

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Anggrek *Vanda tricolor* merupakan jenis tanaman endemik. Daerah penyebaran anggrek *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* di Indonesia adalah Jawa Timur, Jawa Barat, D.I. Yogyakarta, Bali dan Sulawesi (Gardiner, 2007). Anggrek *Vanda tricolor* ini banyak tumbuh secara epifit karena biji anggrek tidak memiliki cadangan makanan (Dutta *et al.*, 2011). Menurut Septiana dkk., (2016) Anggrek jenis *Vanda* termasuk dalam Anggrek komersial karena anggrek *Vanda* berpotensi sebagai komoditas non migas yang siap diekspor sebagai bunga potong karena kemampuannya memasuki pasaran yang luas baik di dalam maupun luar negeri.

Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* merupakan komoditas hortikultura unggulan dengan nilai jual yang cukup tinggi di pasar lokal karena bentuk dan warna yang beraneka ragam dan bunganya yang tahan lama (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2007). Namun, spesies *Vanda tricolor* di habitat asalnya dilaporkan mulai langka akibat adanya kerusakan hutan karena bencana alam maupun ulah manusia. Keberadaan anggrek *Vanda tricolor* ini terancam punah semenjak erupsi Merapi tahun 1994. Erupsi Merapi selanjutnya yaitu pada bulan Oktober 2010 telah menghancurkan hutan dan anggrek *Vanda tricolor* yang menghancurkan 80% habitat asli anggrek *Vanda tricolor* (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2007). Keberadaan anggrek *Vanda tricolor* yang semakin berkurang tersebut mendorong adanya upaya untuk

pelestarian angrek *Vanda tricolor* ke habitat aslinya terutama di lereng Gunung Merapi melalui konservasi.

Biji anggrek tidak memiliki endosperm sehingga biji tersebut tidak dapat tumbuh apabila disebarkan langsung ke tanah sebagaimana biji tanaman lain yang berendosperm. Biji anggrek memerlukan nutrisi untuk tumbuh. Oleh karena itu, metode kultur *in vitro* sangat sesuai untuk anggrek *Vanda tricolor* (George, 1993) karena metode kultur *in vitro* dikembangkan untuk membantu memperbanyak tanaman, khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangbiakkan melalui generatif.

Salah satu cara perbanyak tanaman secara *in vitro* yaitu dengan embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik menguntungkan karena jumlah propagulan yang dihasilkan lebih banyak dan diperoleh dalam waktu singkat (Ragapadmi, 2002), terutama untuk spesies yang mempunyai nilai ekonomi tinggi (Blanc *et al.*, 1999) dan populasi tanaman yang dihasilkan identik dengan induknya (Rani dan Raina, 2000).

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan embriogenesis somatik adalah auksin. Chen & Chang (2001) dan Tokuhara & Mii (1993), menyatakan bahwa auksin memacu pembentukan kalus embriogenik dan struktur embrio somatik sehingga mampu memacu pertumbuhan eksplan. Salah satu zat pengatur tumbuh yang termasuk auksin yaitu 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) (Litz *et al.*, 1998). Selain itu, ZPT yang berpengaruh terhadap embriogenesis adalah sitokinin (Chen & Chang, 2001).

Pengaruh TDZ sangat penting untuk proses morfogenesis ataupun embriosomatik pada kultur *in vitro* yang digunakan secara tunggal maupun

dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh lainnya karena potensinya sebagai bioregulant (Jiang *et al.*, 2005).

Penelitian perbanyakkan anggrek *Vanda tricolor* dengan kultur *in vitro* telah dilakukan oleh Rineksane dan Sukarjan (2015), dalam penelitian ini digunakan dua medium yaitu ½ MS dan NDM dengan penambahan zat pengatur tumbuh berupa TDZ (Thidiazuron), BAP serta NAA. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa medium NDM dengan penambahan 0,5 mg/l TDZ mampu menghasilkan kalus dan merupakan perlakuan terbaik dalam menginduksi kalus anggrek *Vanda tricolor* dari eksplan daun secara kultur *in vitro*

Hasil penelitian dari Niknejad (2009), menunjukkan penggunaan eksplan PLB Anggrek *Phalaenopsis* pada medium NDM cair dengan penambahan BAP dan TDZ sebesar 0,01 mg/l, 0,1 mg/l, 0,5 mg/l dan 1 mg/l yang dikombinasikan dengan NAA sebesar 0,01 mg/l, 0,1 mg/l, 0,5 mg/l dan 1 mg/l dalam 6-8 minggu dapat menginduksi kalus. Persentase tertinggi untuk pertumbuhan kalus yaitu pada perlakuan 1 mg/l NAA yang ditambahkan 0,1 mg/l TDZ sebesar 100%.

Penelitian ini akan menguji konsentrasi 2,4-D yang dikombinasikan dengan Thidiazuron untuk menginduksi embriosomatik tunas anggrek *Vanda tricolor*.

## **B. Perumusan Masalah**

Bagaimana pengaruh kombinasi 2,4-D dan TDZ terhadap induksi embriosomatik *Vanda tricolor* dalam medium cair?

### **C. Tujuan Penelitian**

Menentukan konsentrasi 2.4D dan TDZ terbaik terhadap induksi embriosomatik *Vanda tricolor* pada medium cair.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Anggrek *Vanda tricolor*

Anggrek merupakan salah satu tanaman hias yang mempunyai bentuk dan penampilan yang indah (Iswanto, 2002). Tanaman anggrek merupakan tanaman berbunga yang memiliki famili terbesar di dunia, yang mencakup kurang lebih 800 genera yaitu meliputi lebih dari 3000 species dan diantaranya terdapat di Indonesia (Widiastoety, 2012). Secara umum, klasifikasi anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* menurut Dressler dan Dodson (1960) sebagai berikut: Kingdom: Plantae, Divisi: Spermatophyta, Sub Divisi: Angiospermae, Kelas: Monocotyledoneae, Ordo: Orchidales, Familia: Orchidaceae, Genus: *Vanda*, Spesies: *Vanda tricolor* Lindl. var. *Suavis*.

Anggrek *Vanda tricolor* habitusnya kokoh dan bunganya menarik, selain itu tanaman ini juga mempunyai kisaran suhu yang sangat luas, dapat tumbuh di dataran rendah sampai dataran tinggi, dan mampu bersifat sangat toleran terhadap suhu tinggi sehingga mampu bertahan hidup pada kondisi terpapar sinar matahari dan awan panas yang secara fluktuatif sering keluar dari kubah Gunung Merapi (Widyastoety, 2012). Bunga Anggrek *Vanda tricolor* memiliki bau yang harum, aroma harum ini dipengaruhi oleh ketinggian tempat hidupnya, pada dataran tinggi aromanya sangat kuat dan makin turun ke dataran rendah aromanya semakin berkurang (Metusala, 2007).

Menurut pola pertumbuhannya *Vanda tricolor* termasuk monopodial artinya mempunyai batang utama dengan pertumbuhan ke atas tidak terbatas. Bentuk batangnya lurus, ramping, dan tidak berumbi yang memiliki tinggi mencapai 2

meter (Metusala, 2007). Daun tanaman anggrek *Vanda* berbentuk pita agak melengkung, dengan posisi daun yang berhadapan dan lebar kurang lebih 3 cm dengan panjang daun mencapai 45 cm maka dari itu, *Vanda tricolor* masuk dalam jenis anggrek *strap-leaf* karena memiliki daun yang lebar serta warna dan bentuk yang indah (Widiastoety, 2012).

Bunga *Vanda tricolor* tersusun dalam rangkaian tandan serta terdiri dari *sepal* (berjumlah tiga), *labelum* (mempunyai tiga taji) dan di bagian tengah terdapat alat reproduksi jantan dan betina. Tandan bunga muncul di setiap ketiak daunnya dengan panjang tandan bisa mencapai 50 cm, dan menyangga 10-20 kuntum bunga dengan diameter bunga mencapai 10 cm. Bunga anggrek *V. tricolor* mempunyai corak yang sangat umum di jumpai yaitu putih keunguan dengan bercak – bercak ungu kemerahan (Metusala, 2007).

Perbanyakan anggrek *Vanda tricolor* dapat dilakukan dengan cara generatif (biji) dan vegetatif. Perbanyakan generatif menggunakan biji dapat secara alami terjadi di sekitar akar atau tempat tumbuh ketika buah terbelah dan biji bertebaran. Dapat pula diperbanyak dengan mengambil biji dan menempatkannya pada medium tanam. Namun pertumbuhan biji anggrek *Vanda tricolor* menjadi bibit membutuhkan waktu yang relatif lama. Sementara itu penyebaran biji dengan teknologi yang cukup modern bisa dilakukan di laboratorium khusus (Pranata, 2005). Perbanyakan vegetatif dapat dilakukan dengan cara mengambil bagian tanaman lalu menanamnya secara terpisah dengan induknya. Beberapa cara perbanyakan vegetatif yang biasa dilakukan adalah dengan pemisahan rumpun,

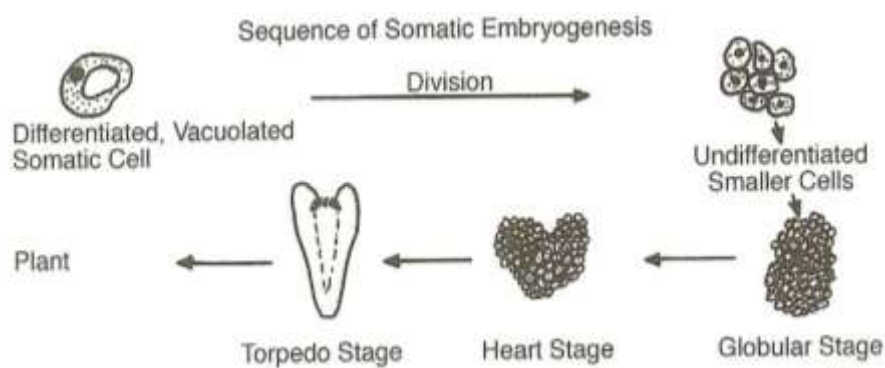
menggunakan anakan yang tumbuh liar di ujung umbi, menggunakan stek, dan kultur *in vitro*.

## B. Embriogenesis Somatik

Perbanyakan melalui kultur *in vitro* adalah metode perbanyakan bagi spesies langka untuk tujuan konservasi dan hal ini sangat berguna untuk tanaman anggrek. Kultur *in vitro* adalah salah satu metode dalam perbanyakan tanaman anggrek, dengan mengambil bagian-bagian tanaman anggrek (eksplan) serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik (Hernandez, 2005).

Regenerasi tanaman dengan menggunakan teknik *in vitro* dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Perbanyakan tanaman dengan menggunakan teknik Kultur *in vitro* melalui jalur embriogenesis somatik lebih menguntungkan dibandingkan melalui organogenesis karena dapat menghasilkan tanaman baru dengan jumlah yang lebih banyak. Selain itu, karena embrio berasal dari sel tunggal maka akan lebih mudah untuk memonitor proses pertumbuhan setiap individu tanaman (Jimenez, 2001).

Embriogenesis somatik adalah menumbuhkan embrio (calon tanaman) dari sel somatik atau sel tanpa dibuahi atau dapat juga didefinisikan sebagai proses



regen

erasi

ekspl

an

melal

ui



pembentukan struktur menyerupai embrio (embrioid)

#### Gambar 1. Tahap Pembentukan embrio somatik

dari sel somatik yang telah memiliki calon akar dan tunas. Hal tersebut mengakibatkan perbanyakan melalui embrio somatik lebih menguntungkan dari pada pembentukan tunas adventif. Pembentukan embrio somatik melalui beberapa tahap seperti yang tertera pada Gambar 1, yaitu tahap globular, tahap hati, tahap torpedo, tahap kotiledon, tahap kecambah dan tahap planlet (Purwaningsih, 2002).

Menurut Wiendi dkk. (1991), embrio somatik dapat terbentuk melalui dua jalur, yaitu secara langsung dan tidak langsung (melewati fase kalus). Embriogenesis somatik langsung adalah proses perkembangan embrio yang terjadi secara langsung pada potongan eksplan tanpa melalui fusi gamet dan terjadi pada eksplan yang masih muda (George dan Sherrington, 1984). Embriogenesis tidak langsung adalah proses perkembangan embrio melalui pembentukan kalus yang berasal dari akar, tangkai daun, tangkai bunga, daun, batang, atau embrio zigot yang mampu membentuk kalus embriogenik (Chawla, 2000). Menurut Ramos dkk. (1993), embriogenesis langsung memerlukan waktu lebih singkat untuk menghasilkan planlet dan kemungkinan terjadinya

penyimpangan akibat keragaman somaklonal lebih kecil dibandingkan embriogenesis tidak langsung.

Perbanyakkan tanaman dengan teknik kultur *in vitro* melalui embriogenesis somatik dapat berhasil apabila diperoleh persentase kalus embriogenik yang cukup tinggi dari eksplan yang dikulturkan ke dalam medium tertentu. Proses embriogenesis dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain adalah genotip tanaman, sumber eksplan, komposisi medium, zat pengatur tumbuh dan keadaan fisiologi sel.

Pemilihan medium tergantung pada jenis tanaman yang digunakan. Hal tersebut dikarenakan keadaan medium akan mempengaruhi pertumbuhan kultur, maka dari itu isi dan komposisi dari medium kultur dirancang secara khusus untuk tujuan yang berbeda. Salah satu medium yang umum digunakan dalam kultur *in vitro* yaitu medium padat dan cair. Medium padat pada umumnya berupa padatan gel, seperti agar dimana nutrisi dicampurkan pada agar sedangkan medium cair adalah nutrisi yang dilarutkan dalam air. Medium cair dapat bersifat tenang atau dalam kondisi yang selalu bergerak, tergantung kebutuhan. Komposisi medium yang digunakan dalam kultur jaringan dapat berbeda komposisinya. Perbedaan komposisi medium dapat mengakibatkan perbedaan pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditumbuhkan secara kultur *in vitro*

Pada zat pengatur tumbuh yang perlu diperhatikan adalah ketepatan memilih jenis dan konsentrasi yang sesuai dengan jenis tanaman dan kondisi fisiologis dari eksplan atau jaringan yang ditumbuhkan. Hal ini dikarenakan setiap jenis dan

jaringan tanaman mempunyai respon tersendiri terhadap pemberian zat pengatur tumbuh.

Dua golongan zat pengatur tumbuh yang sangat penting adalah auksin dan sitokinin. Secara umum diketahui bahwa auksin dalam konsentrasi tinggi mendorong embrio somatik secara efektif. Pada umumnya pemberian auksin ke dalam medium padat tanpa sitokinin dapat menginduksi kalus embriogenik, tetapi dengan penambahan hormon sitokinin dapat meningkatkan poliferasi kalus embriogenik.

### **C. 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid**

2,4-D merupakan auksin kuat yang mampu merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat dibandingkan terjadinya *browning* pada eksplan sehingga eksplan dapat merespon zat pengatur tumbuh dan unsur hara yang terkandung dalam medium. 2,4-D merupakan jenis auksin sintesis yang sering digunakan dalam kultur jaringan (Abidin, 1982).

Menurut Bhojwani dan Razdan (1989), untuk induksi kalus embriogenik kultur umumnya ditumbuhkan pada medium yang mengandung auksin kuat dengan konsentrasi yang tinggi. Pada tahap inisiasi embrio somatik, sel embriogenik akan dihasilkan jika dikulturkan pada medium yang mengandung auksin (Wattimena, 1992). Peran auksin dalam embriogenesis somatik antara lain untuk inisiasi embriogenesis somatik, induksi kalus embriogenik, poliferasi kalus embriogenik, dan induksi embrio somatik.

Menurut Salisbury dan Ross (1995), auksin menyebabkan sel penerima pada potongan eksplan akan mengeluarkan  $H^+$  ke dinding sel primer yang

mengelilinginya dan menurunkan pH sehingga terjadi pengenduran dinding dan pertumbuhan yang cepat. pH rendah diduga bekerja dengan cara mengaktifkan beberapa enzim perusak dinding sel, yang tidak aktif pada pH tinggi. Enzim tersebut diduga memutuskan ikatan pada polisakarida dinding, sehingga memungkinkan dinding lebih mudah meregang. Menurut Schiavone dan Cooke (1987), auksin mempunyai peranan yang besar dalam proses diferensiasi sel menjadi embrio somatik.

2,4-D merupakan auksin terbaik untuk menginduksi pembentukan embrio somatik dari eksplan dibandingkan dengan tipe auksin yang lain (Ranch dkk., 1986). Hal ini dikarenakan sifat 2,4-D yang mudah diserap oleh tanaman, tidak mudah terurai dan menjadi tidak aktif, berfungsi sebagai auksin yang kuat dan mampu mendorong aktivitas morfogenetika (perkembangan bentuk). Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-D merupakan auksin yang efektif untuk menginduksi kalus embriogenik.

Hasil Winarto dkk (2013), menunjukkan bahwa 2,5 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l IAA dan 3 % sukrosa pada medium 1/2 MS mampu menginduksi pembentukan kalus lebih cepat dengan persentase regenerasi mencapai 32% dan jumlah embrio hingga 20 embrio per eksplan terhadap persilangan Anggrek *Vanda tricolor*.

#### **D. TDZ (Thidiazuron)**

Thidiazuron atau TDZ merupakan salah satu contoh ZPT golongan sitokinin. TDZ merupakan senyawa yang dapat diserap secara langsung dari medium oleh eksplan atau tanaman *in vitro*. Oleh karena pengaruhnya yang sangat kuat,

hormon ini digunakan dalam konsentrasi yang rendah dibanding jenis sitokinin yang lain. Fungsi sitokinin dalam kultur *in vitro* adalah mendorong pembelahan sel-sel.

Menurut Rineksane dan Sukarjan (2015), Thidiazuron merupakan senyawa kimia yang mempunyai sifat termolabil, yaitu senyawa yang bekerja pada suhu tertentu dan akan mengalami penurunan kualitas bahkan rusak pada suhu tinggi.

Thidiazuron mempunyai karakteristik yang tidak dimiliki oleh zat pengatur tumbuh lain, yaitu efektif bila digunakan pada konsentrasi rendah  $\leq 1\mu\text{M}$  (Huetterman dan Preece 1993; Mithila *et al.*, 2003). Konsentrasi TDZ yang lebih rendah dibandingkan dengan sitokinin dapat lebih aktif menstimulasi proliferasi tunas aksilar tanaman berkayu (Huetteman dan Preece 1993. Youmbi *et al.*, (2006) dan Guo *et al.*, (2011) menyatakan bahwa TDZ merupakan molekul baru yang memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan sitokinin. Mok *et al.* (1987) juga mengatakan bahwa TDZ bersifat stabil dan lebih aktif apabila diberikan dalam konsentrasi rendah dibandingkan sitokinin. TDZ konsentrasi tinggi, yaitu 1-50 $\mu\text{M}$ , dapat menstimulasi pembentukan kalus pada beberapa tanaman (Lee 2005).

Penelitian kultur *in vitro* anggrek *Vanda ticolor* yang dilakukan oleh Rineksane dan Sukarjan (2015) terkait penggunaan TDZ menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan pertumbuhan kalus kecuali pada eksplan yang ditanam dalam medium NDM + 0 mg/l TDZ (kontrol) dan NDM + 0,5 mg/l TDZ. Kalus tumbuh pada medium NDM kontrol tanpa TDZ 2 minggu setelah

tanam (MST), sedangkan pada perlakuan NDM + 0,5 mg/l TDZ kalus tumbuh setelah 6 MST.

#### **E. Hipotesis**

Diduga pemberian 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ mampu merangsang pertumbuhan kalus terbaik Anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro*.

### **III. TATA CARA PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *in vitro* Fakultas Pertanian UMY, dimulai pada bulan Desember 2018 sampai Februari 2019.

#### **B. Bahan dan Alat Penelitian**

Bahan yang digunakan adalah tunas Anggrek *Vanda tricolor* yang berumur 1 tahun, medium dasar *New Dogashima Medium* (NDM), cloorox 5%, 2,4-D, TDZ, arang aktif, PPM, sukrosa, KOH 1M, HCl 1M, iodine, dan aquadest (Lampiran VI).

Alat yang digunakan pinset, gelas ukur, erlenmeyer, petridish, pipet, pengaduk, karet, aluminium foil, kertas payung, plastik, syringe/jarum, botol sprayer, lampu spiritus, shaker, autoklaf, petridish, pH meter, timbangan analitik, dan Mikroskop Stereo SZM45 B2 + Opticlab advance (Lampiran V1).

#### **C. Metode Penelitian**

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksperimen yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan 6 perlakuan yaitu kombinasi konsentrasi 2,4-D (0 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l) dan TDZ (0 mg/l, 0,5 mg/l) pada medium cair. Setiap perlakuan diulang 3 kali. Masing-masing perlakuan ditambahkan arang aktif 0,2 g/l serta PPM 0,1 ml/l:

- A. 0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ (kontrol)
- B. 0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ
- C. 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ
- D. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ

E. 4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ



F. 4 mg/l 2,4-D + 0,5mg/l TDZ

Setiap ulangan terdiri dari 3 sampel. Setiap sampel botol terdiri dari satu eksplan.

Jadi, tunas anggrek yang dibutuhkan sebanyak 54 unit (*Lay out* pada Lampiran I).

## **D. Cara Penelitian**

### **1. Sterilisasi Alat**

Sterilisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu sterilisasi basah/uap air yang bertekanan dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah dengan tekanan dilakukan dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus dengan kertas payung di autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C bertekanan 1 atm. Alat-alat yang di-sterilkan antara lain: botol-botol kultur, pinset, pengaduk, aluminium foil, petridish, dan erlenmeyer. Sterilisasi bakar digunakan lampu spiritus yang dilakukan di LAF. Cara yang digunakan yaitu dengan mencelupkan dahulu alat yang digunakan dalam alkohol 70% kemudian membakar pada lampu spiritus. Alat yang dibakar yaitu pinset yang berfungsi pada saat penanaman eksplan. Penyeterilan LAF dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% ke seluruh permukaan kemudian dilap hingga kering dan dinyalakan lampu UV selama 15 menit sebelum LAF digunakan.

### **2. Pembuatan Medium NDM**

Medium NDM dibuat sebanyak 1200 ml yang dibagi menjadi 6 perlakuan. Setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing – masing perlakuan digunakan 10 erlenmeyer. Setiap erlenmeyer diisi sebanyak 20 ml medium NDM. Bahan – bahan yang dibutuhkan untuk 200 ml medium yaitu: medium NDM bubuk = 0,392 g; TDZ sesuai perlakuan, yaitu 0 (Tanpa TDZ); 0,5 mg/l (1 ml/200 ml

larutan); 2,4-D sesuai perlakuan yaitu 0 (tanpa 2,4-D), 2 mg/l (4 ml/200ml larutan), dan 4 mg/l (8ml/200ml larutan); sukrosa = 6g; PPM = 0,1 ml; arang aktif 0,04 g; serta aquades (Lampiran VIb).

### 3. Persiapan TDZ

Thidiazuron merupakan senyawa kimia yang mempunyai sifat termolabil, yaitu senyawa yang mampu bekerja pada suhu tertentu dan akan mengalami penurunan kualitas dan rusak pada suhu tinggi, sehingga penggunaan Thidiazuron sebaiknya dilakukan menggunakan *millipore* agar cendawan penyebab kontaminasi tersaring dan aplikasinya dilakukan di LAF.

Penggunaan konsentrasi TDZ sesuai dengan perlakuan, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Setelah diencerkan kemudian dihitung rumus kebutuhan untuk setiap ulangan sebagai berikut:

$$\text{Kebutuhan TDZ} = \frac{\text{Total larutan setiap ulangan (ml)}}{1000 \text{ ml aquadest}} \times \text{TDZ (ml)}$$

### 4. Persiapan 2,4-D

2,4-D merupakan auksin kuat yang mampu merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat dibandingkan terjadinya *browning* pada eksplan sehingga eksplan dapat merespon zat pengatur tumbuh dan unsur hara yang terkandung dalam medium. 2,4-D merupakan jenis auksin sintetis yang sering digunakan dalam kultur jaringan (Abidin, 1982).

Penggunaan konsentrasi 2,4-D sesuai dengan perlakuan, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Setelah diencerkan kemudian menghitung rumus kebutuhan untuk setiap ulangan sebagai berikut:

$$\text{Kebutuhan 2,4 D} = \frac{\text{Total larutan setiap ulangan (ml)}}{1000 \text{ ml aquadest}} \times 2,4 \text{ D (ml)}$$

## 5. Perlakuan

Perlakuan untuk menentukan total bahan yang dibutuhkan dengan menghitung kebutuhan per ulangan. Satu erlenmeyer diisi dengan larutan sebanyak 200 ml yang telah berisi medium, sukrosa, arang aktif, ppm, TDZ, 2,4-D dan aquades. Larutan yang telah tercampur kemudian dimasukkan ke dalam botol, masing-masing botol berisi 20 ml larutan. Berikut merupakan perlakuan yang diujikan:

- a. D1T1 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + tanpa 2,4-D + tanpa TDZ + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml. Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.
- b. D1T2 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + tanpa 2,4-D + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 1 ml TDZ (dilakukan dalam LAF). Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.
- c. D2T1 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + 4 ml 2,4-D + tanpa TDZ + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml. Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.

- d. D2T2 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + 4 ml 2,4-D + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 1 ml TDZ (dilakukan dalam LAF). Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.
- e. D3T1 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + 8 ml 2,4-D + tanpa TDZ + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml. Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.
- f. D3T2 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + 8 ml 2,4-D + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 1 ml TDZ (di lakukan dalam LAF). Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.

## 6. Penanaman Eksplan

Eksplan yang digunakan berupa tunas Anggrek *Vanda tricolor* berumur 1 tahun. Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* dengan kondisi aseptik atau steril. Sebelum penanaman, eksplan tunas tersebut disubkulturkan ke dalam medium NDM 0 untuk menghomogenkan eksplan yang sebelumnya di inkubasi pada medium dengan penambahan ZPT. Setelah inkubasi dalam medium NDM selama 1 minggu, eksplan NDM siap ditanam.

Penanaman dilakukan dengan cara mengambil tunas dari botol semai yang tersedia, kemudian, eksplan ditanam ke dalam botol medium sesuai perlakuan dengan menggunakan pinset. Setiap botol berisi satu eksplan. Setelah selesai ditanam, botol kultur ditutup dengan aluminium foil, dikencangkan dengan karet gelang, dilapisi dengan menggunakan wrap, kemudian diberi label perlakuan dan tanggal penanaman. Selanjutnya erlenmeyer diletakkan pada shaker di ruang pemeliharaan/inkubasi (Lampiran VIc).

## **7. Inkubasi**

Pada proses inkubasi, erlenmeyer diletakkan pada shaker. Ruang inkubasi dilengkapi lampu neon (TL) 40 watt yang dinyalakan selama 24 jam. Suhu ruang inkubasi dilengkapi dengan AC dengan suhu rata-rata 20-28°C.

## **8. Pengamatan**

Pengamatan dilakukan dari awal penanaman sampai minggu ke-8 setelah tanam. Parameter pengamatan yang diamati meliputi: Persentase eksplan hidup (%), persentase eksplan terkontaminasi (%), persentase eksplan *browning* (%), persentase eksplan ter vitrifikasi (%), waktu terbentuknya kalus, persentase eksplan berkalus (%), tekstur kalus, persentase tunas (%), warna daun, jumlah daun, perkembangan pro embrio, waktu muncul pro embrio, perkembangan kalus dan fase embrio.

## E. Parameter yang Diamati

### 1. Keberhasilan Teknik Kultur *In vitro*

#### a. Persentase Eksplan Hidup (%)

Eksplan yang hidup (eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan (*browning*) lebih dari separuh eksplan) diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Persentase eksplan hidup dihitung di akhir pengamatan dengan rumus:

Rumus :

$$\text{Persentase eksplan hidup (\%)} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

#### b. Persentase Eksplan Terkontaminasi (%)

Eksplan yang terkontaminasi diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Eksplan dikatakan terkontaminasi apabila ada jamur atau bakteri pada eksplan atau medium kultur tersebut. Persentase eksplan terkontaminasi.

Rumus :

$$\text{Persentase eksplan terkontam (\%)} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

#### c. Persentase Eksplan *Browning* (%)

Eksplan yang mengalami pencoklatan/*browning* diamati seminggu sekali selama 8 minggu, kriteria eksplan *browning* apabila pencoklatan pada eksplan lebih dari separuh eksplan. Persentase eksplan *browning* dapat dihitung dengan

Rumus :

$$\text{Persentase eksplan } \textit{browning} (\%) = \frac{\text{Jumlah eksplan } \textit{browning}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

#### **d. Persentase Eksplan Vitrifikasi (%)**

Eksplan yang mengalami Vitrifikasi diamati seminggu sekali selama 8 minggu, kriteria eksplan yang tervitrifikasi ditandai dengan berubahnya warna eksplan menjadi putih, apabila warna putih pada eksplan lebih dari separuh eksplan. Persentase eksplan Vitrifikasi dapat dihitung dengan

Rumus :

$$\text{Persentase eksplan Vitrifikasi (\%)} = \frac{\text{Jumlah eksplan Vitrifikasi}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

## **2. Pertumbuhan Kalus**

### **a. Tekstur Kalus**

Tekstur kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan kalus. Terdapat 3 tekstur kalus yaitu spongy, kompak, dan remah. Tekstur kalus embriogenik adalah tekstur yang remah (*friable*), karena tekstur yang remah lebih mudah untuk dipisah-pisahkan antara sel satu dengan lainnya. Pengamatan tekstur kalus dimulai dari minggu ke -1 sampai minggu ke -8.

### **b. Waktu Terbentuknya Kalus (hari)**

Pertumbuhan kalus diamati setiap dua hari sekali selama 8 minggu, kriteria kalus yang terbentuk yaitu kalus yang nampak putih di ujung dan tepi eksplan. Penentuannya dengan cara menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul kalus pertama. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

### c. Persentase Eksplan Berkalus (%)

Data jumlah eksplan berkalus digunakan untuk menghitung persentase eksplan yang membentuk kalus. Persentase eksplan yang membentuk kalus dapat dihitung dengan:

$$\text{Persentase eksplan berkalus (\%)} = \frac{\sum \text{eksplan membentuk kalus}}{\sum \text{seluruh eksplan}} \times 100 \%$$

## 3. Pertumbuhan Tunas

### a. Persentase Eksplan Bertunas (%)

Eksplan bertunas diamati setiap minggu selama 8 minggu, kriteria tunas yang terbentuk ditandai dengan munculnya tunas di nodus batang. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

### b. Jumlah Daun









Pengamatan jumlah daun dilakukan setiap minggu selama 8 minggu. Kriteria daun yang diamati yaitu daun yang telah berkembang sempurna.

### c. Warna Daun

Pengamatan warna daun dilakukan setiap minggu selama 8 minggu. Cara pengamatannya yaitu dengan menggunakan alat yang disebut *Munshell Color Chart*. Kriteria daun yang diamati yaitu daun yang telah berkembang setelah itu dilakukan skoring yang terdapat pada Tabel 1.



Tabel 1. Skoring Warna Daun

Warna	Tingkatan	Gambar
5 Y 8/2-5Y 8/4	1	
5 Y 8/6-5Y 8/8	2	
5Y 8/10-5Y 8/12	3	
2,5 GY 8/2- 2,5 GY 8/4	4	
2,5 GY 8/6- 2,5 GY 8/8	5	
2,5 GY 8/10- 2,5 GY 8/12	6	
5 GY 7/4-5 GY 7/6	7	
5 GY 7/8-5 GY 7/10	8	

$$\text{Warna daun} = \frac{N \times V}{Z \times n} \times 100 \%$$

Ket:

N = Jumlah sampel yang memiliki warna sama

V = Nilai skor yang menunjukkan tingkat warna

Z = Nilai skor tertinggi

n = Jumlah sampel

(Zainal, 2011)

#### 4. Perkembangan Pro-embrio

##### a. Waktu Muncul Pro-embrio

Waktu munculnya pro-embrio diamati setiap minggu selama 8 minggu, Penentuannya dengan cara menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul bulatan pertama. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

**b. Perkembangan Kalus dan Fase Embrio**

Perkembangan fase embrio diamati setiap 1 bulan dengan cara mengamati eksplan di bawah Mikroskop Stereo SZM45 B2 + Opticlab advance dengan perbesaran 0,7x-0,8x jika terbentuk fase globular heart, torpedo dan kotiledon. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

**F. Analisis Data**

Hasil pengamatan kuantitatif dianalisis menggunakan sidik ragam atau *Analysis of Variance* (Annova) taraf 5%. Apabila ada pengaruh beda nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. Hasil penelitian disajikan dalam bentuk grafik dan histogram.

## IV. PEMBAHASAN

### A. Keberhasilan Teknik Kultur *In Vitro*

Kemampuan eksplan untuk tumbuh pada suatu medium perlakuan dalam kultur *in vitro* dinyatakan dalam persentase eksplan hidup. Vitrifikasi, kontaminasi dan *browning* sangat mempengaruhi persentase hidup suatu eksplan. Eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* yang dikultur secara *in vitro* menunjukkan respon pertumbuhan setelah 1 minggu tahap perlakuan. Eksplan terus mengalami pertumbuhan sampai minggu ke-8, ditandai dengan munculnya tunas, kalus, proembrio dan penambahan daun. Eksplan anggrek yang hidup dicirikan dengan warna hijau muda, tidak mengalami vitrifikasi, bebas kontaminasi serta pencoklatan. Keberhasilan kultur ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Persentase Hidup, Kontaminasi, dan Vitrifikasi Eksplan Tunas *Vanda tricolor* Medium Cair pada 8 MST

Perlakuan	Eksplan Hidup (%)	Eksplan Kontaminasi (%)	Eksplan Vitrifikasi (%)
Tanpa 2,4-D + Tanpa TDZ	100	0	0
Tanpa 2,4-D +0,5 mg/l TDZ	88,89	0	11,11
2 mg/l 2,4-D + Tanpa TDZ	57,78	0	42,22
2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ	44,44	0	55,56
4 mg/l 2,4-D + Tanpa TDZ	77,78	0	22,22
4 mg/l 2,4-D + 0,5mg/l TDZ	22,22	11,11	66,66

#### 1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup tunas anggrek cukup tinggi yaitu mencapai 100%. Pada Tabel 2 data persentase eksplan hidup menunjukkan bahwa pada medium dengan penambahan 2,4-D yang sama yang ditambahkan 0,5

mg/l TDZ selalu menyebabkan persentase hidup yang lebih rendah dibandingkan

tanpa TDZ. Hal tersebut dikarenakan penambahan 0,5 mg/l TDZ menghambat pertumbuhan eksplan karena pada eksplan tunas anggrek yang ditambahkan 0,5 mg/l TDZ lebih banyak mengalami vitrifikasi sehingga hal tersebut menghambat pertumbuhan dan menyebabkan kematian pada eksplan tunas anggrek. Menurut Fitriani (2008), vitrifikasi terjadi karena terlalu tingginya sitokinin yang diberikan, tingginya konsentrasi ion amonium, dan terlalu rendahnya agar.

Perlakuan terbaik ditunjukkan pada perlakuan Tanpa 2,4-D + Tanpa TDZ dengan persentase hidup sebesar 100%. Hal tersebut diduga pada medium NDM yang digunakan tanpa 2,4-D dan TDZ mampu menyokong pertumbuhan eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor*. Medium NDM mengandung unsur-unsur hara makro, mikro, vitamin dan asam amino yang diperlukan untuk pertumbuhan. NDM memiliki vitamin dan bahan organik yang kompleks seperti asam amino dan bahan organik lainnya yang mampu membantu pertumbuhan eksplan tunas anggrek. Selain itu, keberhasilan eksplan untuk dapat hidup dalam kegiatan kultur jaringan juga dipengaruhi oleh jenis, umur dan ukuran eksplan yang digunakan (Fadhilah, 2018).

## **2. Persentase Eksplan Kontaminasi**

Kontaminasi adalah tumbuhnya mikroba yang tidak dikehendaki (kontaminan) pada medium maupun eksplan selama inkubasi, kultur dapat terinfeksi satu atau lebih mikrobia seperti bakteri, fungi berfilamen, yeast, virus dan fitoplasma (Nisa dan Rodinah 2005). Data pada Tabel 2 menunjukkan persentase eksplan yang mengalami kontaminasi hanya

sedikit hal tersebut dikarenakan eksplan sudah steril. Selain itu penggunaan *Plant Preservative Mixture* (PPM) pada medium di penelitian ini juga membantu menghambat pertumbuhan patogen. Selain PPM, iodine juga digunakan sebagai bahan sterilisasi saat penanaman eksplan untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Sandra dan Karyaningsih (2000) dalam Kartika dkk., (2013) menjelaskan sterilisasi merupakan proses untuk mematikan atau menonaktifkan spora atau mikroorganisme sampai ke tingkat yang tidak memungkinkan lagi berkembang biak menjadi sumber kontaminan selama proses perkembangan berlangsung. Pemberian iodine sebanyak tiga tetes yang diarturkan dalam aquadest steril dapat membantu menghambat terjadinya kontaminasi akibat jamur yang menghambat pertumbuhan eksplan anggrek.

Eksplan yang terkontaminasi hanya pada perlakuan 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ sebesar 11,11%. Kontaminasi pada penelitian ini mulai terjadi pada 4 MST. Kontaminasi ditandai dengan munculnya hifa putih yang menyelimuti eksplan kemudian pada medium terdapat warna coklat jenis kontaminasi tersebut diduga karena adanya bakteri. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Nisa dan Rodinah (2005), bahwa jenis kontaminasi bakteri ditandai dengan terbentuknya hifa berwarna putih sampai kecoklatan terlihat jelas pada medium dan eksplan diselimuti oleh spora berbentuk kapas berwarna putih. Kontaminasi tersebut diduga pada saat penanaman eksplan yang kurang steril sehingga mikroorganisme yang terbawa oleh eksplan tersebut akan tumbuh dengan cepat dan dalam waktu singkat akan menutupi

permukaan medium pada eksplan yang ditanam. Selain itu, menurut Aryani (2015) kontaminan akan tumbuh dengan cepat pada medium yang mengandung gula, vitamin dan mineral bila faktor kontaminasi tidak dihilangkan.

### 3. Persentase Eksplan *Browning*

*Browning* dapat terjadi sebagai akibat dari tingginya kandungan senyawa fenolik yang terbentuk serta menutupi permukaan kalus (Hutami, 2008). Pada penelitian ini tidak terjadi *browning* pada eksplan anggrek. Hal tersebut disebabkan karena tidak adanya pelukaan pada eksplan anggrek. Hutami (2008), mengemukakan bahwa pencoklatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase yang dilepaskan atau disintesis dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai. Selain itu, penambahan arang aktif pada medium NDM cair dapat menghambat *browning* pada eksplan, karena arang aktif dapat membantu menyerap senyawa racun yang berada dalam medium setelah diautoklaf atau selama pertumbuhan dalam medium. Fridborg *et al.*, (1978) membuktikan bahwa arang aktif dapat menyerap senyawa fenol yang pada umumnya diproduksi oleh jaringan tanaman. Arang aktif yang diinkubasi di dalam medium dapat menyerap *5-hidroksymethyl-fulfural* (HMF). Senyawa tersebut diperkirakan berasal dari sukrosa di dalam medium yang diautoklaf di dalam kondisi asam. Selanjutnya HMF juga memperlihatkan daya penghambatan didalam embriogenesis kultur anther tembakau, kecuali dengan pemberian arang aktif (Hutami, 2006).

Disamping itu kemungkinan adanya pengaruh dari eksplan yang masih muda. Menurut George dan Sherrington (1984) pencoklatan pada jaringan muda lebih sedikit dibandingkan dengan jaringan yang tua. Eksplan jaringan yang lebih tua mengandung senyawa fenolik yang lebih banyak sehingga dapat meningkatkan terjadinya *browning* pada eksplan.

#### 4. Persentase Eksplan Vitrifikasi

Eksplan dapat dikategorikan vitrifikasi apabila mengalami kehilangan klorofil sehingga daun dan batang tampak berubah warna menjadi putih dan



transparan. Eksplan terkena vitrifikasi ditunjukkan oleh Gambar 2.

Gambar 2. Eksplan Tunas Anggrek *Vanda tricolor* Mengalami Vitrifikasi 8 MST

Vitrifikasi yang terjadi dalam penelitian ini sangat tinggi yaitu 11,11-66,66%, data eksplan yang terkena vitrifikasi ditunjukkan pada Tabel 2. Tingginya tingkat vitrifikasi ini mengakibatkan kematian pada eksplan yang tinggi. Karyanti dkk. (2018) menyatakan bahwa penyebab dasar terjadinya vitrifikasi terletak pada potensial air di dalam jaringan tanaman, konsentrasi agar ataupun sitokinin yang digunakan. Pada penelitian ini, terjadinya vitrifikasi melalui dua cara yaitu vitrifikasi secara langsung dan tidak



langsung. Eksplan mengalami vitrifikasi secara langsung dimana eksplan yang berwarna hijau akan berubah menjadi putih transparan. Vitrifikasi yang terjadi secara langsung juga disebabkan oleh kandungan air yang cukup tinggi. Sementara vitrifikasi secara tidak langsung terjadi pada eksplan yang mengalami *browning* terlebih dahulu. Eksplan yang *browning* akan mengalami vitrifikasi.

Pada penelitian ini vitrifikasi tidak langsung terjadi pada 2-4 minggu setelah eksplan mengalami *browning*. Tingginya kandungan fenolik yang menyebabkan terjadinya *browning* pada eksplan mengakibatkan menurunnya kemampuan eksplan dalam melakukan pertumbuhan dan potensial air yang terkandung dalam medium menyebabkan terjadinya vitrifikasi yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi kebeningan. Persentase eksplan yang mengalami vitrifikasi dapat dilihat pada data yang disajikan pada Tabel 2. Persentase eksplan yang mengalami vitrifikasi menunjukkan bahwa penambahan 2,4-D yang sama dengan ditambahkan 0,5 mg/l TDZ selalu menyebabkan persentase eksplan mengalami vitrifikasi lebih rendah. Hal tersebut sesuai pernyataan Karyanti dkk., (2013) bahwa penyebab dasar terjadinya vitrifikasi terletak pada potensial air dalam jaringan tanaman. Pada penelitian ini, medium yang digunakan adalah NDM cair. Kandungan air pada medium cair mengakibatkan air akan bergerak masuk ke dalam eksplan dengan intensitas yang tinggi sehingga mengakibatkan hilangnya kandungan sel-sel tanaman yang mengakibatkan eksplan tidak dapat berkembang dan mengalami

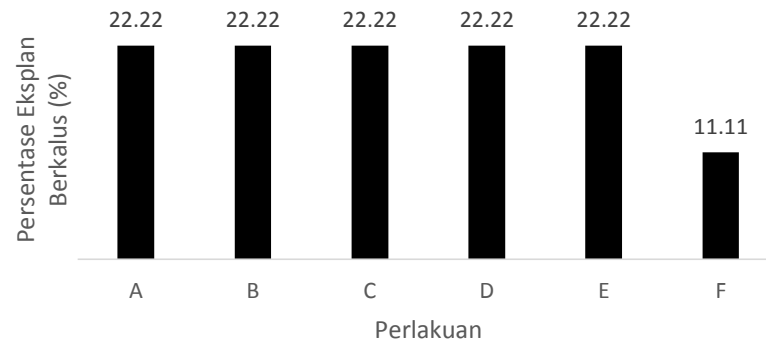
kematian. Potensial air yang terkandung dalam medium dan melemahnya jaringan eksplan menyebabkan terjadinya peristiwa difusi dalam intensitas yang tinggi. Konsentrasi air di bagian luar sel yang lebih tinggi dan terlalu tinggi dibandingkan dengan konsentrasi air pada bagian dalam sel menyebabkan air cenderung bergerak ke dalam sel melalui membran sel dalam intensitas yang sangat tinggi dan mengakibatkan hilangnya kandungan sel pada eksplan. Melemahnya jaringan eksplan yang disebabkan oleh potensial air dalam medium mengakibatkan terjadinya vitrifikasi dan mengakibatkan hilangnya klorofil dan kandungan sel tanaman dalam eksplan sehingga kemampuan eksplan dalam melakukan penyerapan unsur hara menjadi berhenti yang mengakibatkan eksplan tidak mampu tumbuh dan mengakibatkan eksplan menjadi mati (Sukarjan, 2014). Selain itu, pemberian TDZ 0,5 mg/l sebagai sitokinin diduga terlalu berlebih. Hal tersebut sejalan dengan pendapat Fitriani (2008) bahwa vitrifikasi dapat disebabkan oleh tingginya konsentrasi sitokinin.

## **B. Pertumbuhan Kalus**

Kalus adalah suatu kumpulan sel yang belum terdiferensiasi yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus secara *in vitro*. Kalus secara *in vitro* terbentuk melalui 3 tahapan yaitu induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi. Eksplan menunjukkan respon embriogenesis secara tidak langsung apabila eksplan tumbuh melalui kalus, kemudian akan berdiferensiasi menjadi pro embrio dan embrio.

### **1. Persentase Eksplan Berkalus**

Hasil pengamatan terhadap persentase eksplan membentuk kalus ditunjukkan oleh Gambar 3.



Keterangan: A= Tanpa 2,4-D + Tanpa TDZ,  
 B= Tanpa 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ,  
 C= 2 mg/l 2,4-D + Tanpa TDZ,  
 D= 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ,  
 E= 4 mg/l 2,4-D + Tanpa TDZ,  
 F= 4 mg/l 2,4-D + 0,5mg/l TDZ

Gambar 3. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Persentase Eksplan Berkalus tunas *Vanda tricolor* pada Medium Cair 8 MST

Gambar 3 menunjukkan bahwa kalus terinduksi pada semua perlakuan walaupun persentasenya hanya sedikit. Hal tersebut disebabkan perkembangan pada kalus dari tanaman anggrek *Vanda tricolor* yang sangat lambat sehingga tidak terjadi perkembangan yang signifikan. Menurut Rineksane dan Sukarjan (2015), waktu yang dibutuhkan dalam perbanyakan dengan kultur *in vitro* pada *Vanda tricolor* cukup lambat, baik dalam pertumbuhannya maupun pembentukan kalus dan tunas.

Penambahan 2,4-D dalam medium kultur merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus (Bekti dkk., 2003). Pada perlakuan 0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ, 0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ, 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ, 2