

INDUKSI EMBRIOSOMATIK ANGGREK *Vanda tricolor* DENGAN PERLAKUAN 2,4-D DAN TDZ PADA MEDIUM NDM CAIR

Ramadhani Kusuma¹, Innaka Ageng Rineksane², Gatot Supangkat²

¹Mahasiswa Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, ²Dosen Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

E-mail: ramadhanikusuma98@gmail.com

INTISARI

Anggrek *Vanda tricolor* merupakan tumbuhan endemik yang hidup di lereng Gunung Merapi. Pemberian konsentrasi ZPT yang tepat pada perbanyakan kultur *in vitro* dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan tunas anggrek. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pemberian kombinasi 2,4-D dan TDZ yang terbaik pada pertumbuhan anggrek *Vanda tricolor*. Penelitian ini, telah dilakukan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Desember 2018. Penelitian ini disusun dalam dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal yang terdiri dari 6 perlakuan yaitu 0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ (kontrol); 0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ; 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ; 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ; 4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ; 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ. Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan, setiap ulangan terdiri dari 3 sampel sehingga jumlah keseluruhan sebanyak 54 unit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan tanpa 2,4-D dan tanpa TDZ memberikan pengaruh terbaik pada hasil analisis waktu muncul kalus (2,00a), persentase eksplan berkalus (22,22%), dan saat muncul pro-embrio pada minggu ke-2.

Kata kunci: Anggrek *Vanda tricolor*, Embriosomatik, TDZ, 2,4-D

Embryosomatic Induction of Vanda tricolor Orchid with 2,4-D and TDZ Treatment in Liquid NDM Medium

Ramadhani Kusuma¹, Innaka Ageng Rineksane², Gatot Supangkat²

¹Mahasiswa Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, ²Dosen Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

E-mail: ramadhanikusuma98@gmail.com

ABSTRACT

Vanda tricolor orchids are endemic plants that live on the slopes of Mount Merapi. The use of plant growth regulator for in vitro multiplication can affect the growth of orchid bud explants. This study aimed to determine the best combination of 2,4-D and TDZ in the growth of Vanda tricolor orchids. This research has been carried out in the In Vitro Laboratory of the Faculty of Agriculture, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta in December 2018. This research was arranged in a single-factor Completely Randomized Design (CRD) consisting of 6 treatments namely 0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ (control); 0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ; 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ; 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ; 4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ; 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ. Each treatment consisted of 3 replications, each replication consisted of 3 samples so that the total number was 54 units. The results showed that the medium, without 2,4-D and TDZ gave the best influence on the parameters of callus emergence 2 weeks, percentage of callus explants (22.22%), and pro-embryos emergence (2 weeks).

Key words: 2,4 D, Embryosomatic, TDZ, Vanda tricolor

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). Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* 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 *Vanda tricolor* yang semakin berkurang tersebut mendorong adanya upaya untuk pelestarian 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). 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).

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan embriogenesis somatik adalah auksin. Chen & Chang, 2001; 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) seperti TDZ.

Hasil penelitian dari Azadeh (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*.

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

Tujuan Penelitian: Menentukan konsentrasi 2,4D dan TDZ terbaik terhadap induksi embriosomatik *Vanda tricolor* pada medium cair.

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*.

II. Tata Cara Penelitian

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

Bahan yang diperlukan 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

Alat yang diperlukan 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.

Metode Penelitian: Penelitian ini dilakukan dengan metode percobaan laboratorium, yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan desain percobaan Faktor tunggal 6 perlakuan yaitu:

- 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

Media yang digunakan yaitu media cair. Masing-masing perlakuan ditambahkan arang aktif 0,2 g/l serta PPM 0,1 ml/l. Setiap perlakuan diulang 3 kali. Sehingga total 54 unit.

A. Cara Penelitian

1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan di autoklaf dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus kertas payung pada suhu 121°C bertekanan 1 atm. 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. 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.

3. Persiapan TDZ

Thidiazuron dilakukan menggunakan *millipore* agar cendawan penyebab kontaminasi tersaring dan aplikasinya dilakukan di LAF.

4. Persiapan 2,4-D

Penggunaan konsentrasi 2,4 D sesuai dengan perlakuan, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu.

5. 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.

6. Inkubasi

Erlenmeyer diletakkan pada shaker. Ruang inkubasi dilengkapi lampu neon (TL) 40 watt dengan suhu 20-28°C.

7. Pengamatan

Pengamatan dilakukan dari awal penanaman sampai minggu ke-8.

B. Parameter yang Diamati

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

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

2. Persentase Eksplan Terkontaminasi (%)

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

3. Persentase Eksplan Browning (%)

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

4. Persentase Eksplan Vitrifikasi (%)

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

5. Tekstur Kalus

Tekstur kalus embriogenik adalah tekstur yang remah (*friable*). Pengamatan tekstur kalus dimulai dari minggu ke -1 sampai minggu ke -8.

6. 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.

7. Persentase Eksplan Berkalus (%)

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

8. Warna Daun

Pengamatan dengan menggunakan alat yang disebut *Munshell Color Chart*. Hasil warna dinyatakan dalam skoring.

9. Jumlah Daun

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

10. Persentase Eksplan Bertunas (%)

Eksplan bertunas diamati setiap minggu selama 8 minggu, kriteria tunas yang terbentuk ditandai dengan munculnya tunas di nodus batang.

11. Waktu Muncul Pro-embrio

Waktu munculnya pro-embrio diamati setiap minggu selama 8 minggu.

12. Perkembangan Kalus dan Fase Embrio
Perkembangan fase embrio diamati setiap 1 bulan dengan cara mengamati eksplan di bawah Mikroskop Stereo SZM45 B2 + Opticlub advance dengan perbesaran 0,7x-0,8x.

III. PEMBAHASAN

A. Keberhasilan Teknik Kultur *In Vitro*

Eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* yang dikultur secara *in vitro* menunjukkan respon pertumbuhan setelah 1 minggu tahap perlakuan. Eksplan anggrek yang hidup dicirikan dengan warna hijau muda, tidak mengalami vitrifikasi, bebas kontaminasi serta pencoklatan. Keberhasilan kultur ditunjukkan oleh Tabel 1.

Tabel 1. 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 + 0,5 mg/l TDZ	22,22	11,11	66,66

1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup tunas anggrek cukup tinggi yaitu mencapai 100%. Pada Tabel 1 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.

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*.

2. Persentase Eksplan Kontaminasi

Data pada Tabel 1 menunjukkan persentase eksplan yang mengalami kontaminasi hanya sedikit hal tersebut dikarenakan eksplan sudah steril. Penggunaan *Plant Preservative Mixture* (PPM) pada medium di penelitian ini juga membantu menghambat pertumbuhan patogen. Selain PPM, pemberian iodine sebanyak tiga tetes yang diarturkan dalam aquadest steril dapat membantu menghambat terjadinya kontaminasi akibat jamur.

Eksplan yang terkontaminasi hanya pada perlakuan 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ sebesar 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.

3. Persentase Eksplan Browning

Pada penelitian ini tidak terjadi *browning* pada eksplan anggrek. Hal tersebut disebabkan karena penambahan arang aktif pada medium NDM cair yang dapat membantu menyerap senyawa racun yang berada dalam medium setelah diautoklaf atau selama pertumbuhan dalam medium. 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. Vitrifikasi yang terjadi dalam penelitian ini sangat tinggi yaitu 11,11-66,66%, data eksplan yang terkena vitrifikasi ditunjukkan pada Tabel 1. Pada penelitian ini, terjadinya vitrifikasi melalui dua cara yaitu vitrifikasi secara langsung dan tidak langsung.

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 menurut 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. 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

1. Persentase Eksplan Berkalus

Hasil pengamatan terhadap persentase eksplan membentuk kalus (Gambar 1) 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. 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 A, B, C, D dan E memiliki persentase kalus 22,22% hal tersebut diduga kandungan zat pengatur tumbuh 2,4-D dalam medium mampu menginduksi kalus pada eksplan.



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 + 0,5 mg/l TDZ

Gambar 1. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Persentase Eksplan Berkalus tunas *Vanda tricolor* pada Medium Cair 8 MST

Penggunaan kombinasi antara auksin dengan sitokinin akan meningkatkan proses induksi kalus (Kartika dkk., 2013). Sejalan dengan itu Rosdiana (2010) menyebutkan bahwa penggunaan auksin dan sitokinin yang seimbang akan memacu pembentukan kalus. Pembentukan kalus pada medium NDM diduga karena NDM memiliki vitamin dan bahan organik yang lebih kompleks seperti asam-asam amino dan bahan organik lainnya yang mampu membantu dalam menginduksi kalus lebih cepat sehingga medium NDM yang digunakan dengan penambahan zat pengatur tumbuh mampu merangsang pertumbuhan kalus (Rineksane dan Sukarjan, 2015).

Namun, pada perlakuan E, memiliki persentase berkalus paling rendah yaitu sebesar 11,11% hal tersebut disebabkan karena konsentrasi hormon eksogen yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan kalus. Menurut Aprisa (2012), 2,4-D merupakan salah satu auksin yang digunakan untuk induksi kalus yang aktif pada konsentrasi rendah, sedangkan pemberian 2,4-D yang berlebih dapat menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel.

2. Waktu Muncul Kalus

Dari data Gambar 2 menunjukkan waktu muncul kalus menunjukkan bahwa pada medium dengan penambahan 2,4-D yang sama, penambahan 0,5 mg/l TDZ selalu menyebabkan waktu munculnya kalus lebih lama dibandingkan tanpa TDZ hal tersebut diduga



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 + 0,5 mg/l TDZ

Gambar 2. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Waktu Muncul Kalus tunas *Vanda tricolor* pada Medium Cair 8 MST

karena pemberian TDZ 0,5 mg/l kurang tepat pada eksplan tunas di medium cair. Menurut (Indah dan Emarvitalini, 2013), Pemberian konsentrasi ZPT yang tidak tepat dapat menghambat pertumbuhan kalus eksplan. Terhambatnya pembentukan kalus dikarenakan hormon endogen yang terdapat pada eksplan

tidak dapat merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat.

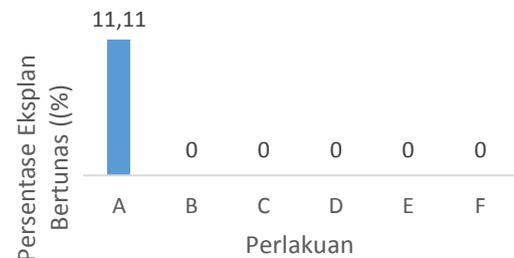
3. Tekstur Kalus

Hasil pengamatan menunjukkan eksplan yang ditanam pada medium NDM pada semua perlakuan menghasilkan kalus yang bertekstur kompak dapat dilihat pada Gambar 7, kalus yang memiliki tekstur kompak artinya kalus tersebut belum embriogenik. Menurut Yelnitis (2012), Kalus bertekstur kompak dihasilkan pada tahap induksi kalus, untuk mendapatkan kalus yang remah dan noduler kalus yang diperoleh diperbanyak dengan melakukan subkultur kalus secara berulang yang diharapkan berkembang menjadi kalus embriogenik.

C. Pertumbuhan Tunas

1. Persentase Eksplan Bertunas

Eksplan menunjukkan respon secara tidak langsung apabila eksplan tumbuh melalui kalus, kemudian akan berdiferensiasi menjadi tunas dan akar. Secara langsung apabila eksplan tumbuh langsung membentuk tunas dan akar, tanpa melalui pembentukan kalus.



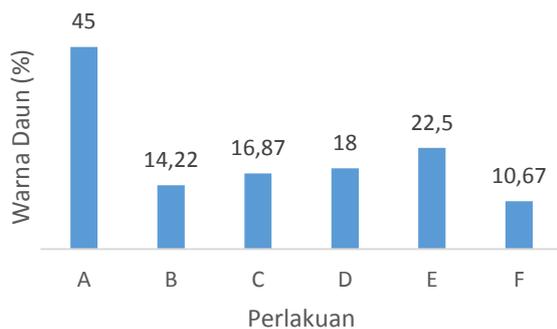
Keterangan : A= Tanpa 2,4-D + Tanpa TDZ,
 B= Tanpa 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ,
 C= 2 mg/l 2,4-D + Tanpa TDZ,
 D= 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ,
 E= 4 mg/l 2,4-D + Tanpa TDZ,
 F= 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ

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

Pada Gambar 3, hasil penelitian menunjukkan perlakuan Tanpa 2,4-D + Tanpa TDZ mengalami pertumbuhan secara langsung karena sudah terdapat tunas pada 4 MST. Sitokinin endogen yang terkandung dalam eksplan diduga sudah dapat memacu pembentukan tunas. George dan Sherington (1984) mengungkapkan bahwa sitokinin alami yang terkandung di dalam eksplan tunas dapat memacu eksplan tersebut untuk membentuk tunas.

2. Warna Daun

Warna daun pada tiap perlakuan dan dinyatakan dalam satuan persen. Semakin tinggi persentase warna daun maka semakin baik karena tingginya persentase warna daun menunjukkan warna hijau artinya penyerapan unsur hara pada eksplan anggrek *Vanda tricolor* akan semakin efektif.



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 + 0,5 mg/l TDZ

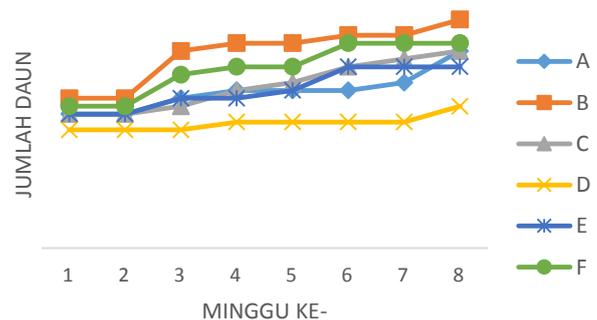
Gambar 4. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Warna Daun Eksplan tunas *Vanda tricolor* pada Medium Cair 8 MST

Berdasarkan hasil skoring, persentase warna daun tertinggi diperoleh pada Tanpa perlakuan 2,4-D + Tanpa TDZ sebesar 45% (Gambar 4), hal tersebut disebabkan medium NDM mengandung unsur-unsur hara makro, mikro, vitamin dan asam amino yang diperlukan untuk pertumbuhan. Unsur

Nitrogen diserap oleh tanaman dalam bentuk ion amonium (NH_4^+) atau ion nitrat (NO_3). Dalam medium NDM memiliki senyawa NH_4NO_3 yang tinggi. Nitrogen berfungsi untuk menyusun asam amino (protein), asam nukleat, nukleotida, dan klorofil pada tanaman. Selain itu, keberhasilan eksplan untuk dapat hidup dalam kegiatan kultur jaringan juga dipengaruhi oleh jenis, umur dan ukuran eksplan yang digunakan. Warna daun yang paling rendah yaitu pada perlakuan 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ sebesar 10,67% hal tersebut dikarenakan pada eksplan tunas terkena vitrifiksi.

3. Jumlah Daun

Pembentukan daun diawali dengan inisiasi primordia daun yang diikuti dengan proses pembelahan sel, pembesaran sel, dan diferensiasi (Wareing dan Philips, 1970).



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 + 0,5 mg/l TDZ

Gambar 5. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Jumlah Daun Eksplan Tunas *Vanda tricolor* Tiap Minggu pada Medium Cair

Grafik pada Gambar 8 menunjukkan pertumbuhan daun paling cepat yaitu pada perlakuan Tanpa 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ. Menurut Arteca (1996), adanya sitokinin berperan dalam proses pembelahan dan pembesaran sel, yang

pada akhirnya akan mengarah pada pembentukan organ seperti daun. Daun yang terbentuk berwarna hijau, menandakan bahwa pemberian sitokinin mampu merangsang perkembangan kloroplas, yang akan berperan dalam pembentukan klorofil (Arteca, 1996).

D. Pertumbuhan Pro-Embrio

1. Waktu Muncul Pro-Embrio

Waktu muncul pro-embrio ini sangat penting diamati karena semakin cepat pro-embrio yang terbentuk maka akan berpeluang mendapatkan calon tunas, calon akar maupun calon embrio dan sebaliknya. Parameter ini diamati pada setiap minggunya selama 8 minggu.

Berdasarkan data Tabel di atas (Gambar 6) waktu muncul pro-embrio paling cepat yaitu pada perlakuan 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ dan Tanpa 2,4-D + Tanpa TDZ dan pada minggu ke 2. Menurut Arteca (1996), hal tersebut dikarenakan TDZ sebagai sitokinin berperan dalam proses pembelahan dan pembesaran sel yang pada akhirnya akan mengarah pada pembentukan organ.



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 + 0,5 mg/l TDZ

Gambar 6. Histogram Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Waktu Muncul Pro-Embrio Eksplan *Vanda tricolor* Pada Medium Cair 8 MST

Pada perlakuan kontrol waktu muncul pro-embrio paling cepat hal tersebut dikarenakan pada medium

NDM unsur hara makro, mikro, vitamin dan bahan organik yang kompleks seperti asam-asam amino dan bahan organik lainnya yang mampu membantu dalam pembentukan pro-embrio. Selain itu, eksplan yang terdapat pada perlakuan kontrol berasal dari jaringan muda sehingga eksplan lebih responsif dan regenerasi sel dapat berlangsung dengan cepat.

2. Jumlah Pro-embrio

Data Tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan pengaruh antar perlakuan. Perlakuan tanpa 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ merupakan perlakuan terbaik untuk jumlah pro-embrio eksplan tetapi, tidak berbeda nyata dengan perlakuan 4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ.

Tabel 2. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Jumlah Pro-Embrio Eksplan Tunas *Vanda tricolor* pada Medium Cair 8 MST

Perlakuan	Jumlah Pro-Embrio
Tanpa 2,4-D + Tanpa TDZ	0,1100b
Tanpa 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ	1,1100a
2 mg/l 2,4-D + Tanpa TDZ	0,4467b
2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ	0,4433b
4 mg/l 2,4-D + Tanpa TDZ	0,6700ab
4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ	0,2233b

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji α 5%

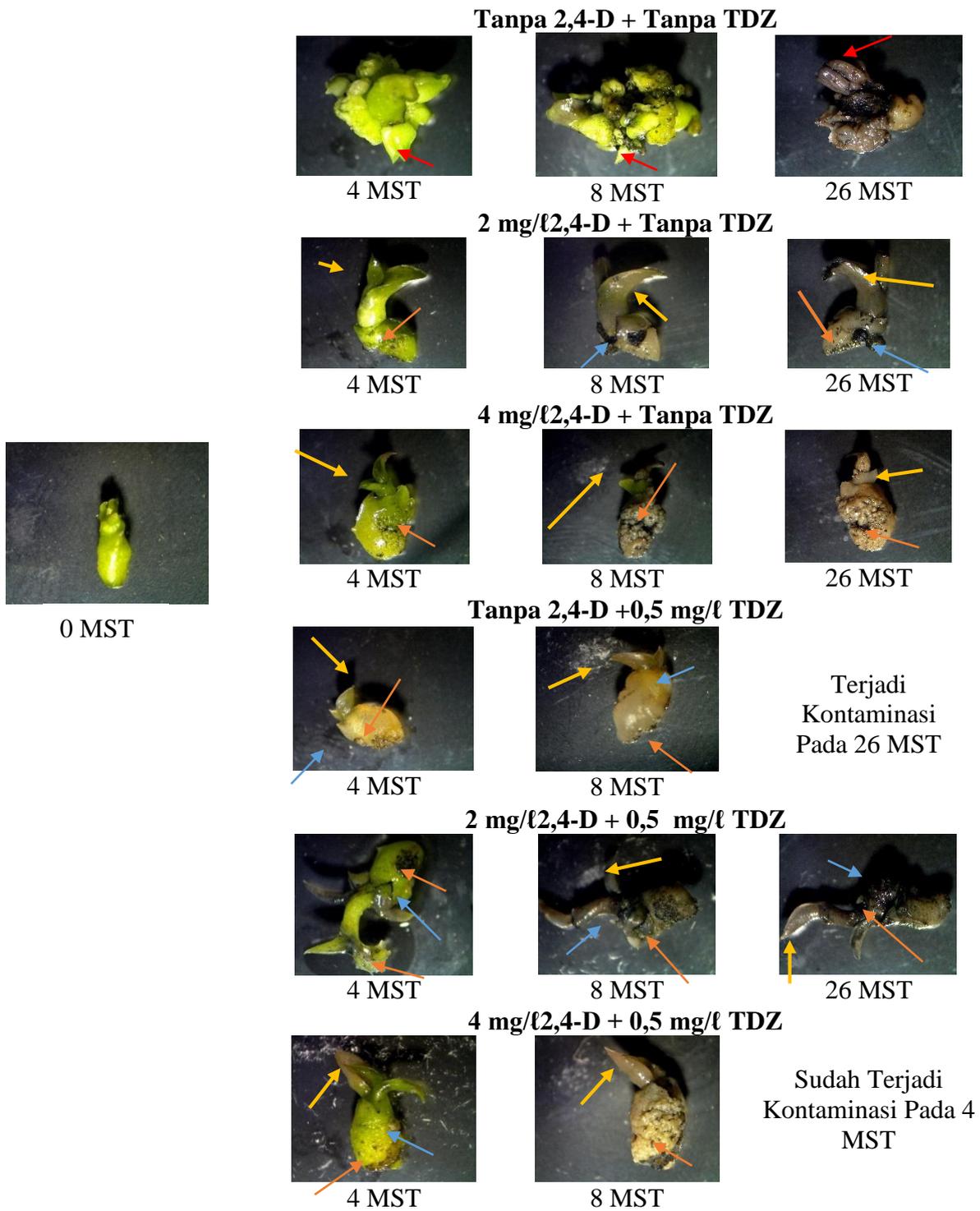
Pemberian 0,5 TDZ cukup berpengaruh dalam jumlah pro-embrio. Menurut Arteca (1996), hal tersebut dikarenakan TDZ sebagai sitokinin akan berperan dalam proses pembelahan dan pembesaran, yang pada akhirnya akan mengarah pada pembentukan organ. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh jumlah embrio. Semakin banyak pro-embrio yang terbentuk maka peluang untuk mendapatkan calon tunas, calon akar dan

calon kalus pada eksplan akan semakin tinggi.

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

3. Perkembangan Kalus dan Fase Embrio

Pengamatan mikroskop ini dilakukan pada 4 MST, 8 MST dan 26 MST. Pengamatan mikroskop dilihat pada perbesaran 0,7, 0,8 dan 0,9 kali. Seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 7. Pada pengamatan mikroskop minggu ke-4 (Gambar 7) sudah terlihat adanya kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan walaupun hanya sedikit. Pada minggu ke-8 di beberapa perlakuan yang ditunjukkan oleh panah jingga Pada pengamatan mikroskop minggu ke-4 (Gambar 7) sudah terlihat adanya kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan walaupun hanya sedikit. Pada minggu ke-8 di beberapa perlakuan yang ditunjukkan oleh panah jingga kompak dihasilkan pada tahap induksi kalus, untuk mendapatkan kalus yang remah dan noduler kalus yang diperoleh diperbanyak dengan melakukan subkultur kalus secara berulang. Pada minggu ke 26 pembentukan kalus juga tidak signifikan. Pada minggu ke-8 perlakuan 0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ tidak melalui fase kalus tetapi tunas langsung terbentuk sehingga pertumbuhan eksplan lebih cepat seperti yang ditunjukkan oleh panah hitam Gambar 7. Hal tersebut dikarenakan adanya hormon endogen yang diduga menyebabkan tunas dapat terbentuk. Pada Gambar 10 terbentuknya pro-embrio ditunjukkan oleh panah biru. Pada Gambar 10 daun ditunjukkan oleh panah kuning. Pada pengamatan minggu ke-4 warna daun masih terlihat hijau namun pada minggu ke-8 sampai minggu ke-26 warna daun sudah berwarna putih. Hal tersebut disebabkan pada eksplan tunas telah terjadi vitrifikasi. Sementara untuk penambahan jumlah daun, dari minggu ke-4 sampai minggu ke-26 tidak terlalu signifikan. Dapat dilihat pada Gambar 7 hanya bertambah 1 helai daun saja. Pada minggu ke-26 eksplan tunas perlakuan Tanpa 2,4-D +0,5 mg/l TDZ dan 4



Keterangan: Merah : Tunas
 Biru : Pro-embrio
 Kuning : Daun
 Jingga : Kalus Kompak

Gambar7. Perkembangan eksplan tunas 4 MST, 8 MST dan 26 MST

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan Tanpa 2,4-D + tanpa TDZ memberikan pengaruh terbaik pada hasil analisis waktu muncul kalus (2,00a), persentase eksplan berkalus (22,22%), dan saat muncul pro-embrio pada minggu ke-2.

B. SARAN

Berdasarkan penelitian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan konsentrasi 2,4-D dan TDZ yang terdapat pada medium NDM cair untuk mencapai tujuan agar menghasilkan embriosomatik yang menghasilkan kalus embriogenik

DAFTAR PUSTAKA

- Aprisa. 2012. Induksi Kalus Embriogenik Dua Genotipe Mutan Jagung (*Zea mays* L.) Pada Media Dasar MS dan N6. Skripsi. IPB. Bogor. Hal 241-248.
- Arteca, R.N. 1996. Plant Growth Substance, Principles and Application. Chapman and Hall. 332 p.
- Azadeh, N. 2009. Determination Of Genetic Relationships Among *Phalaenopsis* Spp. Using Random Amplified Polymorphic Dna And In Vitro Propagation Of *Phalaenopsis Gigantea*. http://psasir.upm.edu.my/id/eprint/5679/1/FP_2009_3.pdf. Universiti Putra Malaysia. Diakses pada 25 Juli 2019.
- BPP. 2007. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis: Rangkuman Kebutuhan Investasi. Edisi Kedua. Departemen Pertanian Republik Indonesia, Jakarta. 65 p.
- Bekti, R., Solichatun dan E. Anggarwulan. 2003. Pengaruh asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus Serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. Biofarmasi
- Blanc, GN; Michaux Ferrie; C. Teisson; L. Lander and M.P Carron. 1999. Effects of Carbohydrate Addition on The Induction of Embryogenesis in *Havea brasiliensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 59 : 103 -112.
- Chen, J.T dan W.C. Chang. 2001. Effect of Auksin and Cytokinins on Direct Somatic Embryogenesis on Leaf Explant of *Oncidium* "Gower Remsey" Plant Growth Regulation. 34 : 229-232.
- Fitriani H. 2008. Kajian Konsentrasi BAP dan NAA terhadap Multiplikasi Tanaman *Artemisia annua* L. secara *In Vitro*. Skripsi. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 61 hal.
- Gardiner. 2007. *Vanda tricolor* Lindl. Conservation in Java, Indonesia: Genetic and Geographic Structure and History. Lankesteriana, 7: 272-280.
- George, E.F. dan P. D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Comercial Laboratories. Exegetics Ltd., Everslay. Basingtoke. England. 709 p.
- Indah dan Emarvitalini. 2013. Induksi Kalus Daun *Calophyllum inophyllum* L pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6 BAP dan 2,4-D. ITS. Surabaya. 2(1): 2337-3520
- Karyanti, Khairiyah, Novinta. 2018. Pengaruh Wadah Kultur dan Konsentrasi Sumber Karbon Pada Perbanyakan Kentang Atlantik Secara Kultur *In Vitro*. Jurnal Bioteknologi dan Biosains Nasional. 5 : 2.
- Litz, R.E dan D. J Gray. 1995. Somatic Embryogenesis for Agriculture Improvement. World Jour. Microbiol and Biotech 11: 416-425
- Ragapadmi, Purnamaningsih. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Buletin AgroBio*. 2: 51-58.
- Rosdiana. 2010. Pertumbuhan Angggrek Bulan Endemik Sulawesi Pada Beberapa Jenis dan Konsentrasi ZPT Secara *In vitro*. Jurnal Agrisistem, 6 (2): 88-96
- Wareing, P. F. dan I. D. J. Philips. 1970. The Control of Growth and Differentiation in Plants. Pergamon Press Ltd. England. 303 p
- Yelnititis. 2012. Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.) Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan. 3 : 181-194