However, its existence in nature is experiencing extinction due to exploitation, land fragmentation, and problems in propagation, so synthetic seed technology is needed through the addition of paclobutrazol retardants as a solution. This research aimed to describe the effect of paclobutrazol hormone for *in vitro* growth synthetic seed of sugarcane orchid. The method of reserach was experimental by using Complete Randomized Design (CRD). The manipulation variable was paclobutrazol concentration (0 mg/l, 1 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, 7 mg/l, and 9 mg/l), using 4 repetitions (10 synthetic seeds in each units). The response variable was sugarcane orchid synthetic seed growth like physical condition on every stage, percentage of emergence rate, survival rate, contamination, and *browning*, data were analyzed descriptively quantitatively. The research indicated that there was effect of paclobutrazol hormone concentration for *in vitro* growth synthetic seed of *G. speciosum*. Paclobutrazol 9 mg/l is the optimal concentration which was able to inhibit growth synthetic seed of *G. speciosum* with the highest survival rate and the lowest emergence rate, contamination, and *browning*.

Key Words: sugarcane orchid; synthetic seed; paclobutrazol

PENDAHULUAN

Anggrek merupakan salah satu jenis tanaman hortikultura yang digemari oleh kalangan masyarakat karena nilai estetikanya dan prospek yang tinggi untuk dikembangkan secara komersial (Fauziah *et al.*, 2014; Mahadi, 2016). Akan tetapi, keindahan dari tanaman anggrek menjadikannya berada dalam ambang kepunahan. Menurut komunitas khusus anggrek dalam aksi penyelamatan spesies (*Species Survival Commission*) dari IUCN, penurunan populasi anggrek dikarenakan beberapa hal seperti *illegal logging*, adanya fragmentasi habitat, eksploitasi berlebih guna diperdagangkan maupun koleksi pribadi tanpa mempertimbangkan kelestariannya (Isda *et al.*, 2015; Baiduri dan Fitriani, 2019).

Anggrek tebu (*Grammatophyllum speciosum*) merupakan salah satu anggrek spesies yang terancam kelestariannya di alam. Keunikan anggrek ini terdapat pada perawakan dan

perbungaannya sehingga memiliki nilai jual yang tinggi (Markal *et al.*, 2015). *G. speciosum* diketahui berpotensi sebagai tanaman obat dan mampu meningkatkan fenotip sel induk keratinosit manusia (Chowjarean *et al.*, 2018; Harikarnpakdee dan Chowjarean, 2018). Adanya potensi yang beragam mendorong minat masyarakat untuk membudidayakannya

Pada umumnya, tanaman anggrek diperbanyak secara konvensional dengan pemisahan rumpun anggrek dewasa atau tunas adventif kemudian ditanam ke media yang sama dengan induknya (Rineksane *et al.*, 2018) Namun, perbanyak dengan cara ini membutuhkan waktu lama dan jumlah anaknya yang terbatas. Selain itu, anggrek juga diperbanyak dengan mikropropagasi karena ukuran biji yang kecil dan tidak memiliki endosperm (Isda dan Fatonah, 2014).

Biji sintetis (*synthetic seed*) merupakan aplikasi penting di bidang kultur jaringan tanaman berupa benih buatan dengan eksplan yang dienkapsulasi dan diregenerasikan pada masa dan suhu penyimpanan tertentu (Prihatini dan Hadiati, 2019). Enkapsulasi didefinisikan sebagai pembalutan eksplan tanaman dengan menggunakan matriks enkapsulasi (Kumari *et al.*, 2014). Terdapat 2 agen pembentuk matriks, yakni natrium alginat dan kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Natrium alginat merupakan salah satu agen enkapsulasi yang paling sering digunakan dalam pembuatan biji sintetis. Dalam penggunaannya, natrium alginat akan ditambahkan dengan sumber karbon dan zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk mendukung pertumbuhan eksplan di dalamnya (Roostika *et al.*, 2012). Kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) berperan sebagai zat polimerisasi atau pengompleks sehingga akan menghasilkan bentuk bulatan menyerupai manik-manik yang disebut biji sintetis (Micheli dan Standardi, 2016). Pengembangan teknologi biji sintetis ini tentunya menjadi metode alternatif dalam upaya perbanyak dan pelestarian tanaman yang sulit menghasilkan biji atau tidak memiliki endosperm (Calandry *et al.*, 2017), untuk konservasi plasma nutfah yang terancam punah serta jenis unggul lainnya, kemudahan penanganan selama penyimpanan dan transportasi, serta meminimalkan kegiatan subkultur berulang (Gantait *et al.*, 2017; Rihan *et al.*, 2017).

Teknik penyimpanan *in vitro* melalui pertumbuhan minimal dapat menjadi alternatif konservasi tanaman. Pertumbuhan minimal bisa diaplikasikan dengan beberapa cara salah satunya melalui penambahan paklobutrazol sebagai zat penghambat tumbuh (*retardant*). Paklobutrazol (PBZ) [(2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)-pentan-3-ol] merupakan senyawa anti giberelin golongan triazol yang berpotensi dalam menghambat pertumbuhan tanaman dengan menghambat biosintesis giberelin pada jalur oksidasi ent-kaurena menjadi asam ent-kaurenoat (Salisbury dan Ross, 1992; Rademacher, 2000; Dewi *et al.*, 2014). Penambahan paklobutrazol ke dalam media kultur bertujuan untuk memperpanjang masa simpan dan menjaga kondisi eksplan dari cekaman kekeringan (Lestrari dan Purnamaningsih, 2005).

Penelitian sebelumnya tentang penggunaan paklobutrazol pada *Grammatophyllum* telah dilakukan oleh Habibah dan Sumadi (2013) selama konservasi *in vitro*. Hasil penelitiannya menyatakan bahwa paklobutrazol konsentrasi 1-5 mg/l efektif digunakan untuk konservasi jangka menengah karena mampu menghambat pertumbuhan planlet *Grammatophyllum*. Menurut Syahid (2007) pemberian paklobutrazol sebesar 5 mg/l dapat menekan pertumbuhan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan kultur masih mampu beregenerasi serta meminimalkan kegiatan subkultur berulang. Pengembangan metode pertumbuhan minimal dengan menambahkan paklobutrazol dalam biji sintetis pada *G. speciosum* belum dilakukan, maka diperlukan penelitian ini dengan tujuan untuk mendeskripsikan pengaruh konsentrasi hormon paklobutrazol terhadap pertumbuhan biji sintetis *G. speciosum* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, Universitas Negeri Surabaya, mulai dari bulan April hingga Juni 2020. Sasaran penelitian berupa *plb* (*protocorm like bodies*) *G. speciosum* yang didapatkan dari CV. Muria Sari Bumi, Batu, Jawa Timur. Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan variabel manipulasi berupa konsentrasi hormon paklobutrazol (0 mg/l, 1 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, 7 mg/l, 9 mg/l). Pada penelitian ini terdiri atas 6 perlakuan, sehingga didapatkan pengulangan sebanyak 4 kali. Pada setiap pengulangan berisi 10 biji sintetis, sehingga untuk setiap perlakuan berjumlah 40 biji sintetis.

Alat-alat yang dibutuhkan yaitu erlenmeyer 250 ml, gelas beker 250 ml, cawan petri, botol kultur, pipet pasteur 3 ml, pinset, gunting, *scalpel* dan mata *scalpel*, pH universal, bunsen, kertas label, plastik wrap, *magnetic stirrer*, autoklaf, LAF (*Laminar Air Flow*). Bahan-bahan yang dibutuhkan meliputi *plb* *G. speciosum*, media $\frac{1}{2}$ MS, vitamin, agar-agar, gula, natrium alginat (NA) 3%, 75 mM

CaCl₂.2H₂O, hormon PBZ dengan berbagai konsentrasi (0 mg/l, 1 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, 7 mg/l, 9 mg/l), akuades steril, alkohol 70%, alkohol 96%, spiritus.

Nutrisi dasar yang digunakan dalam pembuatan matriks enkapsulasi yaitu media ½ MS (Murashige & Skoog). Media ½ MS dibuat dengan cara melarutkan stok unsur hara makro konsentrasi setengah, stok hara mikro dalam gelas beaker berisi 50 ml akuades steril, kemudian ditambahkan dengan gula, vitamin dan akuades steril hingga 100 ml. pH media diatur 5,8 sebelum ditambah dengan agar dan dipanaskan hingga homogen. Pembuatan matriks enkapsulasi dilakukan dengan mempersiapkan natrium alginat 3% dan 75 mM CaCl₂.2H₂O secara terpisah. Pembuatan larutan natrium alginat 3% dilakukan dengan melarutkan 3 g natrium alginat ke dalam 100 ml media dasar dan ditambahkan dengan hormon PBZ sesuai perlakuan. Larutan CaCl₂.2H₂O 75 mM dibuat dengan melarutkan 1,10 g CaCl₂.2H₂O ke dalam 100 ml akuades steril. Media yang telah siap selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit. Pada pembuatan media regenerasi digunakan media dasar berupa media MS yang diperkaya dengan nutrisi berupa sumber karbon dan vitamin (Muliawati *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2011).

Pembuatan biji sintetis dilakukan dengan mengambil eksplan berupa *plb G. speciosum* dan ditaburkan ke dalam larutan natrium alginat 3% yang telah ditambahkan nutrisi dasar dan hormon PBZ sesuai konsentrasi. Eksplan diambil secara tunggal dengan menggunakan pipet pasteur lalu dilepaskan perlahan ke dalam larutan CaCl₂ dan diaduk selama 30 menit hingga terbentuk biji sintetis yang menyerupai manik-manik (Gantait *et al.*, 2017). Biji sintetis yang telah terbentuk, dibilas menggunakan akuades steril untuk mengurangi residu larutan CaCl₂, kemudian diletakkan dalam cawan petri dan dilakukan penyimpanan steril selama 2 minggu. Respon yang diamati dalam tahap ini yaitu persentase eksplan menembus kapsul.

Regenerasi dilakukan dengan mengeluarkan biji sintetis dari cawan petri dan direhidrasi dengan direndam dalam air hangat dengan suhu 50°C (Muliawati *et al.*, 2016). Biji sintetis yang sudah direhidrasi, dibiakkan secara *in vitro* dalam botol kultur berisi media MS yang mengandung sumber karbon dan vitamin. Biji sintetis diinkubasi selama 2 bulan dan dipertahankan pada suhu 25 ± 1°C dengan fotoperiode 16 jam. Respon yang diamati yaitu persentase daya hidup biji sintetis, kontaminasi dan *browning*.

Pengamatan kondisi fisik biji sintetis di setiap tahap yaitu saat awal pembentukan, pasca penyimpanan dan pasca rehidrasi dilakukan secara visual dengan menjabarkan kondisi fisik dari biji sintetis. Sementara pengamatan pertumbuhan berupa persentase eksplan menembus kapsul dan daya hidup biji sintetis, persentase kontaminasi, persentase *browning* dihitung dengan rumus (Rahmatullah, 2018):

$$\text{Persentase daya tembus biji sintetis} = \frac{\sum \text{eksplan menembus kapsul}}{\sum \text{biji sintetis}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase daya hidup biji sintetis} = \frac{\sum \text{biji hidup}}{\sum \text{biji sintetis}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase kontaminasi} = \frac{\sum \text{biji kontam}}{\sum \text{biji sintetis}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase } \textit{browning} = \frac{\sum \text{biji } \textit{browning}}{\sum \text{biji sintetis}} \times 100\%$$

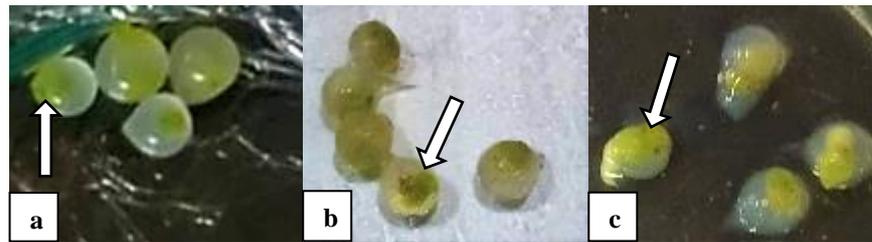
Data kondisi fisik biji sintetis dan pertumbuhan berupa persentase daya tembus, daya hidup, kontaminasi dan *browning* dianalisis secara deskriptif kuantitatif.

HASIL

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, diperoleh beberapa respon pertumbuhan biji sintetis *G. speciosum*. Hasil pengamatan visual biji sintetis menunjukkan adanya perbedaan kondisi fisik biji sintetis di setiap tahapan (Gambar 1).

Pada tahap pertama yakni saat awal pembentukan, biji sintetis memiliki bentuk bulat, warna kapsul putih bening, dinding matriks padat dan kondisi *plb* yang hijau segar (Gambar 1a). Pasca penyimpanan selama 2 minggu, biji sintetis menunjukkan perubahan yaitu bentuk sedikit menyusut, warna kapsul putih, permukaan dinding matriks berkerut dengan kondisi *plb* yang tetap hijau

(Gambar 1b). Pasca rehidrasi, biji sintetis kembali seperti semula dengan bentuk bulat, warna kapsul putih, dinding matriks padat dan *plb* yang masih tetap hijau (Gambar 1c). Kondisi fisik biji sintetis dengan penambahan berbagai konsentrasi hormon paklobutrazol sama pada semua tahapan.

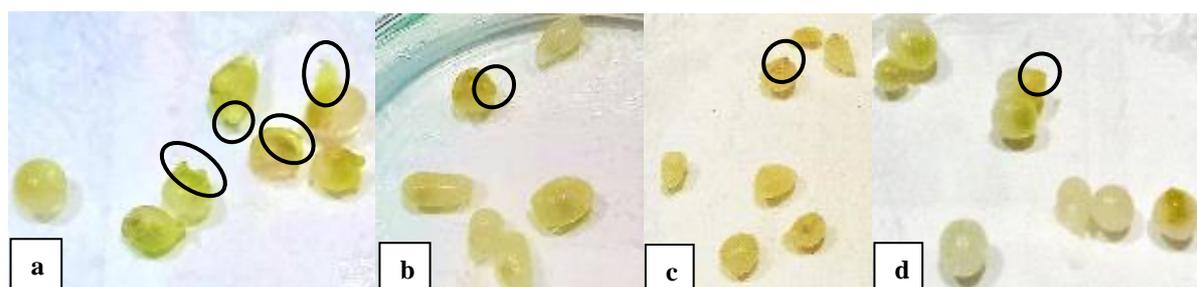


Gambar 1. Kondisi fisik biji sintetis (a) awal pembentukkan, (b) pasca penyimpanan, dan (c) pasca rehidrasi. Tanda panah menunjukkan *protocorm like bodies* (*plb*) (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Tabel 1. Persentase daya tembus dan daya hidup biji sintetis *Gramatophyllum speciosum* selama penyimpanan 2 minggu pada suhu 25°C

Konsentrasi paklobutrazol (mg/l)	Jumlah		Persentase (%)	
	<i>plb</i> tembus	Biji hidup	<i>plb</i> tembus	Biji hidup
0	18	20	45	50
1	5	35	12	88
3	2	38	5	95
5	1	39	3	97
7	1	39	3	97
9	1	39	3	97

Berdasarkan data persentase di atas membuktikan bahwa hormon paklobutrazol berpengaruh terhadap daya tembus dan daya hidup biji sintetis *G. speciosum* dengan selama penyimpanan 2 minggu pada suhu 25°C (Gambar 2). Hal ini ditunjukkan dengan semakin tingginya konsentrasi hormon paklobutrazol yang diberikan, maka semakin rendah potensi terjadinya penembusan *plb* dalam biji sintetis sedangkan daya hidupnya menjadi semakin tinggi. Nampak pada Tabel 1, persentase daya tembus tertinggi ada pada konsentrasi paklobutrazol 0 mg/l atau kontrol sebesar 45% (Gambar 2a), sedangkan yang terendah ada pada konsentrasi 5-9 mg/l sebesar 3% (Gambar 2b-d). Persentase daya tembus dengan konsentrasi 1 mg/l dan 3 mg/l masing-masing sebesar 12% dan 5%. Persentase daya hidup tertinggi ada pada konsentrasi 5-9 mg/l sebesar 97%, sedangkan yang terendah ada pada konsentrasi 0 mg/l sebesar 50%. Persentase biji sintetis yang hidup pada konsentrasi 1 mg/l dan 3 mg/l masing-masing sebesar 88% dan 95%.



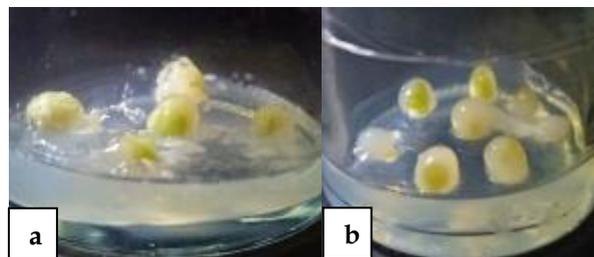
Gambar 2. Daya tembus biji sintetis *G. speciosum* dengan PBZ konsentrasi (a) 0 mg/l (kontrol), (b) 5 mg/l, (c) 7 mg/l, dan (d) 9 mg/l setelah penyimpanan selama 2 minggu. Lingkaran hitam menunjukkan *plb* *G. speciosum* yang menembus dinding matriks (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Tahapan selanjutnya, setelah penyimpanan selama 2 minggu, biji sintetis *G. speciosum* yang masih bertahan hidup diregenerasi dalam media regenerasi selama 2 bulan pada suhu 25°C, hasilnya dapat diamati pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase daya hidup, kontaminasi, dan *browning* biji sintetis *Gramatophyllum speciosum* dalam media regenerasi selama 2 bulan pada suhu 25°C

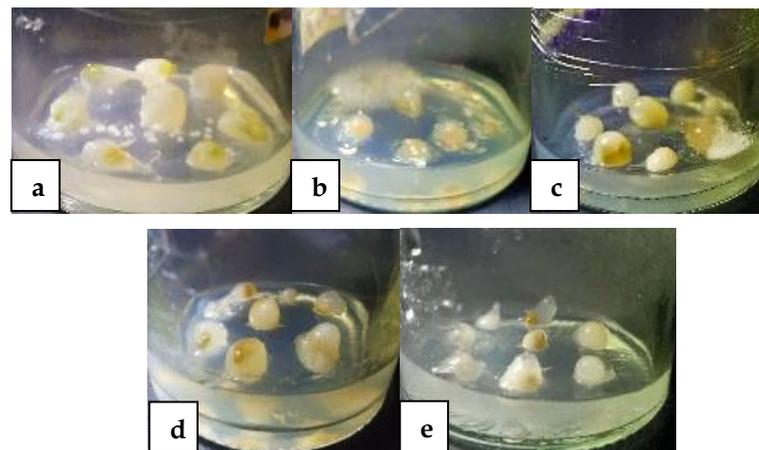
Konsentrasi paklobutrazol (mg/l)	Jumlah			Persentase (%)		
	Biji hidup	Kontaminasi	<i>Browning</i>	Biji hidup	Kontaminasi	<i>Browning</i>
0	6	34	0	15	85	0
1	1	39	0	3	97	0
3	27	13	0	68	32	0
5	21	2	17	53	5	42
7	21	0	19	53	0	47
9	37	3	0	93	7	0

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa persentase tertinggi biji sintetis yang hidup ada pada perlakuan paklobutrazol dengan konsentrasi 9 mg/l yaitu sebesar 93% (Gambar 3b), sedangkan persentase terendahnya ada pada konsentrasi 1 mg/l yaitu sebesar 3%. Persentase biji sintetis hidup dengan konsentrasi paklobutrazol 0 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, dan 7 mg/l masing-masing sebesar 15%, 68%, 53% dan 53%.



Gambar 3. Biji sintetis dalam media regenerasi dengan PBZ konsentrasi (a) 0 mg/l (kontrol), dan (b) 9 mg/l selama 2 bulan (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Pada tahap ini, biji sintetis juga mengalami kontaminasi dan *browning* atau pencokelatan (Gambar 4). Persentase kontaminasi tertinggi terjadi pada perlakuan dengan konsentrasi paklobutrazol 1 mg/l sebesar 97%, sedangkan persentase terendahnya ada pada konsentrasi 7 mg/l sebesar 0%. Persentase kontaminasi pada konsentrasi 0 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, dan 9 mg/l masing-masing sebesar 85%, 32%, 5% dan 7%. Pada tahap ini biji sintetis juga mengalami *browning* atau pencokelatan yang hanya terjadi pada perlakuan dengan konsentrasi 5 mg/l dan 7 mg/l masing-masing sebesar 42% dan 47%.



Gambar 4. Kontaminasi dan *browning* yang terjadi pada biji sintetis dalam media regenerasi. (a) Kontaminasi oleh bakteri, (b) Kontaminasi oleh jamur dan bakteri, (c) Kontaminasi oleh jamur, dan (d-e) *Browning* atau pencokelatan pada biji sintetis (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini biji sintetis dihasilkan dari eksplan berupa *plb* (*protocorm like bodies*) *G. speciosum* yang dienkapsulasi dengan matriks enkapsulasi berupa natrium alginat dan kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pembuatan biji sintetis

dengan menggunakan konsentrasi 3% natrium alginat dan 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ merupakan kombinasi yang optimal dalam menghasilkan biji sintesis dengan kondisi yang baik yaitu berbentuk bulat, warna kapsul putih bening, dan dinding matriks yang padat (Gambar 1a). Pernyataan tersebut selaras dengan penelitian Pitoyo *et al.* (2017) bahwa natrium alginat konsentrasi rendah (2%) akan menghasilkan biji yang lunak sehingga saat dilepaskan dalam larutan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ menjadi tidak berbentuk dan konsentrasi 3% natrium alginat merupakan konsentrasi yang terbaik dalam menghasilkan biji sintesis *Grammatophyllum scriptum*. Kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dengan konsentrasi 75 mM menghasilkan biji sintesis dengan tingkat kepadatan dinding matriks yang optimal dan berwarna putih sehingga eksplan di dalamnya dapat terlihat jelas. Menurut Husni *et al.* (2012) pemberian konsentrasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dengan tingkat yang berbeda memberikan pengaruh terhadap kondisi fisik biji sintesis, yakni semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, maka dinding matriks menjadi lebih padat hingga kaku karena jumlah ion Ca^{2+} yang berikatan dengan Na^+ lebih banyak. Menurut Siew *et al.* (2014) penggunaan konsentrasi 3% natrium alginat dengan 75mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang disimpan pada suhu 25°C mampu menghasilkan biji sintesis anggrek *Dendrobium White Fairy Orchid* dengan kondisi fisik yang baik. Mekanisme dasar dalam pembentukan biji sintesis yaitu melalui pertukaran antara ion Na^+ dan Ca^{2+} saat tetapan natrium alginat yang mengandung eksplan dilepaskan ke dalam larutan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang mengakibatkan molekul polisakarida membentuk struktur polimer sehingga menghasilkan butiran menyerupai manik-manik yang disebut biji sintesis (Gantait *et al.*, 2012). Secara umum, penggunaan 3% natrium alginat yang direndam dalam larutan 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ selama 30 menit merupakan waktu yang optimal karena mampu memberikan kepadatan yang terbaik untuk mendukung produksi biji sintesis (Rihan *et al.*, 2017).

Kondisi fisik biji sintesis mengalami perubahan setelah dilakukan penyimpanan selama 2 minggu pada suhu 25 °C yang ditandai dengan adanya pengerutan pada permukaan dinding matriksnya (Gambar 1b). Teknologi biji sintesis memiliki kelemahan salah satunya pada sifat fisik natrium alginat yang mudah kehilangan air sehingga menyebabkan matriks mengering dan mengeras serta dapat membahayakan eksplan di dalamnya karena tidak ada sumber energi yang diperlukan untuk proses respirasi (Rahmatullah, 2018; Kumari *et al.*, 2014). Sementara itu, kondisi fisik biji sintesis akan kembali seperti semula setelah dilakukan rehidrasi (Gambar 1c). Menurut Muliawati *et al.* (2016) rehidrasi terjadi akibat imbibisi yakni proses masuknya air dari lingkungan yang kekurangan air menuju ke lingkungan dengan ketersediaan air yang memadai dengan tujuan untuk mengembalikan kandungan air di dalam biji sintesis guna mendukung pertumbuhan eksplan di dalamnya.

Penambahan hormon paklobutrazol selama penyimpanan 2 minggu pada suhu 25 °C bertujuan untuk menentukan konsentrasi optimal paklobutrazol dalam menghambat pertumbuhan biji sintesis *G. speciosum* sehingga dapat memperpanjang masa simpan tanaman. Pada tahap ini, biji sintesis diharapkan tidak mengalami pertumbuhan. Pertumbuhan yang dimaksudkan yakni kemampuan *plb* dalam menembus dinding matriks biji sintesis untuk membentuk tunas maupun akar. Reaksi penghambatan pada biji sintesis *G. speciosum* oleh hormon paklobutrazol dapat dilihat dengan menurunnya persentase *plb* yang menembus seiring dengan naiknya konsentrasi paklobutrazol. Pada Tabel 1, biji sintesis dengan penambahan paklobutrazol konsentrasi 0 mg/l memiliki persentase daya tembus tertinggi yang kemudian juga diikuti dengan konsentrasi 1-3 mg/l, sedangkan persentase daya tembus terendah ada pada konsentrasi 5-9 mg/l (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan hormon paklobutrazol berpengaruh terhadap daya tembus biji sintesis *G. speciosum*. Paklobutrazol merupakan senyawa organik sintetik golongan triazol yang memiliki sifat anti giberelin, dengan menghambat jalur oksidasi ent-kaurena menjadi asam ent-kaurenoat melalui inaktivasi sitokrom P450 (Abed, 2018). Menurut Habibah dan Sumadi (2013) pertumbuhan anggrek *Grammatophyllum* mampu dihambat dengan penambahan hormon paklobutrazol konsentrasi 1-5 mg/l dalam media MS. Pengaplikasian hormon paklobutrazol konsentrasi 5 mg/l pada penelitian yang dilakukan oleh Nirwana (2009) dinilai efektif dalam menghambat pertumbuhan bibit anggrek *Phalaeonopsis amboinensis* yang dienkapsulasi secara *in vitro*.

Penambahan paklobutrazol juga berpengaruh terhadap persentase daya hidup biji sintesis *G. speciosum*. Berdasarkan hasil penelitian, biji sintesis *G. speciosum* yang diberikan perlakuan paklobutrazol (1-9 mg/l) memiliki persentase daya hidup yang tinggi bila dibandingkan dengan perlakuan kontrol (tanpa penambahan paklobutrazol) yakni di atas 50% (Tabel 1). Hal ini membuktikan pemberian paklobutrazol selain menghambat pertumbuhan juga dapat meningkatkan ketahanan hidup *plb* di dalam biji sintesis. Adanya komponen triazol dalam paklobutrazol memiliki peranan penting dalam menghasilkan efek toleransi terhadap cekaman abiotik dengan meningkatkan kandungan antibiotik pada tanaman yang diberikan perlakuan (Silva *et al.*, 2019).

Biji sintetis *G. speciosum* yang telah disimpan selama 2 minggu dilakukan regenerasi dalam media regenerasi selama 2 bulan pada suhu 25°C. Tujuan dari tahap regenerasi adalah untuk mengetahui kemampuan hidup eksplan (*plb*) setelah dilakukan penyimpanan. Berdasarkan hasil penelitian, perlakuan paklobutrazol konsentrasi 9 mg/l memiliki persentase hidup paling tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya yakni sebesar 93% (Tabel 2). Kondisi eksplan yang masih hidup setelah diregenerasi disebabkan karena adanya pengaruh hormon endogen yang ada di dalam jaringan tanaman seperti sitokinin atau giberelin (Deswiniyanti dan Lestari, 2018). Akan tetapi, pada penelitian ini, biji sintetis yang telah dipindah ke dalam media regenerasi belum mengalami pertumbuhan berupa tunas, akar maupun daun (Gambar 3). Pertumbuhan yang lambat dikarenakan konsentrasi zat penghambat tumbuh atau retardan yang diberikan terlalu tinggi sehingga meninggalkan residu berupa efek penghambatan bagi eksplan tanaman meskipun sudah dipindah ke dalam media regenerasi (Agustarini, 2009; Satriadi *et al.*, 2017). Pengaplikasian paklobutrazol dalam jumlah kecil telah dilakukan oleh Diantina *et al.* (2015) terhadap aksesi ubi kayu 450 dan 433 dengan hasil yang menyatakan bahwa paklobutrazol konsentrasi 3,4 μ M memberikan respon terbaik dalam menghambat pertumbuhan selama penyimpanan 9 bulan dengan daya regenerasi yang tinggi selama 1 bulan.

Pemberian zat retardan paklobutrazol dengan konsentrasi yang tinggi juga mempengaruhi waktu tumbuh eksplan setelah di tanam dalam media regenerasi. Menurut Deswiniyanti dan Lestari (2018) penambahan hormon paklobutrazol dengan konsentrasi yang tinggi (2-7 mg/l) memberikan efek penghambatan dan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk melihat pertumbuhan *plb Vanda tricolor* yakni kurang lebih selama 6 bulan. Respon waktu tumbuh dalam media regenerasi di setiap tanaman berbeda. Pada penelitian Lestari dan Purnamaningsih (2005) eksplan daun dewa (*Gynura procumbens*) menunjukkan kemampuan untuk beregenerasi setelah 7 bulan. Pada penelitian Damayanti *et al* (2015) terhadap tebu PS 864 yang diregenerasi selama 3 bulan memiliki persentase daya hidup mencapai 80%.

Pada tahap regenerasi, biji sintetis yang masih hidup memiliki kondisi *plb* yang masih berwarna hijau segar (Gambar 3b). Warna hijau ini disebabkan adanya kandungan pigmen klorofil di dalam protokorm yang nantinya dapat meningkatkan efisiensi fotosintesis (Kartiman *et al.*, 2018). Dalam hal ini, hormon paklobutrazol juga memiliki peranan penting yaitu selain berperan dalam menghambat jalur utama biosintesis giberelin, tetapi juga dapat meningkatkan kandungan klorofil (Lolaei *et al.*, 2013).

Biji sintetis *G. speciosum* pasca dipindahkan ke dalam media regenerasi mengalami kontaminasi dan *browning*. Berdasarkan hasil penelitian, kontaminasi hampir terjadi di setiap konsentrasi paklobutrazol. Kontaminasi pada biji sintetis *G. Speciosum* sebagian besar didominasi oleh bakteri dan jamur. Pada umumnya, faktor yang mempengaruhi terjadinya kontaminasi ada pada proses sterilisasi media dan sumber eksplan yang akan digunakan serta kondisi laboratorium yang masih menyimpan media terkontaminasi (Fitriani *et al.*, 2019). Penggunaan bahan sterilan konsentrasi rendah dengan durasi perendaman yang lama dapat menghambat terjadinya kontaminasi tanpa merusak jaringan tanaman yang akan dikultur (Wati *et al.*, 2020). Pengaplikasian PPM (*Plant Preservative Mixture*), bahan biosida golongan isothiazol, dinilai efektif dalam mencegah terjadinya pertumbuhan bakteri dan jamur pada kultur jaringan tanaman (Rineksane *et al.*, 2020; Wattanapan *et al.*, 2018).

Pada penelitian ini, beberapa perlakuan mengalami *browning* yakni pada konsentrasi 5 mg/l dan 7 mg/l (Gambar 4d-e). Penggunaan ZPT konsentrasi tinggi dapat menjadi senyawa toksik bagi eksplan hingga menyebabkan kematian (Kaniyah *et al.*, 2012). Selain itu, efek perlukaan akibat pemotongan eksplan dapat memicu terjadinya *browning* karena terjadi oksidasi senyawa fenol menjadi quinon dan menghasilkan pigmen berwarna coklat (Fitriani *et al.*, 2019). Penggunaan scalpel dan pinset yang masih panas untuk pemotongan eksplan juga dapat memicu terjadinya *browning* (Sulistiyo *et al.*, 2018). Penambahan arang aktif dalam media kultur dapat menyerap senyawa fenol (Wirmasari dan Mayta, 2019). Hal yang sama juga diungkapkan dalam penelitian Putri *et al.* (2014) bahwa penambahan arang aktif pada enkapsulasi biji sintetis bertujuan untuk menyerap eksudat yang dihasilkan oleh eksplan selama masa simpan.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh konsentrasi hormon paklobutrazol terhadap pertumbuhan biji sintetis anggrek tebu (*Grammatophyllum speciosum*) dapat diketahui bahwa

penggunaan hormon paklobutrazol dapat menghambat pertumbuhan biji sintetis *G. speciosum* selama masa simpan 2 minggu. Pengaplikasian hormon paklobutrazol yang optimal dalam menghambat pertumbuhan *G. speciosum* adalah konsentrasi 9 mg/l dengan tingkat daya tembus, kontaminasi, dan *browning* terendah serta daya hidup tertinggi saat tahap regenerasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abed MY, 2018. Effect of Paclobutrazol on Growth and Delaying Bolting of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) cv. Balady. *Asian Journal of Agriculture and Horticultural Research*. Vol 1 (3): 1-9
- Agustarini R, 2009. Enkapsulasi Untuk Konservasi *In Vitro* *Pimpinella pruatjan* Molk: Efek Cahaya dan Kombinasi Media (Sorbitol-Paklobutrazol). Tesis. Tidak Dipublikasikan. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Baiduri N dan Fitriani, 2019. Keanekaragaman Jenis dan Habitat Anggrek (*Orchidaceae*) di Bukit Lawang. *Jurnal Biologica Samudra*. Vol 1 (2): 22-27
- Calandry AW, Muslihatin W, dan Sutini, 2017. Produksi Benih Sintetik Teh *Camellia sinensis*. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. Vol 6 (2): 45-47
- Chowjarean V, Nimmannit U, Chaotham C, Eaknai W, Sucontphunt A, Phiboonchaiyanan PP, Tengamnuay P, dan Chanvorachote P, 2018. *Grammatophyllum speciosum* Extract Potentiates Stemness in Keratinocyte Cells. *Chiang Mai Journal of Science*. Vol 45 (1): 238-248
- Damayanti F, Suharsono, Widiastuti U, dan Mariska I, 2015. Enkapsulasi Kalus Embriogenik Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Dengan Metode Pertumbuhan Minimal. *The First International Conference on Life Science and Biotechnology: Exploration and Conservation of Biodiversity*. Jember: 28-29 September 2015. Hal 279-282
- Das MC, Kumaria S, dan Tandon P, 2011. Storage and High Conversion of Encapsulated Protocorm Like Bodies of *Cymbidium devonianum* (Orchid). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Vol 86 (6): 611-615
- Deswiniyanti NW dan Lestari NKD, 2018. Efek Pemberian Paklobutrazol Pada Anggrek *Vanda tricolor* Secara *In Vitro*. *Jurnal Simbiosis*. Vol 6 (1): 16-19
- Dewi N, Dewi IS, dan Roostika I, 2014. Pemanfaatan Teknik Kultur *In Vitro* untuk Konservasi Plasma Nutfah Ubi-ubian. *Jurnal Agro Biogen*. Vol 10 (1): 34-44
- Diantina S, Efendi D, dan Mariska I, 2015. Pengaruh Retardan Paklobutrazol Terhadap Pertumbuhan dan Pemulihan Dua Aksesi Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) yang Disimpan Secara *In Vitro*. *Jurnal AgroBiogen*. Vol 11 (3): 95-102
- Fauziah N, Aziz SA, dan Sukma D, 2014. Karakterisasi Morfologi Anggrek *Phalaenopsis* spp. Spesies Asli Indonesia. *Buletin Agrohorti*. Vol 2 (1): 86-94
- Fitriani Y, Wijana G, dan Darmawati IAP, 2019. Teknik Sterilisasi dan Efektivitas 2,4-D Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) *In Vitro*. *Journal Agriculture Science and Biotechnology*. Vol 8 (1): 41-52
- Gantait S, Bustam S, dan Sinniah UR, 2012. Alginate-Encapsulation, Short-Term Storage and Plant Regeneration From Protocorm Like Bodies of *Aranda Wan* Chark Kuan 'Blue' × *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. (*Orchidaceae*). *Plant Growth Regulation*. Vol 68: 303-311
- Gantait S, Kundu S, Yeasmin L, dan Ali N, 2017. Impact of differential levels of sodium alginate, calcium chloride and basal media on germination frequency of genetically true artificial seeds of *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. Vol 4: 75-81
- Habibah NA dan Sumadi, 2013. Konservasi Tanaman Anggrek *Grammatophyllum* Secara *In Vitro* Melalui Pertumbuhan Minimal Menggunakan Paklobutrazol. *Jurnal MIPA*. Vol 36 (1): 8-13
- Harikarnpakdee S dan Chowjarean V, 2018. *Grammatophyllum speciosum* Ethanolic Extract Promotes Wound Healing in Human Primary Fibroblast Cells. *International Journal of Cell Biology*. Vol 2018: 1-6
- Husni A, Subaryono, Pranoto Y, Tazwir, dan Ustadi, 2012. Pengembangan Metode Ekstraksi Alginat Dari Rumput Laut *Sargassum* sp. Sebagai Bahan Pengental. *Agritech*. Vol 32 (1): 1-8
- Isda MN dan Fatonah S, 2014. Induksi Akar pada Eksplan Tunas Anggrek *Grammatophyllum scriptum* var. *citrinum* secara *In Vitro* pada Media MS dengan Penambahan NAA Dan BAP. *Al-Kaunyah Jurnal Biologi*. Vol 7 (2): 53-57
- Isda MN, Fatonah S, dan Susanto D, 2015. Induksi Tunas Anggrek *Grammatophyllum scriptum* (L.) Blume Secara *In Vitro* Pada Media *Vacin and Went*. *Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas dan Ekologi Tropika Indonesia*. Padang: 19 September 2015. Hal 438-449
- Kartiman R, Sukma D, Aisyah SI, dan Purwito A, 2018. Multiplikasi *In Vitro* Anggrek Hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) Pada Perlakuan Kombinasi NAA dan BAP. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains*. Vol 5 (1): 75-87
- Khaniyah S, Habibah NA, dan Sumadi, 2012. Pertumbuhan Kalus Daun Dewa (*Gynura procumbens* [Lour] Merr.) dengan Kombinasi 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan Kinetin Secara *In Vitro*. *Biosaintifika*. Vol 4 (2): 98-105
- Kumari P, Kumar V, dan Chandra S, 2014. Synthetic Seeds: A Boon for Conservation and Exchange of Germplasm. *Bio Med Research*. Vol 1 (1): 1-11
- Lestari EG dan Purnamaningsih R, 2005. Penyimpanan *In Vitro* Tanaman Obat Daun Dewa melalui Pertumbuhan Minimal. *Jurnal AgroBiogen*. Vol 1 (2): 68-72
- Lolaei A, Mobasheri S, Bemana R, dan Teymori N, 2013. Role of Paclobutrazol on Vegetative and Sexual Growth of Plants. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. Vol 5 (9): 958-961

- Mahadi I, 2016. Propagasi *In Vitro* Anggrek (*Dendrobium phalaenopsis* Fitzg) Terhadap Pemberian Hormon IBA dan Kinetin. *Jurnal Agroteknologi*. Vol 7 (1): 15-18
- Markal A, Isda MN, dan Fatonah S, 2015. Perbanyakkan Anggrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl) BL. Melalui Induksi Tunas Secara *In Vitro* Dengan Penambahan BAP dan NAA. *Jom FMIPA*. Vol 2 (1): 109-113
- Micheli M dan Standardi A, 2016. From Somatic Embryo to Synthetic Seed in Citrus spp. Through the Encapsulation Technology. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1359: 515-522.
- Muliawati E, Anggarwulan E, dan Pitoyo A, 2016. Pengaruh Asam Absisat Terhadap Viabilitas Biji Sintetis *Grammatophyllum scriptum* (Orchidaceae) Selama Masa Penyimpanan Kering. *Bioteknologi*. Vol 13 (1): 1-8
- Nirwana I, 2009. Enkapsulasi Bibit Anggrek *Phalaenopsis amboinensis* dengan Penambahan Paklobutrazol Sebagai Metode Penyimpanan Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Tidak Dipublikasikan. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Pitoyo A, Anggarwulan E, dan Ariza I, 2017. Effects of Encapsulation Matrix on Physical Properties and Germination Viability of Calcium-Alginate Encapsulated *plbs* of *Grammatophyllum scriptum*. *Cell Biology and Development*. Vol 1 (1): 36-40
- Prihatini R dan Hadiati S, 2019. Teknik Enkapsulasi Sederhana untuk Konservasi *In vitro* Jangka Menengah Tanaman Nenas (*Ananas comosus*). *Jurnal Hortikultura*. Vol 29 (1): 1-8
- Putri DH, Suwirman, dan Maideliza T, 2014. Pengaruh Pemberian Arang Aktif dan Air Kelapa Terhadap Viabilitas Hasil Enkapsulasi Tunas *Tetrastigma rafflesiae* Miq. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. Vol 3 (3): 213-218
- Rademacher W, 2000. Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. Vol 51: 501-531.
- Rahmatullah W, 2018. Respon Pertumbuhan Tunas Andalas (*Morus macrourea* Miq.) Hasil Enkapsulasi Pada Suhu Penyimpanan yang Berbeda. *Jurnal Riset Sains dan Teknologi*. Vol 2 (1): 9-14
- Rihan HZ, Kareem F, El-Mahrouk ME, dan Fuller MP, 2017. Artificial seeds (Principle, aspects and applications). *Agronomy*. Vol 7 (4): 3-10
- Rineksane IA, Saputra EW, Samidjo GS, dan Astuti A, 2020. Benzyl Amino Purine Enhances Multiplication of *Vanda tricolor* Protocorm Like Bodies. *IOP Conference. Series: Earth and Environmental Science*. Vol 458: 1-8
- Rineksane IA, Nafi'ah SS, dan Dewi SS, 2018. The Combination of Rice Water and BAP Enhances the Multiplication of *Grammatophyllum speciosum*. *Planta Tropika: Journal of Agro Science*. Vol 6 (2): 92-99
- Roostika I, Purnamaningsih R, Supriati Y, Mariska I, Khumaida N, dan Wattimena GA, 2012. Pembentukan Benih Sintetik Tanaman Nenas. *Jurnal Hortikultura*. Vol 22 (4): 316-326
- Satriadi O, Efendi D, dan Sulassih, 2017. Konservasi *In Vitro* Pisang Kepok Unti Sayang (*Musa balbisiana*) Melalui Pertumbuhan Minimal Pada Berbagai Media. *Buletin Agrohorti*. Vol 5 (1): 27-36
- Salisbury FB dan Ross CW, 1992. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. Terjemahan dari: FB Salisbury and Ross CW. Plant Physiology 4th Edition. Penerbit ITB Bandung
- Siew WL, Kwok MY, Ong YM, Liew HP, dan Yew BK, 2014. Effective Use of Synthetic Seed Technology in the Regeneration of *Dendrobium White Fairy* Orchid. *Journal of Ornamental Plants*. Vol 4 (1): 1-7
- Silva TDS, Nepomuceno CF, Soares TL, dan Santana JRFD, 2019. In vitro conservation of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz under minimal growth conditions. *Ciência e Agrotecnologia*. Vol 43 (e014519): 1-7
- Sulistiyo RH, Luthfiyyah Z, Susilo B, Dalimartha LN, Wiguna EC, Yuliana N, dan Prasetyo EN, 2018. Pengaruh Teknik Sterilisasi dan Komposisi Medium terhadap Pertumbuhan Tunas Eksplan Sirsak Ratu. *Bioedukasi*. Vol 11 (1): 1-5
- Syahid SF, 2007. Pengaruh Retardan Paklobutrazol Terhadap Pertumbuhan Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) Selama Konservasi *In Vitro*. *Jurnal Littri*. Vol 13 (3): 93-97
- Wati I, Astarini IA, Pharmawati M, dan Hendriyani E, 2020. Perbanyakkan *Begonia bimaensis* Undaharta dan Ardaka dengan Teknik Kultur Jaringan. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. Vol 7 (1): 112-122
- Wattanapan N, Srichuay W, Klinnawee L, dan Meesawat U, 2018. Effects of Anti-Browning Agents on Protocorm Like Body Induction Using Thin Cell Layers of Endangered Lady's Slipper Orchid: *Paphiopedilum callosum* var. *subleave*. *Princess of Naradhiwas University Journal*. Vol 11 (1): 107-116
- Wirmasari R dan Isda MN, 2019. Respon Pertumbuhan Protokorm Anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* (Teijsm. dan Binn.) J. J. Sm. Secara *In Vitro* Pada Beberapa Komposisi Media. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. Vol 7 (2): 118-125

Published: September 2021

Authors:

Theresia Amelia Prasayu, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang, Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: theresiaprasayu98@gmail.com
 Evie Ratnasari, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang, Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: evieratnasari@unesa.ac.id

How to cite this article:

Prasayu TA, Ratnasari E, 2021. Pengaruh Konsentrasi Hormon Paklobutrazol Terhadap Pertumbuhan Biji Sintetis Anggrek Tebu (*Grammatophyllum speciosum*) Secara *In Vitro*. *LenteraBio*; 10(3): 266-274