

Volume 02 Nomor 02 Oktober 2011

ISSN : 2086-5783

II.A.1.b.3/4  
Jurnal Nasional tak  
terakreditasi

II.A.1.b.3/5  
Jurnal Nasional tak  
terakreditasi

# WIDYA BIOLOGI



Program Studi Biologi  
Fakultas MIPA  
Universitas Hindu Indonesia

# WIDYA BIOLOGI

## DEWAN REDAKSI

### Ketua

I Nyoman Arsana

### Sekretaris

I Putu Sudiartawan

### Anggota

Euis Dewi Yuliana, Ni Ketut Ayu Juliasih, Ni Luh Gede Sudaryati, I Wayan Suarda, Israil Sitepu

### Redaktur Ahli (*Peer Riview*)

Prof. Dr. I Dewa Made Tantera Keramas, MSc (Program Pasca Sarjana UNHI)

Dr. I Gede Ketut Adiputra (Program Studi Biologi UNHI)

Dr. I Wayan Suana, S.Si., M.Si ( Program Studi Biologi UNRAM)

**Jurnal Widya Biologi**, (ISSN No. 2086-5783) diterbitkan oleh Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Hindu Indonesia Denpasar, sebagai wadah informasi ilmiah bidang biologi baik yang berupa hasil penelitian ataupun kajian pustaka

**Jurnal Widya Biologi** menerima naskah dari dosen, peneliti, mahasiswa maupun praktisi yang belum pernah diterbitkan dalam publikasi lain dengan ketentuan seperti tercantum pada bagian belakang jurnal ini.

### Langganan

Jurnal Widya Biologi terbit dua nomor dalam satu tahun (Maret dan Oktober). Langganan untuk satu tahun (termasuk ongkos kirim) sebagai berikut:

1. Lembaga/Institusi : Rp. 150.000,- (seratus lima puluh ribu rupiah)
2. Individu/Pribadi : Rp. 75.000,- (tujuh puluh Lima ribu rupiah)
3. Mahasiswa : Rp. 30.000,- (tiga puluh ribu rupiah)

Pembayaran dapat dilakukan dengan cara: a) Pembayaran langsung, b) wesel pos. Salinan bukti pembayaran (b) harap dikirimkan ke redaksi.

### Alamat Redaksi

Program Studi Biologi FMIPA UNHI

Jl Sangalangit, Tembau-Penatih, Denpasar, Bali

E-mail : widyabiologi@yahoo.co.id

## DAFTAR ISI

### WIDYA BIOLOGI

INDUKSI AUXIN TERHADAP AKTIVITAS AUTOTROFIK BIBIT ANGGREK BOTOL PADA LINGKUNGAN EX-VITRO I Gede Ketut Adiputra .....	77-90
INVENTARISASI JENIS MOLUSCA DI DANAU TAMBLINGAN, BALI Ni Made Suartini .....	91-96
PENGARUH SUPLEMENTASI SOMATOTROPIN TERHADAP PERUBAHAN BOBOT BADAN TIKUS BETINA USIA ENAM BULAN DAN SATU TAHUN Ni Wayan Sudatri .....	97-101
EFEKTIVITAS TANAMAN HIAS <i>Sansevieria lorentii</i> DALAM MENYERAP POLUTAN TIMBAL (Pb) Ni Luh Suriani .....	102-105
EFEKTIVITAS HASIL FRAKSINASI EKSTRAK DAUN SEMBUNG DELAN ( <i>Sphaerantus indicus</i> L.) DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN <i>Alternaria</i> sp. dan <i>Phytophthora</i> sp. Ida Bagus Gede Darmayasa .....	106-112
PENGARUH PAPARAN ASAP ROKOK TERHADAP KADAR KLOOROFIL PADA DAUN TANAMAN CAM, <i>Sansevieria trifasciata</i> I Gusti Ayu Made Dwi Lestari, I Gede Ketut Adiputra .....	113-120
KEANEKARAGAMAN JENIS BURUNG AIR DI HUTAN MANGROVE SUWUNG KAUH DENPASAR I Gusti Ngurah Bagus Ary Eka Putra, Ni Ketut Ayu Juliasih, I Nyoman Arsana .....	121-131
PEMANFAATAN EKSTRAK BAWANG PUTIH ( <i>Allium sativum</i> ) DAN KAYU MANIS ( <i>Cinnamomum burmanii</i> Bl.) SEBAGAI SUPLEMEN RAGI DALAM PROSES FERMENTASI TAPE Ni Made Susun Parwanayoni .....	132-136

# INDUKSI AUXIN TERHADAP AKTIVITAS AUTOTROFIK BIBIT ANGGREK BOTOL PADA LINGKUNGAN EX-VITRO

I Gede Ketut Adiputra

Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Hindu Indonesia,  
Jl. Sangalangit, Tembau, Penatih, Denpasar.

## ABSTRAK

Auxin adalah zat pengatur tumbuh yang ditemukan pertama kali dan memegang peran kunci dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Dalam kultur jaringan, pemberian senyawa ini telah diketahui dapat meningkatkan perkembangan eksplant menjadi tanaman baru yang utuh. Auxin ditambahkan secara eksogen kedalam media yang mengandung sukrosa, mikro dan makro nutrien, vitamin dan mioinositol. Bagi explant, senyawa organik digunakan sebagai substrat untuk biosintesis molekul pertumbuhan. Akan tetapi, pada tanaman yang utuh, senyawa organik tersebut adalah produk dari aktivitas autotrofiknya. Oleh karena itu pertumbuhan explant menjadi callus dan akhirnya menjadi plantlet dapat dikatakan merupakan pertumbuhan heterotrofik, terutama pada fase awal morfogenesis. Dalam teknik kultur jaringan, sukrosa dan auxin tetap diberikan selama tanaman berada dalam botol kultur sehingga aktivitas heterotrofik dapat tetap berlangsung sampai tanaman ditransplantasi ke lingkungan ex-vitro. Kegiatan heterotrofik berkepanjangan tersebut dapat menjadi penyebab rendahnya aktivitas autotrofik plantlet setelah transplantasi ke lingkungan ex-vitro. Untuk mengembalikan pertumbuhan autotrofik, beberapa perlakuan perlu diberikan agar tanaman cukup kuat menghadapi lingkungan baru ex-vitro. Paper ini membahas beberapa perlakuan terutama kemungkinan perlunya pemberian auxin setelah plantlet dipindahkan ke lingkungan baru ex-vitro.

**Kata kunci:** Auxin, autotrofik, anggrek, ex-vitro.

## ABSTRACTS

*Auxin is firstly invented growth regulator and plays a central role during plant growth and development. Addition of this growth regulator in cell and tissues culture has been known to enhance cell development. In this culture, the auxin is added exogenously into media containing sucrose, micro and macro nutrient, vitamin and myo-inositol. For the growth of explants, organic compounds added into the growth medium are used as nutrient. So, it is synthesized to produce macromolecules required during morphogenesis. In theory, an autotrophic organism synthesizes organic compounds from inorganic nutrient taken up via the root or leaves system. So, development of explants into callus and eventually plantlet is therefore can be viewed as heterotrophic activity, since it takes up sucrose as nutrient for growth rather than inorganic. In tissues or cell culture, media continuously contain organic compound, even after plantlet has produced chlorophyll. This media enable the plantlet to maintain it heterotrophic activity. However after transplantation, the prolonged heterotrophic activity can make the plants to have a low autotrophic activity. So, in order to resume autotrophic activity and enhanced viability, some treatments are required. This paper discuss some of the treatments particularly the possibility of auxin addition after transplantation of plantlet into a new ex-vitro environment.*

**Key word:** Auxin, autotrophic, orchid, ex-vitro

## PENDAHULUAN

Tumbuhan yang bernilai ekonomi tinggi tetapi sulit berkembang biak secara alami biasanya dikembangkan dengan teknik kultur jaringan. Anggrek adalah salah satu jenis tanaman yang sulit berkembang biak secara alami tetapi memiliki nilai ekonomi tinggi. Pengembangan tanaman ini menjadi bibit melalui teknik kultur jaringan telah banyak berhasil, tetapi menumbuhkan bibit botol pada lingkungan *ex-vitro* menjadi tanaman dewasa masih menemukan banyak permasalahan. Bibit yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan ini biasanya memiliki kemampuan autotrofik yang rendah (Daisy dan Wijayani, 1994). Rendahnya kemampuan autotrofik menyebabkan tanaman tidak memiliki bahan organik yang cukup untuk pertumbuhan karena laju sintesis senyawa ini dari senyawa anorganik sangat rendah.

Disamping kelemahan autotrofik, kondisi khusus yang digunakan untuk mengembangkan bibit dengan teknik kultur jaringan ini dapat menghasilkan tanaman yang abnormal, baik morfologi, anatomi maupun fisiologi. Kondisi-kondisi khusus tersebut antara lain, penggunaan botol yang tertutup rapat, pemberian zat pengatur tumbuh dan pemberian karbohidrat (Mineo, 1990, Deasy dan Wijayani, 1994). Menurut Pospisilova (1999), tanaman yang tumbuh dalam botol yang tertutup rapat mengakibatkan daun tidak memiliki lapisan pelindung yang cukup tebal. Apabila tanaman ini kemudian dipindahkan ke lingkungan *ex-vitro* maka penguapan yang berlebih tidak dapat ditahan. Selanjutnya dikatakan bahwa pemberian hormon untuk menumbuhkan bibit secara *invitro* dapat menghasilkan tanaman yang abnormal. Tanaman ini akan mudah rusak pada lingkungan *ex-vitro*. Disamping pemberian hormon, pemberian karbohidrat pada bibit botol juga dapat menghasilkan tanaman yang mudah rusak karena serangan bakteri. Kelemahan-kelemahan tanaman yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan, seperti yang dikemukakan oleh Pospisilova tersebut, menunjukkan bahwa

penelitian lanjutan perlu dilakukan agar hasil pengembangan bibit secara *invitro* dapat ditumbuhkan menjadi tanaman dewasa yang produktif. Hal ini terutama karena regenerasi sebuah sel atau jaringan tanaman menjadi tanaman utuh yang baru hampir tidak mungkin dilakukan tanpa pemberian kondisi-kondisi khusus.

Teknik kultur jaringan merupakan upaya melakukan transformasi sistem yang ada pada tanaman sehingga sel atau jaringan yang terisolasi dapat tumbuh menjadi tanaman yang utuh (<http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199282616/ch02.pdf>). Karena sel atau jaringan tersebut terisolasi maka segala kebutuhan untuk pertumbuhannya mesti disediakan dalam media, termasuk karbohidrat, hormon, asam amino dan unsur hara anorganik. Pada proses transformasi ini terjadi perubahan sel vegetatif sedemikian rupa sehingga terbentuk sel baru yang dapat berkembang menjadi tanaman utuh. Perbanyak tumbuhan ini meniru mekanisme pembentukan embrio dari tubuh induk tanaman. Perubahan sebuah sel vegetatif menjadi kumpulan sel yang terorganisir sebagai individu baru memerlukan adanya zat pengatur tumbuh yang berfungsi untuk mengubah jalur morfogenesis pada tanaman. Misalnya, sel yang tidak lagi melakukan differensiasi dirangsang untuk melakukan differensiasi kembali dengan pemberian sitokinin atau auksin. Sitokinin berfungsi untuk merangsang sintesis DNA dan mempercepat pembelahan sel, sedangkan auksin diperlukan untuk merangsang pemanjangan sel (Mineo, 1990). Pemberian gula juga perlu dilakukan karena sel yang terisolasi dan ditempatkan dalam botol belum mampu mensintesa karbohidrat karena beberapa faktor seperti tidak adanya penyediaan CO<sub>2</sub> ataupun perangkat fotosintesis. Kondisi-kondisi khusus yang harus disediakan ini mengakibatkan tanaman memiliki variasi morfologi, anatomi maupun fisiologi (Papisilova 1999). Paper ini membahas beberapa perlakuan *invitro* untuk menumbuhkan bibit tanaman dan perlunya

pemberian perlakuan khusus pada lingkungan *ex-vitro* agar bibit tersebut dapat tumbuh menjadi tanaman yang produktif

## PEMBAHASAN

### Peran auxin dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman

Auxin adalah hormon tumbuhan yang ditemukan pertama kali. Senyawa ini memegang peran kunci dalam pertumbuhan, perkembangan dan respon tumbuhan terhadap perubahan lingkungan (Tromas & Perrot-Rechenmann, 2010). Menurut Vieten *et al.* (2007), pada proses morfogenesis, auxin melakukan pengaturan baik pada fase embryogenesis, organogenesis, differensiasi jaringan pengangkutan, pemeliharaan meristem akar maupun pertumbuhan trofik. Selanjutnya dikatakan bahwa peran yang dimiliki oleh auxin ini dijalankan dengan cara memicu perubahan program pembangunan melalui pemberian informasi vektorial pada jaringan. Secara lebih rinci, mekanisme yang dilakukan oleh auxin untuk mengubah program pembangunan diuraikan oleh Robert & Friml (2009). Menurut peneliti ini, auxin diproduksi pada bagian pucuk tanaman yaitu pada daun muda dan kuncup bunga. Senyawa ini selanjutnya ditransportasikan ke akar atau bagian lain tanaman melalui beberapa jalur translokasi, terutama sistem pembuluh dan jalur transport interseluler. Pada sel tujuan, akumulasi auxin differential kemudian terjadi dan diterima serta diinterpretasi oleh inti yang mengatur ekspresi gen dan perencanaan kembali nasib sel (Robert & Friml, 2009). Kemampuan auksin untuk melakukan perubahan ekspresi gen mengakibatkan senyawa ini menjadi sangat penting dalam upaya mengaktifkan kembali sel yang telah menghentikan proses differensiasi.

Dalam teknik kultur jaringan, sel tanaman yang dikembangkan menjadi tanaman baru umumnya telah menghentikan proses differensiasi. Pada kondisi media yang sesuai, sel eksplant berkembang melalui beberapa tahap. Pada tahap

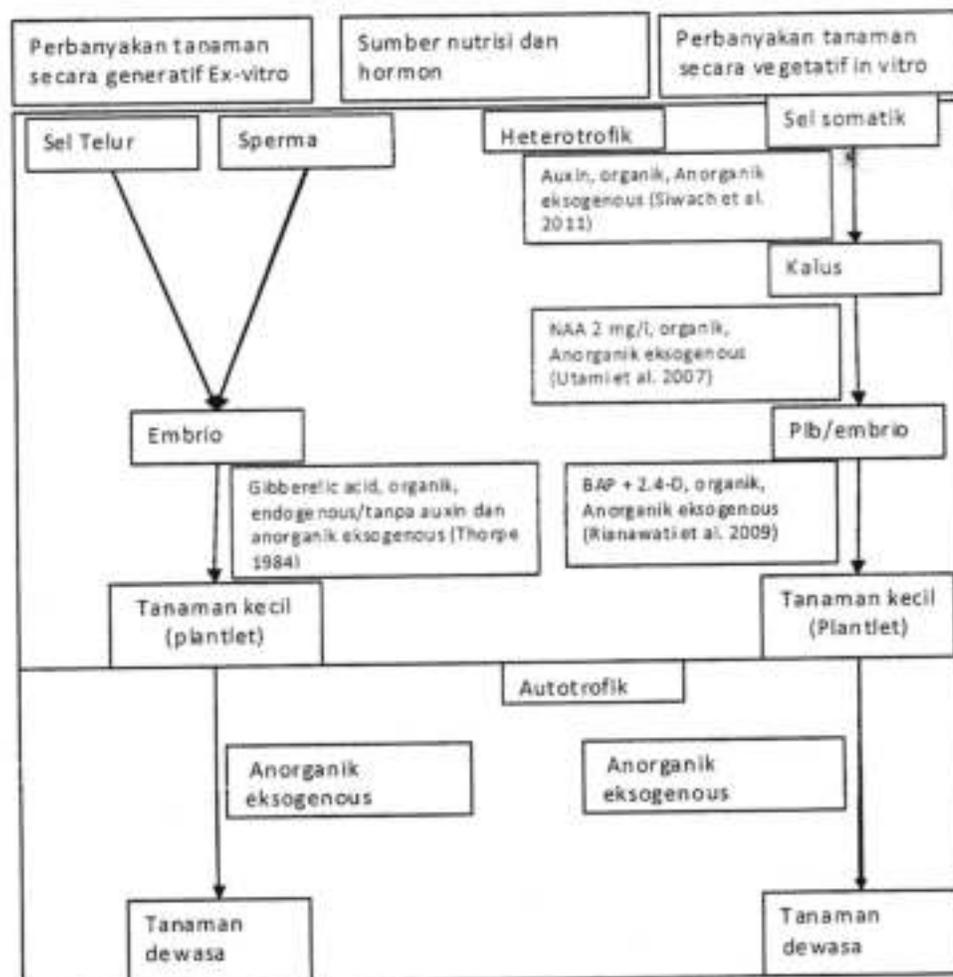
awal, sel eksplant tumbuh menjadi sel kalus setelah diinduksi oleh hormon pertumbuhan terutama auxin (Siwach *et al.* 2011). Kumpulan sel ini kemudian berkembang menjadi plantlet setelah pembentukan plb (*protocorm like body*). Plb ini memiliki tingkat perkembangan seperti embrio, sehingga disebut juga embrio somatik (Rianawati *et al.* 2009). Berbeda dengan embrio pada biji yang terbentuk melalui fusi sel telur dan sperma dan dirancang untuk berkembang menjadi embrio, embrio somatik ini berkembang dari sel somatik yang memperoleh kompetensi untuk dapat merespon signal embriogenik dan memulai pembangunan embrio (Pasternak *et al.* 2002). Pada teknik kultur jaringan, pertumbuhan embrio somatik diinduksi dengan penambahan auxin sintetik NAA (Utami *et al.* 2007). Dengan pemberian zat pengatur tumbuh BAP (sitokinin) dan 2,4-D (auxin), plb ini kemudian dapat tumbuh menjadi plantlet (Rianawati *et al.* 2009). Morphogenesis dalam kultur jaringan ini disebut juga dengan proses 3 langkah (Komal, 2011).

Walaupun individu baru yang terbentuk (plantlet) telah memiliki organ yang lengkap, tetapi tanaman kecil ini masih memiliki aktivitas autotropik yang rendah (Daisy & Ari Wijayani, 1994) dan jaringan pengangkutan lemah (Robinson *et al.* 2009). Kelemahan sistem yang terjadi pada tanaman ini merupakan akibat samping dari kondisi yang digunakan untuk menumbuhkan tanaman secara *invitro*. Kondisi khusus ini sesungguhnya tidak sesuai dengan sistem yang autotrof yang mengubah senyawa anorganik menjadi senyawa organik. Secara skematis, sumber nutrisi untuk pertumbuhan embrio pada biji dan pertumbuhan sel somatik pada kultur jaringan digambarkan pada Gambar 1. Pada gambar ini nampak bahwa pertumbuhan *invitro* menggunakan sumber organik yang tidak dibuat sendiri (*exogenous*), sedangkan tanaman yang dikembangkan dari biji menggunakan senyawa organik yang dibuat sendiri (*endogenous*) untuk pertumbuhan. Sumber nutrisi yang berbeda ini dapat berpengaruh pada jalur metabolisme yang bekerja melalui

mekanisme keseimbangan substrat dan produk. Apabila pemberian substrat terlalu banyak maka tanaman utuh yang dihasilkan akan memiliki variasi dari tanaman normal baik anatomi, morfologi maupun fisiologi. Oleh karena itu, bibit tanaman hasil kultur jaringan masih memerlukan penyempurnaan, terutama setelah transplantasi ke lingkungan ex-vitro. Jadi, sebelum tanaman dapat dibudidayakan dalam lingkungan alami ex-vitro, hasil kultur jaringan masih memerlukan perlakuan yang memungkinkan proses fisiologis berjalan normal dalam kondisi yang sangat berbeda dengan lingkungan invitro.

### Fisiologi dan morfologi bibit hasil kultur jaringan

Pada fase awal pertumbuhan ex-vitro, tanaman hasil kultur jaringan nampaknya masih bersifat heterotrofit, yaitu lebih menyukai senyawa organik *exogenous* dari pada memproduksi sendiri secara autotrof. Sifat heterotrofit ini dapat terjadi karena kondisi pertumbuhan yang ada ketika masih berada dalam lingkungan kultur jaringan. Mulai dari menabur eksplant sampai terbentuknya plantlet, media tanam selalu mengandung senyawa organik yang seharusnya diproduksi oleh tumbuhan itu sendiri secara autotrofik (Gambar 1).



Gambar 1. Perbedaan sumber nutrisi dan hormon untuk pertumbuhan tanaman yang berasal dari biji dan tanaman yang dikembangkan dari sel somatik kultur jaringan

Senyawa organik tersebut antara lain; vitamin, hormon, mioinositol dan sukrosa (Daisy & Ari Wijayani 1994). Pemberian senyawa organik eksogenous ini kemungkinan ikut berperan sebagai sinyal untuk mengarahkan kegiatan morfogenesis dan mengakibatkan terjadinya penurunan kemampuan daerah meristematik untuk menumbuhkan jaringan yang berfungsi untuk mengimpor hasil fotosintesis dari perangkat fotosintesis seperti kloroplas. Penurunan pertumbuhan jaringan ini selanjutnya mempengaruhi aktivitas enzim yang terdapat dalam perangkat fotosintesis. Secara teori, apabila produk suatu enzim melebihi titik kesetimbangan, maka aktivitas enzim tersebut akan mengalami hambatan umpan-balik. Mekanisme hambatan inilah yang kemungkinan terjadi pada tanaman ketika masih berada di dalam botol kultur. Oleh karena itu, setelah ditransplantasi ke lingkungan yang alami di luar botol, bibit ini memiliki kemampuan yang sangat rendah untuk menghasilkan senyawa organik secara autotrof.

Masalahnya adalah bagaimana menginduksi tanaman ini agar perangkat fotosintesis dan jaringan pengangkutan cukup banyak tersedia agar biosintesis autotrofik menjadi meningkat. Mengingat pengaturan pertumbuhan ditentukan oleh auxin, yang memiliki peran kunci dalam pertumbuhan dan perkembangan terutama akibat perubahan lingkungan (Tromas & Perrot-Rechenmann, 2010), maka perbaikan aktivitas autotrofik bibit anggrek botol ini nampaknya masih memerlukan auxin eksogenous untuk menyempurnakan pertumbuhan autotrofiknya. Namun demikian, pemberian auxin juga bukan tanpa masalah. Senyawa ini diperlukan dalam jumlah yang sangat rendah dan harus memiliki proporsi yang sesuai dengan senyawa lain agar pertumbuhan autotrofik dapat berlangsung (Albert *et al.* 1983).

#### **Perbanyak tanaman anggrek**

Tanaman angrek dapat dikembangkan baik secara tradisional (*ex-vitro*) maupun secara

modern (*in-vitro*). Pengembangan bibit secara tradisional umumnya tidak menggunakan senyawa organik eksogenous sebagai sumber nutrisi. Sebaliknya, penyediaan nutrisi baik organik, anorganik bahkan hormon pertumbuhan sangat penting jika ingin memperbanyak tanaman menggunakan teknik modern kultur jaringan (Daisy & Wijayani, 1994; Rianawati *et al.* 2009). Untuk perbanyak tanaman anggrek dengan teknik kultur jaringan, bahan tanaman dapat berupa biji atau berupa bagian vegetatif tanaman. Biji dan bagian vegetatif sebagai bahan tanaman yang dikembangkan dengan cara modern ini memiliki perbedaan jalur morfogenesis. Biji telah memiliki embrio sedangkan bagian vegetatif tanaman tidak memiliki embrio. Oleh karena itu, jika bahan tanaman diambil dari bagian sel somatik maka pekerjaan yang diperlukan adalah mulai dari menumbuhkan kalus, embrio somatik dan akhirnya menumbuhkan plantlet (Gambar 1). Walaupun dapat menghasilkan banyak tanaman baru, setiap sel dapat menjadi tanaman baru, tetapi persyaratan teknis yang harus dipenuhi sangat tinggi. Keberhasilan teknik modern ini tergantung tidak hanya dari alat dan bahan laboratorium, tetapi juga ketrampilan teknisi yang menangani.

Biji adalah alat reproduksi, memiliki embrio yang dihasilkan dari fusi sel telur dan spema. Oleh karena sel gamet, telur dan sperma, ini berasal dari dua organisme yang berbeda, maka tanaman yang dihasilkan memiliki sifat yang merupakan gabungan dari sifat induknya. Pada teknik kultur jaringan dikatakan bahwa tanaman yang dihasilkan dari biji ini biasanya tidak seragam (Rianawati *et al.* 2009). Untuk mendapatkan tanaman yang seragam maka pemakaian sel somatik lebih disukai dari pada menggunakan biji. Akan tetapi, untuk dapat menjadi tanaman utuh, sel somatik harus melakukan perubahan program pembangunan dari sel vegetatif, kalus, embrio somatik, plantlet hingga menjadi tanaman dewasa (Gambar 1). Dari segi praktis di lapangan, perubahan program memerlukan penanganan yang jauh lebih rumit, memerlukan pemberian

auxin, senyawa organik, anorganik dan kondisi yang aseptik.

Kemampuan awal yang harus dimiliki sel somatik ekplant untuk dapat tumbuh menjadi kalus adalah kemampuan menggunakan nutrient yang disediakan dalam media kultur. Untuk tujuan ini, sel somatik tersebut kemungkinan mengarahkan differensiasi untuk pengembangan jaringan yang berfungsi untuk menyerap sumber nutrisi organik eksogenous. Tanpa kemampuan ini, sel tidak dapat tumbuh karena sumber karbon hanya berasal dari lingkungan yaitu media kultur. Akan tetapi, setelah terbentuk kloroplas, yaitu pada fase plb (Utami *et al.* 2007, Rianawati *et al.* 2009), morfogenesis mungkin masih tetap diarahkan untuk pengembangan jaringan yang memiliki fungsi sama, disamping karena jumlah kloroplast masih sedikit, senyawa organik eksogenous masih tersedia dan tidak ada lapisan yang menutup import senyawa organik eksogenous. Hal ini berbeda dengan biji (dikotil) yang dikembangkan secara ex-vitro, embrio berkembang dalam 2 kutub secara berimbang. Senyawa organik yang tersedia secara endogenous disiapkan untuk dapat mengembangkan pertumbuhannya ke kedua kutub tersebut dan ketika persediaan ini habis, tanaman telah memiliki jaringan yang berfungsi untuk menyerap senyawa anorganik dan jaringan yang berfungsi untuk menyalurkan hasil fotosintesis. Sebaliknya, pada tanaman yang dikembangkan secara invitro, kutub pertumbuhan dapat sangat bervariasi (Rao dan Narayanaswami 2006). Menurut peneliti ini, potensi pertumbuhan bervariasi menurut nutrisi yang diberikan, dapat membentuk akar, daun, embrio bipolar dan plantlet. Pada tanaman yang dikembangkan dengan medium MR yang diberi BAP 0.4 mg/l dan 2.4-D 0.2mg/l, sel-sel dapat diinduksi untuk menumbuhkan kotiledon, primordia tunas dan akar (Rianawati *et al.* 2009). Induksi tunas juga terjadi pada tanaman yang dikembangkan dengan media NP ditambah 2 mg/L NAA (Utami *et al.* 2007). Penelitian yang dilakukan pada anggrek terrestrial *Bletia*

*purpurea* menemukan bahwa perkecambahan biji tidak tergantung pada nutrient, tetapi perkembangan lanjutan hanya dapat terjadi pada media Vacint-Went (Dutra *et al.* 2008). Variasi pertumbuhan tanaman invitro ini kemudian menyebabkan bibit botol memiliki variasi kesiapan jaringan pengangkutan. Hal ini tidak terjadi pada pengembangan bibit secara ex-vitro karena sumber nutrisi organik telah disiapkan pada kotiledon dan redistribusinya diatur secara terprogram dalam DNA. Program ini sangat spesifik menurut spesies dan calon jaringan yang berfungsi untuk menyalurkan nutrisi organik telah terbentuk bahkan ketika masih dalam biji.

Secara teori, jika persediaan makanan cadangan telah habis, tanaman telah memiliki akar yang cukup untuk memperoleh nutrient anorganik. Sebaliknya, perkembangan jaringan pengangkutan pada tanaman yang dikembangkan dengan kultur jaringan, nampaknya jauh lebih lambat dan sangat tergantung pada komposisi nutrient dan posisi explant terhadap nutrient. Mekanisme adaptasi struktur dengan demikian sangat diperlukan oleh bibit tanaman invitro karena pembentukan daun dan akar tidak diimbangi oleh peningkatan jaringan pengangkutan sehingga pengambilan nutrient anorganik untuk disintesa menjadi senyawa organik endogenous menjadi sangat sulit. Kesulitan adaptasi juga dapat terjadi karena pemanfaatan nutrient organik eksogenous tetap berlangsung walaupun akar dan daun telah terbentuk (Gambar 2). Akibatnya adalah akar menjadi tidak memiliki sink strength yang cukup tinggi bagi produksi fotosintesis yang dibuat didaun. Produk fotosintesis kemudian tidak dapat mengalami floem loading dan menjadi penghambat umpan-balik bagi enzim fotosintesis. Kesulitan lain adalah bahwa tanaman yang dikembangkan secara invitro biasanya memiliki daun yang lemah secara anatomi (Robinson *et al.* 2009). Menurut peneliti ini, daun dari tanaman yang dikembangkan secara invitro memiliki jaringan floem yang sangat sedikit. Besar kemungkinan bahwa lambatnya pertumbuhan

jaringan floem ini disebabkan oleh lemahnya induksi jalur pertumbuhan jaringan floem dari daun karena sukrosa didapat sebagian besar dari nutrient secara eksogenous (Gambar 2).

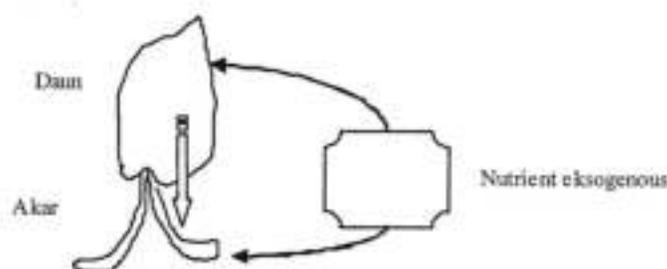
Lambatnya pengembangan jaringan floem ini dapat menjadi penyebab lemahnya aktivitas autotrofik pada bibit anggrek botol. Struktur floem yang sedikit tidak memungkinkan terjadinya pengangkutan yang banyak sehingga organ fotosintesis tidak memproduksi hasil fotosintesis dalam jumlah yang besar. Produk fotosintesis yang rendah tidak cukup kuat untuk membantu induksi pertumbuhan floem yang ekstensif. Walaupun faktor yang menjadi penyebab atau menjadi akibat tidak jelas, upaya perbaikan aktivitas autotropik tanaman invitro setelah berada pada lingkungan ex-vitro dapat diupayakan melalui peningkatan aktivitas enzim fotosintesis dan peningkatan pertumbuhan jaringan pengangkutan.

#### Hubungan Kerja Auxin, Sukrosa dan Unsur Hara Mineral Pada Pertumbuhan Tanaman

Tumbuhan utuh adalah organisme autotrof, bekerja sebagai pengubah senyawa anorganik menjadi senyawa organik. Berbeda dengan eksplant yang harus ditumbuhkan dengan pemberian berbagai senyawa organik, pertumbuhan tanaman utuh hanya memerlukan unsur hara anorganik. Pada tanaman utuh ini sumber energi berasal dari matahari, bukan dari nutrient yang diserap dari lingkungan. Unsur hara anorganik ini, akan diserap melalui akar dan

disintesa menjadi senyawa organik sesuai dengan kebutuhan pertumbuhan. Masalah penting pada pemberian senyawa anorganik ini adalah bahwa akumulasi mineral pada jaringan dapat menyebabkan hambatan fisiologis dan pada tingkat tertentu dapat mengakibatkan keracunan. Sebaliknya, apabila unsur hara ini tidak tersedia dalam jumlah yang cukup maka senyawa organik yang dibutuhkan tidak dapat disintesa.

Unsur hara mineral telah lama dikenal mampu mempengaruhi aktivitas autotrofik yaitu menyusun senyawa organik dari senyawa anorganik (Gardner, Pearce dan Mitchell 1991). Penelitian yang dilakukan pada beberapa tanaman (yang dikembangkan secara ex-vitro) menunjukkan bahwa unsur hara sangat menentukan laju fotosintesis maupun pertumbuhan. Misalnya, defisiensi unsur hara fosfor pada tanaman menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas fotosintesis (Sawada *et al.* 1982, Terry dan Ulrich 1973). Kekurangan unsur hara N mengakibatkan terjadinya penurunan asimilasi carbon (Gastal dan Lemaire 2002). Pada tanaman tomat, Kanai *et al.* (2007) menemukan bahwa pengurangan ketersediaan unsur hara pottasium menyebabkan aktivitas fotosintesis menurun. Sedangkan pada tanaman barley ditemukan bahwa kekurangan unsur hara sulfur menyebabkan laju pertumbuhan menurun (Adiputra dan Anderson 1995). Hasil penelitian tersebut jelas membuktikan bahwa unsur hara anorganik menentukan aktivitas autotrofik pada tanaman. Permasalahannya adalah apakah



Gambar 2. Hambatan pembentukan jaringan pembuluh karena import nutrient organik eksogenous yang berkepanjangan.

tanaman utuh yang dikembangkan secara kultur jaringan dan memiliki variasi perkembangan jaringan pengangkutan, memberi respon yang sama terhadap unsur hara anorganik yang diberikan.

Berbeda dengan tanaman yang dikembangkan secara *ex-vitro*, bibit tanaman yang dikembangkan secara *invitro* ditemukan memiliki jaringan floem yang sedikit (Robinson *et al* 2009) dan aktivitas autotrofik yang rendah (Daisy dan Wijayani 1994). Kedua kelemahan yaitu struktur dan fisiologi ini kemungkinan memiliki hubungan sebab-akibat. Pada kondisi *invitro*, translokasi produk fotosintesis dari daun tidak banyak terjadi karena sumber karbon tersedia secara eksogenous. Sedikitnya ekspor hasil fotosintesis dari daun ini mengakibatkan pertumbuhan jaringan pengangkutan dari daun ke bagian tanaman lainnya tidak perlu memiliki daya angkut yang tinggi. Akibatnya adalah hasil fotosintesis yang diproduksi di daun sulit didistribusikan dan dapat menjadi penghambat umpan-balik bagi enzim fotosintesis. Hambatan, yang berlangsung lama dan menjadi represor bagi gen yang mengkode penghasilan enzim fotosintesis, akan mengubah perilaku morfogenesis. Perubahan perilaku ini terutama terjadi pada sistem penyerapan unsur hara. Misalnya akar pada tanaman *invitro* yang seharusnya berfungsi untuk menyerap nutrient anorganik, tetapi karena tidak memperoleh penyediaan hasil fotosintesis dari daun maka akan mengubah morfogenesis untuk dapat berfungsi sebagai jaringan penyerap nutrient organik eksogenous. Sumber organik eksogenous ini kemudian disintesa menjadi molekul struktural dan fungsional pada tumbuhan tersebut dan digunakan untuk pertumbuhan. Sebaliknya, daun yang seharusnya menjadi sumber senyawa organik bagi pertumbuhan akar akan berubah fungsi menjadi tempat penyerapan unsur hara karena akar tidak menyediakan unsur hara ini untuk disintesa menjadi senyawa organik di dalam daun. Kemungkinan ini, walaupun kecil, dapat terjadi terutama karena pada media tersedia

sukrosa dan hormon auxin yang bekerja sama sebagai signal morfogenesis (Hammond and White 2008).

Pada biji anggrek, pertumbuhan embrio menjadi tanaman dewasa tergantung dari sukrosa eksogenous, yang terdapat pada media, karena biji anggrek tidak memiliki sediaan makanan cadangan. Pada proses penumbuhan biji anggrek ini menjadi tanaman utuh, senyawa organik eksogenous menjadi sinyal untuk mengarahkan pertumbuhan jaringan transport. Pada prakteknya, posisi biji anggrek terhadap media dapat sangat bervariasi dan hampir tidak mungkin untuk mengatur bahwa calon akar harus berada didalam media dan calon daun berada diluar media. Oleh karena itu, baik calon akar maupun calon daun memiliki peluang yang sama untuk bersentuhan dengan media dan menyerap nutrient eksogenous yang diperlukan, baik organik maupun anorganik untuk pertumbuhan. Pada tingkat ini terjadi permasalahan yaitu bagian mana dari embrio yang menyerap unsur hara anorganik dan bagian mana yang menyerap senyawa organik. Hal ini sangat berbeda dengan biji tanaman yang memiliki bahan makanan cadangan. Sebelum embrio mengambil unsur hara dari luar, bahan makanan disalurkan dari tempat penyimpanan untuk pertumbuhan akar, daun maupun jaringan pengangkutan. Topografi dari saluran penyedia makanan cadangan ini terletak antara calon akar dan calon daun. Walaupun berada didalam media (*persemaian*) calon akar maupun calon daun tidak pernah bersentuhan dengan sukrosa atau auxin eksogenous yang dapat mengubah program pembangunan jaringan apakah akar maupun daun. Jadi pada biji yang memiliki persediaan makanan cadangan, program pembangunan jaringannya tidak pernah terganggu oleh auxin ataupun sukrosa eksogenous. Hal yang sebaliknya terjadi pada tanaman yang dikembangkan menggunakan teknik kultur jaringan. Sukrosa dan auxin eksogenous memang sengaja diberikan untuk mengubah program pembangunan agar terjadi proses redifferensiasi.

Tanpa proses ini, sel somatik dari explant tidak akan pernah tumbuh menjadi tanaman baru yang utuh. Secara skematis, perbedaan sumber nutrisi yang digunakan untuk pertumbuhan embrio biji dan embrio somatik (plb) dapat dilihat pada gambar 3.

Gambar 3. A. Pemberian auxin dan sukrosa eksogenous akan mengubah program pembangunan jaringan dari sel somatis ke individu baru. B. Embrio yang tumbuh hanya dari sediaan makanan cadangan tidak mengalami perubahan program pembangunan yang telah dirancang secara genetik melalui fusi sel telur dan sperma.

Persoalannya adalah bagaimana sukrosa dan auxin eksogenous tersebut memberi signal agar akar dan daun yang terbentuk memiliki jaringan penghubung (xylem dan floem) yang kuat. Jika hal ini dapat dilakukan, maka akar dengan mudah menyalurkan unsur hara dan daun juga tidak kesulitan menyalurkan hasil fotosintesis. Akan tetapi, penyediaan auxin dan sukrosa pada media tidak terjadi melalui mekanisme pengaturan produksi dan redistribusi yang terprogram secara genetik sehingga tidak tersedia aturan sampai tahap mana redifferensiasi harus dilakukan. Pada teknik invitro ini, jumlah auxin dan sukrosa yang tersedia hanya tergantung pada formula yang digunakan. Sebagai pembandingan dapat dilihat mekanisme produksi dan distribusi auxin pada tanaman autotrof.

Dalam tubuh tanaman ini auxin diproduksi melalui mekanisme genetik dalam pucuk daun atau kuncup bunga sehingga sesuai dengan rencana pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Auxin ini selanjutnya didistribusikan ke sel tujuan, diterima dan diinterpretasi untuk memproduksi enzim juga melalui mekanisme genetik sehingga sesuai dengan rencana pertumbuhan dan perkembangan sel tujuan. Pada teknik kultur jaringan mekanisme genetik ini tidak ada terutama pada jumlah yang harus disediakan sebelum distribusi. Hampir tidak mungkin menyediakan auxin dan sukrosa pada media menggunakan mekanisme yang sama seperti pucuk tanaman menyediakan auxin atau sukrosa. Pengaturan produksi melalui mekanisme genetik ini dapat digambarkan sbb: Fase pucuk atau kuncup berlangsung pada periode tertentu sebelum memasuki fase dewasa. Dua fase ini memiliki mekanisme fisiologi yang berbeda yaitu mula-mula menjadi pengimport sukrosa ketika masih dalam fase kuncup tetapi kemudian memproduksi sendiri setelah menjadi daun dewasa. Apabila daun memproduksi auxin hanya pada fase pucuk (Robert and Friml 2009), maka berarti bahwa produksi auxin hanya terjadi ketika daun mengimport sukrosa dan tidak terjadi setelah daun memproduksi sukrosa. Perubahan fisiologi daun dari produsen auxin ke produsen sukrosa tentu melalui mekanisme genetik karena enzim yang terlibat dalam proses fisiologi itu tidak dapat



Gambar 3. A. Pemberian auxin dan sukrosa eksogenous akan mengubah program pembangunan jaringan dari sel somatis ke individu baru. B. Embrio yang tumbuh hanya dari sediaan makanan cadangan tidak mengalami perubahan program pembangunan yang telah dirancang secara genetik melalui fusi sel telur dan sperma.

dihasilkan tanpa melibatkan gen. Periode peralihan produksi auxin dan sukrosa pada pucuk ini akan berakibat pada perubahan waktu penyediaan auxin untuk pertumbuhan akar. Periode ini nampaknya cukup signifikan untuk mempengaruhi arah pembangunan jaringan dan dikenal sebagai apikal dominan (Suyitno 2006). Pada teknik kultur jaringan, mekanisme dominansi pucuk ini nampaknya belum banyak diperhatikan. Sukrosa dan auxin disediakan secara bersamaan sehingga ketika sel menjadi importir auxin dia juga importir sukrosa. Tanpa mekanisme genetik ini, morfogenesis dapat berlangsung tetapi banyak yang tidak sesuai dengan rencana dasar pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Mekanisme penyediaan sukrosa untuk pertumbuhan plb menjadi plantlet juga dapat berpengaruh pada rendahnya kapasitas jaringan transport pada bibit hasil kultur jaringan ini. Pada tanaman yang dikembangkan dengan biji, nutrient organik untuk pertumbuhan embrio diimport atas permintaan embrio itu sendiri. Embrio mengeluarkan hormon gibberelin untuk menginduksi enzim yang dapat memecah bahan makanan cadangan. Setelah menjadi molekul sederhana, bahan makanan diserap untuk pertumbuhan akar atau daun. Tanaman ini baru akan memproduksi auxin setelah pucuk tanaman terbentuk. Bersama sama hasil fotosintesis, auxin disalurkan untuk pengembangan sistem perakaran. Jadi sistem perakaran dikembangkan oleh auxin melalui saluran floem yang telah terbentuk dan fungsional. Jadi pada tanaman ini, tidak terjadi pengembangan akar tanpa saluran pengangkutan dari daun. Pada teknik kultur jaringan, perencanaan pembangunan jaringan ini menjadi agak kacau. Pada komposisi hormon yang diberikan, sel kalus hanya tumbuh menjadi akar dan pada komposisi lain hanya tumbuh menjadi daun (Albert *et al.* 1983). Sangat besar kemungkinan pada komposisi lainnya, kalus akan membentuk akar dan daun tetapi tidak memiliki jaringan pengangkutan yang menghubungkan akar dan daun secara fungsional. Keadaan ini

telah ditemukan oleh Robinson (2009) bahwa jaringan pengangkutan pada tanaman yang dikembangkan dengan kultur jaringan sangat lemah. Hal ini diperkuat oleh temuan sebelumnya bahwa orientasi pertumbuhan jaringan dalam kultur sangat ditentukan oleh jenis nutrient (Rao dan Narayanaswami 2006).

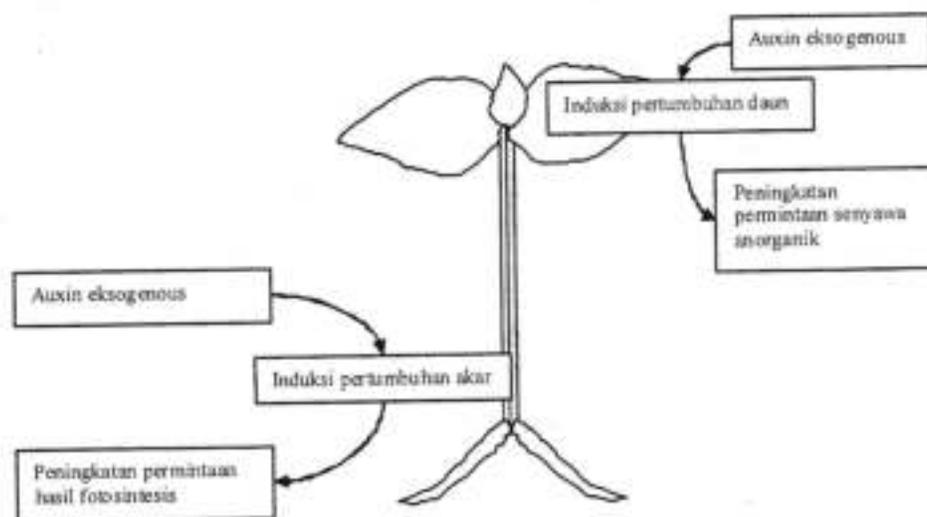
Jika auxin dan sukrosa eksogenous secara kontinu mengarahkan pembangunan jaringan (Hammond and white 2008) untuk dapat menyerap senyawa organik eksogenous, misalnya sampai melewati fase pembentukan organ fotosintetik, maka fungsi organ fotosintetik sebagai produsen senyawa organik akan menjadi sangat lemah. Penyebab utamanya adalah karena senyawa organik yang digunakan untuk pertumbuhan diserap dari media kultur dan tidak dari organ fotosintetik. Hal inilah yang menjadi persoalan ketika plantlet kemudian dipindahkan ke lingkungan *ex-vitro*. Pada lingkungan *ex-vitro* ini, tempat penyerapan senyawa organik sukrosa segera tertutup sementara penyerapan dan pengangkutan senyawa anorganik melalui jaringan xylem sangat sedikit. Walaupun tanaman dapat memproduksi senyawa organik untuk mengganti senyawa organik yang sebelumnya diimport, tetapi karena jumlahnya tidak banyak dan jaringan penyalurannya masih lemah, maka bibit tanaman hasil kultur jaringan ini memerlukan penanganan khusus untuk dapat tumbuh menjadi tanaman dewasa. Penanganan ini terutama untuk memperbaiki jaringan pengangkutan agar hasil fotosintesis maupun unsur hara dapat tersalur sesuai dengan perencanaan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Pemberian unsur hara yang sesuai kebutuhan sangat diperlukan, karena nutrient dapat mempengaruhi pertumbuhan jaringan (Rao dan Narayanaswami 1972). Pemberian auxinpun dapat dipertimbangkan karena senyawa ini dapat menginduksi enzim untuk mengarahkan pertumbuhan morfogenesis (Robert dan Friml 2009).

Variasi pemberian unsur hara dan auxin pada lingkungan *ex-vitro* untuk memperbaiki

pertumbuhan jaringan pengangkutan adalah sangat mungkin karena kedua senyawa ini termasuk molekul kecil dan dapat melakukan transport intercelluler. Dengan tidak tersedianya sukrosa eksogenous, perlakuan ini sangat mungkin dapat meningkatkan aktivitas fotosintesis yang diikuti oleh pengembangan jaringan floem dan diikuti oleh pengembangan jaringan xylem yang mengangkut unsur hara dari akar.

Tergantung pada jenis tanaman dan kondisi lingkungan, perbaikan jaringan penghubung antara akar dan daun atau sebaliknya, perlu dilakukan untuk meningkatkan aktivitas autotrofik bibit dari kultur jaringan. Kajian tentang variasi pemberian senyawa anorganik (tanpa senyawa organik eksogenous) mungkin sangat bermanfaat, demikian juga modifikasi faktor lingkungan lainnya. Pada angrek epifit, modifikasi fungsi dapat terjadi apabila tanaman menghadapi kondisi kekeringan. Pada tanaman ini terjadi mobilisasi senyawa glucomannan untuk mempertahankan metabolisme sehingga bahaya kekeringan dapat dikurangi (Stancato *et al.* 2001). Pada tanaman *Arabidopsis thaliana*, kekeringan diatasi dengan meningkatkan produksi aquaporin (Sade *et al.* 2010). Pada kondisi kekurangan unsur hara, tanaman biasanya merespon dengan peningkatan pertumbuhan akar baru (Cooper and Clarkson 1989, Hammond and White 2008). Pada mekanisme adaptasi ini, tanaman nampaknya meningkatkan pertumbuhan suatu struktur untuk mengatasi kekurangan baik air maupun unsur hara. Adaptasi struktur sangat mungkin juga terjadi pada daun apabila tanaman kekurangan produksi hasil fotosintesis. Tanaman akan meningkatkan pertumbuhan perangkat fotosintesis apabila keperluan akan sukrosa untuk pertumbuhan naik. Akan tetapi, untuk dapat terjadinya mekanisme adaptasi struktur ini, bahan bangunannya harus tersedia dalam jumlah yang cukup. Misalnya, untuk memperbanyak akar ketika unsur hara kurang maka pasokan sukrosa untuk pertumbuhan ini harus cukup. Sebaliknya,

apabila perangkat fotosintesis seperti klorofil harus diperbanyak karena keperluan hasil fotosintesis meningkat maka bahan penyusun klorofil seperti nitrogen harus tersedia dalam jumlah yang cukup. Faktor mana yang pertama harus diperbaiki agar masalah aktivitas autotrofik bibit kultur jaringan dapat diatasi. Apakah meningkatkan produksi sukrosa untuk meningkatkan pertumbuhan akar atau meningkatkan penyediaan unsur hara untuk perbaikan perangkat fotosintesis. Penulis menduga bahwa kedua hal ini dapat dilakukan secara bersamaan. Peningkatan produksi sukrosa untuk pertumbuhan akar dapat dilakukan melalui peningkatan supply air dan CO<sub>2</sub>. Pada angrek yang tergolong tanaman CAM, produksi hasil fotosintesis ditemukan naik apabila tanaman ditumbuhkan dengan kadar CO<sub>2</sub> yang dinaikkan dan dapat meningkatkan pertumbuhan terutama pertumbuhan akar (Sok Siam Gouk *et al.* 1999). Kenaikan aktivitas fotosintesis oleh pemberian CO<sub>2</sub> yang tinggi pada angrek CAM ini hampir sama dengan kenaikan fotosintesis yang terjadi pada tanaman *Triticum aestivum* yang ditumbuhkan secara *ex-vitro* (Mulholland *et al.* 1997). Apabila penyediaan unsur hara dinaikkan maka biosintesis perangkat fotosintesis akan naik. Akan tetapi hal ini baru akan terjadi apabila unsur hara tersebut bisa mencapai daun. Walaupun tidak sesuai dengan fungsi struktur pada organ tanaman, pemberian unsur hara lewat daun adalah alternatif karena jaringan pembuluh dari akar ke daun belum kuat. Pemberian unsur hara pada fase awal pertumbuhan diluar botol tentu harus dilakukan dengan sangat hati-hati karena akumulasi ion yang terlalu tinggi dapat menjadi toksik bagi tanaman (Flower dan Yeo 1986), atau dapat terjadinya induksi abscisic acid yang mengakibatkan tanaman menghentikan pertumbuhan (Bensen *et al.* 1988). Upaya perbaikan pertumbuhan jaringan pengangkutan dapat dilakukan melalui mekanisme seperti pada gambar 4.



Gambar 4. Pemberian auxin eksogenus melalui daun akan menginduksi pertumbuhan daun yang berakibat pada peningkatan permintaan akan unsur hara anorganik. Auxin yang diberikan melalui akar akan menginduksi pertumbuhan akar dan meningkatkan permintaan akan hasil fotosintesis. Dengan pemberian auxin dan unsur hara eksogenus maka produksi sukrosa akan meningkat dan terjadi perbaikan jaringan pengangkutan unsur hara anorganik.

## KESIMPULAN

Bibit tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan memiliki variasi anatomi, morfologi dan fisiologi. Walaupun variasi ini tidak seluruhnya berakibat pada rendahnya viabilitas bibit, penyempurnaan perlu dilakukan baik anatomi maupun fisiologi. Penyempurnaan morfogenesis, sama seperti pertumbuhan invitro, dapat dilakukan melalui pemberian zat pengatur tumbuh auxin, sedangkan penyempurnaan fisiologis dapat dilakukan melalui pengaturan pemberian kondisi lingkungan.

Dengan membaiknya struktur anatomi tanaman maka penyerapan unsur hara dan redistribusi hasil fotosintesis akan makin tinggi yang akhirnya akan mempertinggi aktivitas autotrofik pada tanaman. Hasil fotosintesis tersedia dalam jumlah yang lebih tinggi selanjutnya sangat penting untuk pertumbuhan tanaman sampai fase reproduksi. Akan tetapi karena kondisi lingkungan yang diperlukan untuk suatu

spesies adalah spesifik, maka perbaikan kondisi lingkungan hanya berlaku pada spesies tertentu saja.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adiputra IGK and Anderson JW, 1995. Effect of sulphur nutrition on redistribution of sulphur in vegetative barley. *Physiol. Plant.* 95: 643-650.
- Albert B, Bray D, Lewis L, Raff M, Robert K, Watson JD. 1983. *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. New York and London.
- Bensen RJ, Boyer JS and Mullet JE. 1988. Water deficit-induced changes in Abscisic acid Growth, Polysomes, and Translatable RNA in Soybean hypocotyls. *Plant Physiol* 88, 289-294.
- Cooper HD and Clarkson DT 1989. Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals—a possible mechanism integrating shoot and

- root in the regulation of nutrient uptake. *J. Exp. Bot.* 40:753-762.
- Daisy P. Sriyanti Hendaryono dan Ari Wijayani 1994. *Teknik kultur jaringan, pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif- modern*. Penerbit Kanisius.
- Dutra D, Johnson TR, Kauth PJ, Stewart SL, Kane ME and Richardson L. 2008. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Volume 94, Number 1, 11-21, DOI: 10.1007/s11240-008-9382-0
- Flower TJ dan Yeo AR. 1986. Ion Relations of Plants Under Drought and Salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13(1) 75. doi:10.1071/PP9860075
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RL. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Penerbit Universitas Indonesia.
- Gastal F and Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *J. Exp. Bot.* 53, No. 370: 789-799.
- Hammond JP and White PJ. 2008. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, No.1, pp. 93-109.
- Kanai S, Ohkura K, Adu-Gyamfi JJ, Mohapatra, PK, Nguyen NT, Saneoka H and Fujita K. 2007. Depression of sink activity precedes the inhibition of biomass production in tomato plants subjected to potassium deficiency stress. *Journal of Experimental Botany* 58(11):2917-2928
- Komal R 2011. One step method of plantlet regeneration in *Trichosanthes dioica* Roxb.: An approach towards cost effective and shorter protocol. *African Journal of Biotechnology* Vol 10 (1), pp. 9-12).
- Mineo L. 1990. *Plant Tissue culture techniques*. Department of Biology, Lafayette College, Easton, Pennsylvania 18042.
- Mulholland BJ, Craigon J, Black CR, Colls JJ, Atherton J, Landon G. 1997. Impact of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on gas exchange and chlorophyll content in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of experimental Botany*, vol. 48, No. 315, pp. 1853-1863.
- Pospisilova J, Ticha I, Kadlec P, Haisel D and Plzakova S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex-vitro condition. *Biologia Plantarum* 42(4): 481-497.
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Onckelen HA, Dudits D, and Fehér A 2002. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol*, Vol. 129, pp. 1807-1819.
- Rao, P. S. and Narayanaswami, S. 1972. Morphogenetic Investigations in callus cultures of *Tylophora indica*. *Physiologia Plantarum*, 27: 271-276. doi: 10.1111/j.1399-3054.1972.tb03613.x
- Rianawati S, Purwito A, Marwoto B, Kurniati R dan Suryanah. 2009. Embriogenesis Somatik dari Eksplan Daun Anggrek *Phalaenopsis* sp L. *J. Agron. Indonesia* 37 (3) : 240 – 248.
- Robert HS & Friml J 2009. *Nature Chemical Biology* 5, 325 – 332. doi:10.1038/nchembio.170
- Robinson JP, Britto SJ and Senthilkumar S. 2009. Comparative Anatomical Studies on *Emilia zeylanica* C. B. Clarke with in vitro Regenerated Plants. *Middle-East Journal of Scientific Research* 4 (3): 140-143
- Sade N, Gebresadiks M, Seligmann R, Schwartz A, Wallach R andn Moshelion M. 2010. The role of tobacco aquaporin I

- in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiology*, Vol. 152, pp. 245–254,
- Sawada S, Igarashi T and Miyachi S. 1982. Effect of nutritional level of phosphate on photosynthesis and growth studied with single, rooted leaf of dwarf bean. *Plant and Cell Physiology* 23: 27-33.
- Siwach P, Grower K and Gill AR 2011. The influence of plant growth regulator, explant nature and sucrose concentration on in vitro callus growth of *Thevetia peruviana*. *Asian Journal of Biotechnology* 3 (3): 280-292. DOI: 10.3923/ajbkr.2011.280292.
- Sok Siam Gouk, Jie He and Choy Sin Hew 1999. Changes in photosynthetic capability and carbohydrate production in an epiphytic CAM orchid plantlet exposed to super-elevated CO<sub>2</sub>. *Environmental and experimental Botany* 41: 219-230.
- Stancato GC, Mazzafera P, Buckeridge MS. 2001. Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:1009-1016. Doi: 10.1016/S0981-9428(01)01321-3.
- Suyitno AI. 2006. *Petunjuk Praktikum Fisiologi Tumbuhan Lanjut*. Program Studi Biologi-Juridik Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.
- Terry N and Ulrich A. 1973. *Effect of phosphorus deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet*.
- Tromas A, Perrot-Rechenmann C 2010. Recent progress in auxin biology. *C. R. Biologies* 333 297–306. Elsevier Masson SAS doi:10.1016/j.crvi.2010.01.005
- Utami ESW, Sumardi I, Taryono, Semiarti E 2007. Pengaruh  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) terhadap embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) bl. *Biodiversitas*, volume 8, nomor 4 : 295-299
- Vieten A, Sauer M, Brewer PB, Friml J. 2007. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* 12(4):160-8