

INDUKSI EMBRIO SOMATIK ANGGREK *Vanda tricolor* PADA MEDIUM NDM DAN PUPUK ORGANIK CAIR (POC) DENGAN PERLAKUAN 2,4-D

Amalia Puji Etikasari¹, Innaka Ageng Rineksane², Gatot Supangkat²

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

Email : amalia.puji.2015@fp.umy.ac.id

INTISARI

Tujuan penelitian untuk menentukan jenis medium dan konsentrasi 2,4-D terbaik terhadap induksi embrio somatik anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2018 sampai dengan Maret 2019 bertempat di Laboratorium Kultur *in Vitro* Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilakukan dengan metode percobaan faktor tunggal dan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Adapun perlakuan yang diujikan yaitu kombinasi jenis medium (NDM dan POC) dengan konsentrasi 2,4-D (0; 1; 3; 5 mg/l). TDZ 0,5 mg/l ditambahkan ke dalam setiap perlakuan. Parameter yang diamati meliputi persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning*, persentase eksplan terkontaminasi, persentase eksplan vitrifikasi, waktu muncul pro-embrio, jumlah pro-embrio, persentase eksplan berkalus, waktu muncul kalus, diameter kalus, tekstur kalus, tinggi eksplan, jumlah daun, warna daun, dan pengamatan mikroskop. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan medium POC dengan konsentrasi 1 mg/l 2,4-D cenderung memberikan pengaruh terbaik yang ditunjukkan oleh waktu muncul pro-embrio pada 2,72 minggu; jumlah pro-embrio sebanyak 2,44 pro-embrio; persentase eksplan berkalus sebesar 0,84 %; waktu muncul kalus pada 30,50 hari; dan diameter kalus sebesar 3,13 mm.

Kata Kunci : Anggrek *Vanda tricolor*, *New Dogashima Medium* (NDM), Pupuk Organik Cair (POC), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

ABSTRACT

The research aims to determine the best type of medium and 2,4-D concentration on somatic embryo induction of Vanda tricolor tissue culture. The research was conducted in December 2018 to March 2019 at the Tissue Culture Laboratory of Agriculture Faculty, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. The research was conducted with a single factor experimental method and was arranged in a Completely Randomized Design (CRD) with 3 replications. The treatment tested was a combination of medium types (NDM and POC) with 2,4-D concentrations (0; 1; 3; 5 mg/l). TDZ 0,5 mg/l was added to each treatment. Parameters observed included the percentage of live explants, percentage of browning explants, percentage of contaminated explants, percentage of vitrified explants, time appears of pro-embryo, total of pro-embryos, percentage of callus explants, time appears of callus, callus diameter, callus texture, explant height, total of leaves, leaf color, and microscope observation. The results showed that the use of POC medium with a concentration of 1 mg/l 2,4-D tended to give the best effect as indicated by the time appears of pro-embryo at 2,72 weeks; total of pro-embryos as much as 2,44 pro-embryos; the percentage of callus explants is 0,84%; time appears of callus at 30,50 days; and callus diameter of 3,13 mm.

Key Words : *Vanda tricolor*, *New Dogashima Medium* (NDM), *Liquid Organic Fertilizer* (POC), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

I. PENDAHULUAN

Anggrek *Vanda tricolor* merupakan anggrek endemik kawasan lereng gunung Merapi yang memiliki bunga berwarna putih dengan bercak ungu kemerahan (Metusala, 2006). Populasi anggrek *Vanda tricolor* dilaporkan mulai berkurang dikarenakan letusan gunung Merapi tahun 1994 yang menghancurkan 80% habitat. Selain itu, kebakaran hutan lindung dan cagar alam Plawangan Turgo tahun 2002 serta awan panas tahun 2006 dan adanya eksploitasi semakin mengancam keberadaan anggrek *Vanda tricolor* (Republika, 2015).

Upaya pelestarian yang dapat dilakukan yaitu perbanyakan secara vegetatif dan generatif. Perbanyakan menggunakan biji membutuhkan waktu lama dikarenakan biji anggrek tidak mempunyai endosperm. Menurut Dwiyani dkk. (2012), perbanyakan kultur *in vitro* merupakan metode perbanyakan yang sangat bermanfaat bagi spesies tanaman langka untuk tujuan konservasi. Metode perbanyakan kultur *in vitro* dapat melalui embrio somatik, baik secara langsung maupun tidak langsung (Gunawan, 1987). Keuntungan embrio somatik antara lain tingkat multiplikasi tinggi dan bibit yang dihasilkan seragam.

Komponen penting keberhasilan embrio somatik yaitu medium dan zat pengatur tumbuh. Pada penelitian ini digunakan dua jenis medium yaitu NDM dan POC. NDM yang mengandung banyak komponen organik diharapkan mampu memicu pembentukan embrio somatik anggrek *Vanda tricolor* (Tokuhara dan Mii, 1993), serta penggunaan POC yang mengandung banyak sumber hara dapat menjadi salah satu alternatif substitusi medium dengan harga relatif murah.

2,4-D berperan sebagai auksin yang memicu pertumbuhan kalus (Jiang *et al.*, 2005). Hasil penelitian Saputra (2012) menunjukkan bahwa medium NP + 20 g/l sukrosa + 10% air kelapa + 1 mg/l 2,4-D merupakan konsentrasi terbaik (100%) inisiasi embrio somatik anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* L.) pada tiga minggu setelah subkultur dengan rerata waktu 6-7 hari.

Penelitian ini menguji pertumbuhan kalus embrio somatik asal eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* menggunakan medium NDM dan POC dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D. Penelitian bertujuan untuk menentukan jenis medium dan konsentrasi 2,4-D terbaik terhadap induksi embrio somatik anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro*.

II. TATA CARA PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan Desember 2018 - Maret 2019 di Laboratorium Kultur *in Vitro* Fakultas Pertanian UMY. Bahan yang digunakan yaitu eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor*, NDM, POC, 2,4-D, TDZ, sukrosa, PPM, arang aktif, agar, alkohol 70%, aquades, iodine, clorox, dan spiritus. Alat yang digunakan yaitu *glassware*, *dissecting kits*, pH stik, *stirrer*, pipet tetes, *millipore*, autoklaf, LAF, mikroskop Stereo SZM45 B2 + Optilab *advance*, timbangan analitik, *aluminium foil*.

Metode penelitian faktor tunggal disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diujikan adalah kombinasi jenis medium (NDM dan POC) dengan konsentrasi 2,4-D (0, 1, 3, 5 mg/l). TDZ 0,5 mg/l ditambahkan ke dalam setiap perlakuan. Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 3 sampel, sehingga jumlah keseluruhan 72 unit. Jumlah eksplan perbotol yaitu 1 buah eksplan. Cara penelitian meliputi :

1. Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan dengan dua cara yaitu sterilisasi basah dengan autoklaf suhu 121⁰C bertekanan 1 atm selama 1 jam dan sterilisasi bakar dengan lampu bunsen di dalam LAF.

2. Pembuatan Medium

a. Medium NDM

Medium NDM dibuat sebanyak 800 ml untuk 4 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml untuk 10 botol. Bahan yang dibutuhkan untuk 200 ml medium NDM yaitu: 0,392 g NDM; 6 g sukrosa; 0,1 ml PPM; 0,04 g arang aktif; 1,4 g agar; 0,5 mg/l TDZ; aquades serta 2,4-D sesuai perlakuan yaitu 0 mg/l, 1 mg/l, 3 mg/l, dan 5 mg/l. Pemberian TDZ di dalam LAF dengan *millipore* steril.

b. Medium POC

Medium POC dibuat sebanyak 800 ml untuk 4 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml untuk 10 botol. Bahan yang dibutuhkan untuk 200 ml medium POC yaitu: 0,6 ml POC DIGrow; 6 g sukrosa; 0,1 ml PPM; 0,04 g arang aktif; 1,4 g agar; 1 mg/l vitamin MS; 1 mg/l mioinositol; 0,5 mg/l TDZ; aquades serta 2,4-D sesuai perlakuan yaitu 0 mg/l, 1 mg/l, 3 mg/l, dan 5 mg/l. Pemberian TDZ di dalam LAF dengan *millipore* steril.

3. Penyiapan Eksplan

Eksplan berupa tunas anggrek *Vanda tricolor* umur 13 bulan berasal dari medium dengan penambahan ZPT yang berbeda, sehingga perlu disubkulturkan terlebih dahulu ke dalam medium NDM 0 minimal 1 minggu untuk menghomogenkan eksplan.

4. Inokulasi

Inokulasi dilakukan di dalam LAF dengan menggunakan pinset steril. Setiap botol kultur diisi dengan satu buah eksplan.

5. Inkubasi

Botol yang sudah diinokulasi diletakkan pada rak inkubasi dengan cahaya lampu TL 40 watt dan suhu 20 - 28°C. Pemeliharaan dilakukan selama 2 bulan.

6. Pengamatan

Persentase hidup, persentase *browning*, persentase terkontaminasi, persentase vitrifikasi, waktu muncul pro-embrio, jumlah pro-embrio, persentase berkalus, waktu muncul kalus, diameter kalus, tekstur kalus, tinggi eksplan, jumlah daun, warna daun, dan pengamatan mikroskop.

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan sidik ragam pada taraf α 5%. Uji lanjut dilakukan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) apabila terdapat beda nyata antar perlakuan pada taraf α 5%. Hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Persentase Eksplan Hidup, *Browning*, Terkontaminasi, dan Vitrifikasi

Hasil pengamatan persentase hidup, *browning*, vitrifikasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Persentase Hidup, *Browning*, dan Vitrifikasi Tunas *Vanda tricolor* Pada 8 MST

Perlakuan	Persentase Hidup (%)	Persentase <i>Browning</i> (%)	Persentase Vitrifikasi (%)
NDM + 0 mg/l 2,4-D	50,00	31,11	18,89
NDM + 1 mg/l 2,4-D	44,44	26,67	28,89
NDM + 3 mg/l 2,4-D	38,89	27,78	33,33
NDM + 5 mg/l 2,4-D	36,67	18,89	44,44
POC + 0 mg/l 2,4-D	61,11	28,89	10,00
POC + 1 mg/l 2,4-D	70,00	18,89	11,11
POC + 3 mg/l 2,4-D	37,78	45,56	16,67
POC + 5 mg/l 2,4-D	64,44	24,44	11,11

1. Persentase Eksplan Hidup

Berdasarkan Tabel 1 persentase eksplan hidup semua perlakuan antara 36,67 - 70,00% dengan persentase tertinggi pada perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D. Secara umum dari 4 perlakuan POC memiliki hasil lebih tinggi dalam persentase eksplan hidup. POC merupakan sumber alami, mengandung hormon IAA, Zeatin, Kinetin, dan GA-3. Persentase eksplan hidup tidak ada yang 100% bukan karena eksplan mengalami kontaminasi, akan tetapi karena eksplan mengalami *browning* dan vitrifikasi. Kontaminasi 0% menunjukkan bahwa dari segi sterilisasi sudah tepat.

2. Persentase Eksplan *Browning*

Berdasarkan Tabel 1 semua perlakuan mengalami *browning*, namun persentase eksplan *browning* tidak melebihi 50%. Persentase eksplan *browning* tertinggi sebesar 45,56% pada perlakuan POC + 3 mg/l 2,4-D. *Browning* terjadi akibat adanya senyawa fenolik yang dikeluarkan eksplan. Selain itu, beberapa eksplan sudah mengalami gejala *browning* saat subkultur pada medium NDM 0. *Browning* juga terjadi karena penggunaan pinset yang panas saat inokulasi. Upaya yang telah dilakukan untuk mengurangi resiko *browning* yaitu sterilisasi eksplan menggunakan larutan Iodin dan penambahan arang aktif pada medium. Menurut Prasetyo (2017) arang aktif dapat mengadsorpsi persenyawaan-persenyawaan beracun yang dapat menghambat pertumbuhan.

3. Persentase Eksplan Terkontaminasi

Semua perlakuan yang diujikan tidak mengalami kontaminasi. Hal ini karena eksplan yang digunakan steril. Eksplan disterilisasi menggunakan larutan Iodin, sehingga kontaminasi tidak terjadi. Sterilisasi medium dan alat juga sudah tepat. Pada medium ditambah PPM yang merupakan antibiotika sintetik yang memiliki spektrum luas, sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif (Probowati, 2011).

4. Persentase Eksplan Vitrifikasi

Berdasarkan Tabel 1 semua perlakuan mengalami vitrifikasi, namun persentase eksplan vitrifikasi tidak melebihi 50%. Persentase eksplan vitrifikasi tertinggi sebesar 44,44% pada perlakuan NDM + 5 mg/l 2,4-D. Vitrifikasi ditandai dengan hilangnya kandungan sel-sel pada tanaman dan klorofil dalam eksplan serta perubahan warna menjadi putih bening. Vitrifikasi disebabkan melemahnya jaringan eksplan dan potensial air dalam medium menyebabkan hilangnya kemampuan eksplan dalam menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh, sehingga air masuk dan terjadi vitrifikasi.

B. Perkembangan Pro-Embrio

Perkembangan pro-embrio merupakan indikator adanya pertumbuhan embriogenesis secara langsung. Hasil pengamatan perkembangan pro-embrio berupa waktu muncul pro-embrio dan jumlah pro-embrio disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Waktu Muncul dan Jumlah Pro-Embrio Tunas *Vanda tricolor* Pada 8 MST

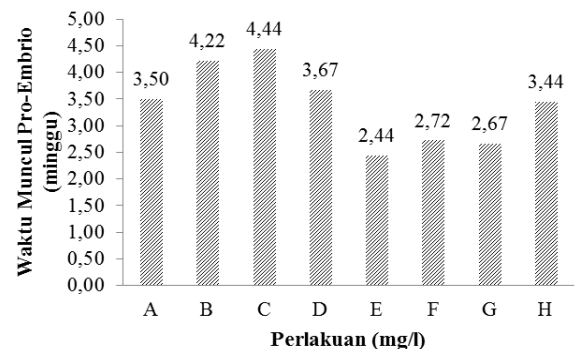
Perlakuan	Waktu Muncul Pro-Embrio (Minggu)	Jumlah Pro-Embrio
NDM + 0 mg/l 2,4-D	3,50 abc	1,55 abc
NDM + 1 mg/l 2,4-D	4,22 ab	1,45 abc
NDM + 3 mg/l 2,4-D	4,44 a	1,33 abc
NDM + 5 mg/l 2,4-D	3,67 abc	1,22 bc
POC + 0 mg/l 2,4-D	2,44 c	2,00 abc
POC + 1 mg/l 2,4-D	2,72 bc	2,44 a
POC + 3 mg/l 2,4-D	2,67 bc	2,33 ab
POC + 5 mg/l 2,4-D	3,44 abc	1,11 c

Keterangan: Angka rerata yang diikuti oleh huruf sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan hasil DMRT pada α 5 %

1. Waktu Muncul Pro-Embrio

Berdasarkan Tabel 2 perlakuan yang diujikan berbeda nyata. Waktu muncul pro-embrio tercepat pada perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D dengan rerata 2,44 minggu akan tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan NDM + 0 mg/l 2,4-D; NDM + 5 mg/l 2,4-D; POC + 1 mg/l 2,4-D; POC + 3 mg/l 2,4-D; dan POC + 5 mg/l 2,4-D. Penggunaan auksin tinggi dan sitokinin

rendah akan menginduksi embriogenesis, sedangkan auksin rendah dan sitokinin tinggi akan menginduksi tunas (George and Sherrington, 1984). Hasil pengamatan waktu muncul pro-embrio disajikan pada Gambar 1.



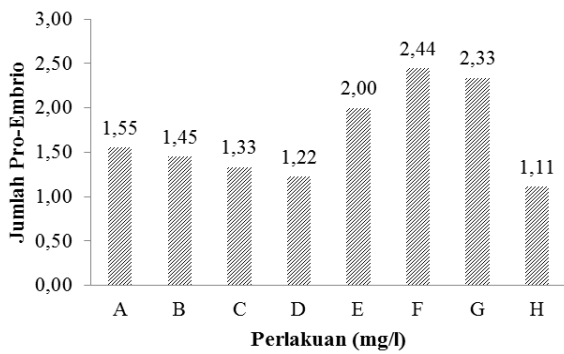
Keterangan :

A: NDM+ 0 mg/l 2,4-D E: POC+ 0 mg/l 2,4-D
 B: NDM+ 1 mg/l 2,4-D F: POC+ 1 mg/l 2,4-D
 C: NDM+ 3 mg/l 2,4-D G: POC+ 3 mg/l 2,4-D
 D: NDM+ 5 mg/l 2,4-D H: POC+ 5 mg/l 2,4-D
 Gambar 1. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Waktu Muncul Pro-Embrio Tunas *Vanda tricolor*

Semua perlakuan POC memiliki hasil lebih cepat dalam memunculkan pro-embrio. POC memiliki kandungan asam amino yang berperan mendorong pembentukan embrio somatik. Sesuai pernyataan Remita dkk. (2013) bahwa dalam memacu pertumbuhan tunas pada eksplan diperlukan suatu asam amino. Pro-embrio dapat tumbuh pada bagian batang eksplan dan dapat bertambah bahkan berkembang menjadi akar maupun tunas.

2. Jumlah Pro-Embrio

Berdasarkan Tabel 2 perlakuan yang diujikan berbeda nyata. Pertambahan jumlah pro-embrio terbaik pada perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D dengan rerata 2,44 pro-embrio akan tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan NDM + 0 mg/l 2,4-D; NDM + 1 mg/l 2,4-D; NDM + 3 mg/l 2,4-D; POC + 0 mg/l 2,4-D; dan POC + 3 mg/l 2,4-D. Waktu inkubasi 8 minggu belum cukup untuk menginduksi tunas. Penelitian Latip *et al.* (2010) menyebutkan proliferasi protocorm anggrek *Phalaenopsis gigantia* secara kultur *in vitro* memerlukan waktu 40-80 hari (6-12 minggu). Hasil pengamatan pertambahan jumlah pro-embrio disajikan pada Gambar 2.



Keterangan :

A: NDM+ 0 mg/l 2,4-D E: POC+ 0 mg/l 2,4-D
 B: NDM+ 1 mg/l 2,4-D F: POC+ 1 mg/l 2,4-D
 C: NDM+ 3 mg/l 2,4-D G: POC+ 3 mg/l 2,4-D
 D: NDM+ 5 mg/l 2,4-D H: POC+ 5 mg/l 2,4-D

Gambar 2. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Jumlah Pro-Embrio Tunas *Vanda tricolor* Pada 8 MST

Secara umum dari 4 perlakuan POC memiliki hasil lebih tinggi dalam pertambahan jumlah pro-embrio. POC memiliki kandungan asam amino yang berperan sebagai sumber Nitrogen organik dan dapat memacu pertambahan jumlah pro-embrio. Pro-embrio dapat berkembang menjadi akar dan tunas.

C. Perkembangan Kalus

Perkembangan kalus merupakan indikator adanya pertumbuhan embriogenesis secara tidak langsung. Hasil pengamatan perkembangan kalus berupa persentase berkalus, waktu muncul kalus, dan diameter kalus disajikan pada Tabel 3.

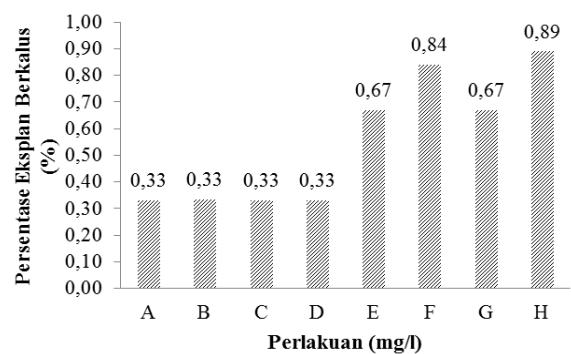
Tabel 3. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Persentase Berkalus, Waktu Muncul Kalus, dan Diameter Kalus Tunas *Vanda tricolor* Pada 8 MST

Perlakuan	Persentase Berkalus (%)	Waktu Muncul Kalus (hari)	Diameter Kalus (mm)
NDM + 0 mg/l 2,4-D	0,33 b	44,00 a	0,83 a
NDM + 1 mg/l 2,4-D	0,33 b	42,00 a	0,64 a
NDM + 3 mg/l 2,4-D	0,33 b	54,00 a	0,50 a
NDM + 5 mg/l 2,4-D	0,33 b	40,00 a	0,67 a
POC + 0 mg/l 2,4-D	0,67 ab	34,00 a	2,25 a
POC + 1 mg/l 2,4-D	0,84 a	30,50 a	3,13 a
POC + 3 mg/l 2,4-D	0,67 ab	34,00 a	1,75 a
POC + 5 mg/l 2,4-D	0,89 a	36,22 a	3,78 a

Keterangan: Angka rerata yang diikuti oleh huruf sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan hasil DMRT pada α 5 %

1. Persentase Eksplan Berkalus

Berdasarkan Tabel 3 perlakuan yang diujikan berbeda nyata. Persentase berkalus terbaik pada perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D sebesar 0,84% dan POC + 5 mg/l 2,4-D sebesar 0,89% akan tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D dan POC + 3 mg/l 2,4-D. Semua perlakuan POC memiliki hasil lebih tinggi dalam persentase berkalus. POC memiliki kandungan asam amino dan hormon perangsang pertumbuhan jaringan tanaman, sehingga dapat memacu induksi kalus. Hasil pengamatan persentase berkalus disajikan pada Gambar 3.



Keterangan :

A: NDM+ 0 mg/l 2,4-D E: POC+ 0 mg/l 2,4-D
 B: NDM+ 1 mg/l 2,4-D F: POC+ 1 mg/l 2,4-D
 C: NDM+ 3 mg/l 2,4-D G: POC+ 3 mg/l 2,4-D
 D: NDM+ 5 mg/l 2,4-D H: POC+ 5 mg/l 2,4-D

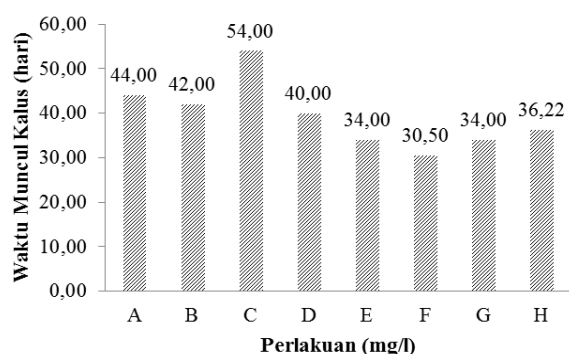
Gambar 3. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Persentase Berkalus Tunas *Vanda tricolor* Pada 8 MST

Perlakuan POC + 5 mg/l 2,4-D memiliki hasil persentase eksplan berkalus tertinggi sebesar 0,89%. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D dapat meningkatkan persentase eksplan berkalus, akan tetapi persentase eksplan berkalus perlakuan POC + 3 mg/l 2,4-D tidak lebih tinggi dari POC + 0 mg/l 2,4-D dan POC + 1 mg/l 2,4-D. Hal ini dapat dipengaruhi oleh kondisi dan kemampuan eksplan dalam menyerap zat pengatur tumbuh dalam medium.

2. Waktu Muncul Kalus

Berdasarkan Tabel 3 perlakuan yang diujikan tidak berbeda nyata. Penggunaan medium NDM dan POC dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D tidak memberikan pengaruh yang signifikan akan tetapi semua perlakuan POC memiliki hasil lebih cepat

dalam muncul kalus. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan memiliki respon yang lebih baik terhadap POC sebagai medium tumbuh. Hasil pengamatan waktu muncul kalus disajikan pada Gambar 4.



Keterangan :

A: NDM+ 0 mg/l 2,4-D E: POC+ 0 mg/l 2,4-D
 B: NDM+ 1 mg/l 2,4-D F: POC+ 1 mg/l 2,4-D
 C: NDM+ 3 mg/l 2,4-D G: POC+ 3 mg/l 2,4-D
 D: NDM+ 5 mg/l 2,4-D H: POC+ 5 mg/l 2,4-D
 Gambar 4. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Waktu Muncul Kalus Tunas *Vanda tricolor*

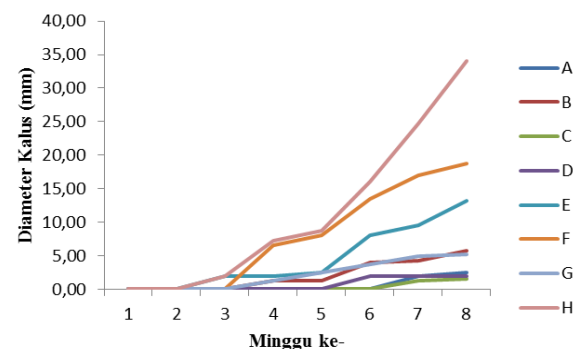
Perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D memiliki hasil waktu muncul kalus terbaik dengan rerata 30,50 hari sedangkan NDM + 3 mg/l 2,4-D memiliki hasil waktu muncul kalus terlama dengan rerata 54,00 hari. Keadaan eksplan *browning* dan vitrifikasi dapat menghambat penyerapan auksin yang berperan dalam pembelahan, pembesaran, dan pemanjangan sel sehingga berpengaruh terhadap waktu muncul kalus.

3. Diameter Kalus

Berdasarkan Tabel 3 perlakuan yang diujikan tidak berbeda nyata. Penggunaan medium NDM dan POC dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Secara umum dari 4 perlakuan POC memiliki hasil lebih tinggi dalam diameter kalus akan tetapi perlakuan POC + 3 mg/l 2,4-D tidak lebih tinggi dari POC + 0 mg/l 2,4-D dan POC + 1 mg/l 2,4-D. Hal ini dikarenakan persentase eksplan berkalus juga memiliki hasil demikian, sehingga berpengaruh pada diameter kalus. Hasil pengamatan diameter kalus disajikan pada Gambar 5.

Perlakuan POC + 5 mg/l 2,4-D memiliki hasil terbaik dalam diameter kalus. Menurut Widiastoety (2014), dalam

hubungannya dengan permeabilitas sel, auksin meningkatkan difusi masuknya air ke dalam sel dan menyebabkan volume kalus meningkat.



Keterangan :

A: NDM+ 0 mg/l 2,4-D E: POC+ 0 mg/l 2,4-D
 B: NDM+ 1 mg/l 2,4-D F: POC+ 1 mg/l 2,4-D
 C: NDM+ 3 mg/l 2,4-D G: POC+ 3 mg/l 2,4-D
 D: NDM+ 5 mg/l 2,4-D H: POC+ 5 mg/l 2,4-D
 Gambar 5. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Diameter Kalus Tunas *Vanda tricolor*

4. Tekstur Kalus

Tekstur kalus yang baik adalah remah karena lebih mudah dipisahkan antar selnya, sedangkan tekstur kalus kompak memiliki sel berikatan rapat dan padat. Hasil pengamatan tekstur kalus disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Tekstur Kalus Tunas *Vanda tricolor* Pada 8 MST

Perlakuan	Tekstur Kalus
NDM + 0 mg/l 2,4-D	<i>Compact</i>
NDM + 1 mg/l 2,4-D	<i>Compact</i>
NDM + 3 mg/l 2,4-D	<i>Compact</i>
NDM + 5 mg/l 2,4-D	<i>Compact</i>
POC + 0 mg/l 2,4-D	<i>Compact</i>
POC + 1 mg/l 2,4-D	<i>Compact</i>
POC + 3 mg/l 2,4-D	<i>Compact</i>
POC + 5 mg/l 2,4-D	<i>Compact</i>

Berdasarkan Tabel 4 tekstur kalus kompak diperoleh semua perlakuan. Konsentrasi tinggi auksin eksogen (2,4-D) dapat mempengaruhi peningkatan auksin endogen eksplan. Adanya sitokinin (TDZ) dalam konsentrasi rendah juga dapat mempengaruhi terbentuknya kalus kompak. Diperkuat pernyataan Ariati (2012) bahwa tekstur kalus kompak merupakan efek dari

sitokinin dan auksin yang mempengaruhi potensial air dalam sel menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel meningkat, sehingga sel menjadi lebih kaku. Kalus kompak membutuhkan proses subkultur dengan waktu lama untuk menjadi kalus remah.

D. Perkembangan Eksplan

Parameter perkembangan eksplan meliputi tinggi eksplan, jumlah daun, dan warna daun. Hasil pengamatan pertambahan tinggi eksplan dan jumlah daun disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Pertambahan Tinggi Eksplan dan Jumlah Daun Tunas *Vanda tricolor* Pada 8MST

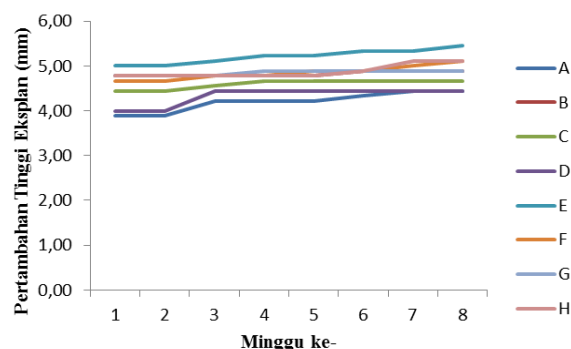
Perlakuan	Pertambahan Tinggi Eksplan (mm)	Pertambahan Jumlah Daun (helai)
NDM + 0 mg/l 2,4-D	0,55 a	0,33 a
NDM + 1 mg/l 2,4-D	0,33 a	0,33 a
NDM + 3 mg/l 2,4-D	0,67 a	0,33 a
NDM + 5 mg/l 2,4-D	0,67 a	0,33 a
POC + 0 mg/l 2,4-D	0,67 a	1,55 a
POC + 1 mg/l 2,4-D	0,67 a	0,67 a
POC + 3 mg/l 2,4-D	0,33 a	1,00 a
POC + 5 mg/l 2,4-D	0,33 a	0,67 a

Keterangan: Angka rerata yang diikuti oleh huruf sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan hasil DMRT pada α 5 %

1. Tinggi Eksplan

Berdasarkan Tabel 5 perlakuan yang diujikan tidak berbeda nyata. Penggunaan medium NDM dan POC dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Diduga medium dan zat pengatur tumbuh yang digunakan telah memberikan nutrisi yang cukup untuk pertambahan tinggi eksplan. Hasil pengamatan pertambahan tinggi eksplan disajikan pada Gambar 6.

Semua perlakuan mengalami pertambahan tinggi dari hari ke-0 sampai 8 MST. Perlakuan NDM + 0 mg/l 2,4-D memiliki hasil tertinggi dalam pertambahan tinggi eksplan. Penggunaan auksin dengan konsentrasi lebih tinggi dari sitokinin memiliki fungsi mempengaruhi pertambahan panjang dan pertumbuhan batang (Dewi, 2008). Dimungkinkan auksin endogen pada eksplan masih berperan dalam metabolisme tanaman.



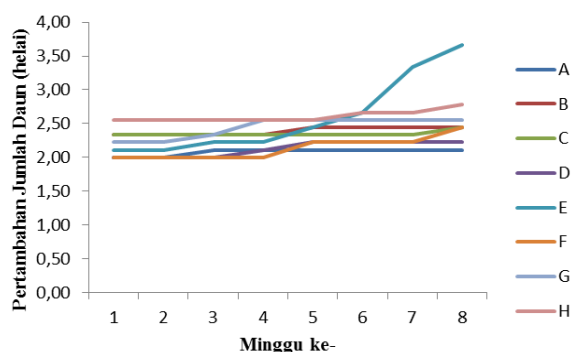
Keterangan :

A: NDM+ 0 mg/l 2,4-D E: POC+ 0 mg/l 2,4-D
 B: NDM+ 1 mg/l 2,4-D F: POC+ 1 mg/l 2,4-D
 C: NDM+ 3 mg/l 2,4-D G: POC+ 3 mg/l 2,4-D
 D: NDM+ 5 mg/l 2,4-D H: POC+ 5 mg/l 2,4-D

Gambar 6. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Pertambahan Tinggi Eksplan Tunas *Vanda tricolor*

2. Jumlah Daun

Berdasarkan Tabel 5 perlakuan yang diujikan tidak berbeda nyata. Penggunaan medium NDM dan POC dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Diduga eksplan tunas *Vanda tricolor* yang digunakan memerlukan waktu lebih lama untuk membentuk daun baru. Sebagaimana pendapat Rupawan dkk. (2014) yang menyatakan bahwa tinggi eksplan, jumlah tunas, dan jumlah daun membutuhkan waktu pengamatan minimal 9 MSP (minggu setelah penanaman) atau selama 3 bulan. Hasil pengamatan pertambahan jumlah daun disajikan pada Gambar 7.



Keterangan :

A: NDM+ 0 mg/l 2,4-D E: POC+ 0 mg/l 2,4-D
 B: NDM+ 1 mg/l 2,4-D F: POC+ 1 mg/l 2,4-D
 C: NDM+ 3 mg/l 2,4-D G: POC+ 3 mg/l 2,4-D
 D: NDM+ 5 mg/l 2,4-D H: POC+ 5 mg/l 2,4-D

Gambar 7. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Pertambahan Jumlah Daun Tunas *Vanda tricolor*

Perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D memiliki hasil tertinggi dalam pertambahan jumlah daun. Kandungan hara terutama asam amino sebagai sumber Nitrogen organik pada medium POC dapat memenuhi kebutuhan hara yang dibutuhkan untuk pembentukan daun. Selain itu, perlakuan ini memiliki kemampuan dalam memunculkan pro-embrio yang berkembang menjadi tunas, sehingga mempengaruhi parameter pertambahan jumlah daun.

3. Warna Daun

Pengamatan warna daun dibandingkan dengan intensitas warna dalam buku *Munsell Plant Tissue Colour Chart* dan didasarkan pada nilai skoring dari penampakan daun. Semakin hijau warna daun maka nilai skoring semakin tinggi. Hasil pengamatan warna daun disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Warna Daun Tunas *Vanda tricolor* Pada 1 dan 8 MST

Perlakuan	Warna daun minggu ke-1	Skor minggu ke-1	Warna daun minggu ke-8	Skor minggu ke-8
NDM + 0 mg/l 2,4-D	2,5 GY 8/8	+++	5 Y 8/4	++
NDM + 1 mg/l 2,4-D	2,5 GY 8/8	+++	5 Y 8/4	++
NDM + 3 mg/l 2,4-D	2,5 GY 8/6	+++	5 Y 8/4	++
NDM + 5 mg/l 2,4-D	2,5 GY 8/6	+++	5 Y 8/2	++
POC + 0 mg/l 2,4-D	2,5 GY 8/8	+++	2,5 Y 8/6	+
POC + 1 mg/l 2,4-D	5 GY 7/8	++++	5 GY 7/8	++++
POC + 3 mg/l 2,4-D	5 Y 8/6	++	2,5 Y 8/6	+
POC + 5 mg/l 2,4-D	2,5 GY 8/6	+++	5 Y 8/8	++

Keterangan :

G = Green

Y = Yellow

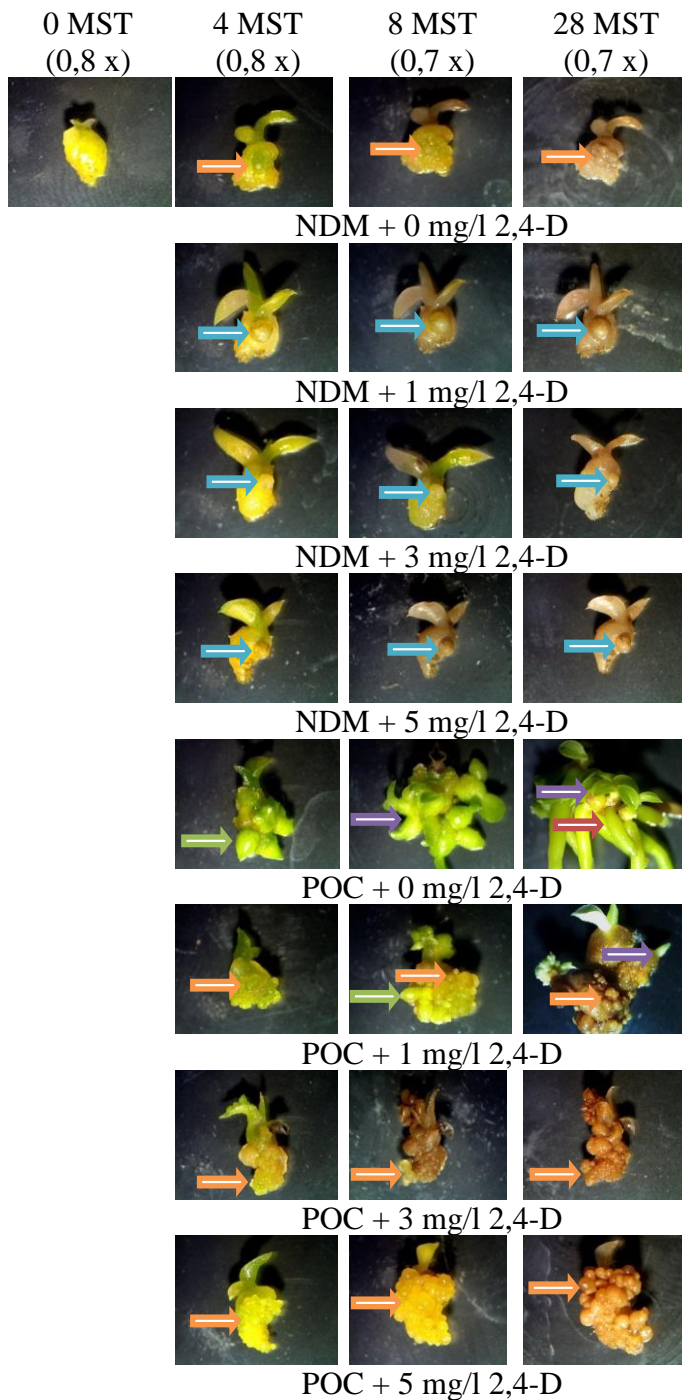
Berdasarkan Tabel 6 perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D memiliki hasil terbaik dalam warna daun dengan nilai skoring 5 GY 7/8. Perlakuan ini dapat mempertahankan warna hijau daun dari minggu ke-1 hingga ke-8. Kestabilan warna hijau daun dipengaruhi oleh unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam medium yang jumlahnya mencukupi, sehingga mampu untuk menstimulasi terjadinya sintesis klorofil dalam sel yang mengakibatkan warna daun tetap hijau.

E. Pengamatan Mikroskop

Peristiwa terjadinya struktur-struktur atau bentukan-bentukan baru pada eksplan yang sebelumnya tidak ada disebut dengan morfogenesis (Katuuk, 1989). Pengamatan mikroskop bertujuan untuk mengetahui perkembangan kalus dan fase embrio secara detail apabila terbentuk fase globular, heart, torpedo, dan kotiledon. Pengamatan mikroskop menggunakan mikroskop Stereo SZM45 B2 + Optilab *advance* pada perbesaran 0,7x dan perbesaran 0,8x. Hasil pengamatan mikroskop disajikan pada Gambar 8.

Hasil pengamatan terhadap perkembangan morfogenesis eksplan diketahui bahwa sebagian besar eksplan tumbuh kalus. Pembentukan kalus sangat lambat dan hingga akhir pengamatan beberapa kalus yang terbentuk belum membesar. Posisi kalus ada di batang dan daun eksplan. Kalus berwarna kuning dan hijau serta bersifat kompak. Menurut Soeryowinoto (1996) terbentuknya kalus dapat disebabkan oleh adanya sel-sel yang kontak dengan medium terdorong menjadi meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan.

Perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D memiliki hasil terbaik dalam perkembangan morfogenesis. Pada 4 MST eksplan menunjukkan pertumbuhan embriogenesis secara langsung pada fase globular dan pada 8 MST berkembang menjadi beberapa tunas serta terbentuk daun. Diduga auksin endogen pada eksplan mampu mempengaruhi pembelahan dan pembesaran sel akan tetapi beberapa eksplan mengalami *browning* dan vitrifikasi sehingga berdampak pada perkembangan morfogenesis eksplan.



Keterangan :

- : Pro-Embrio
- : Kalus Kompak
- : Embrio Globular
- : Tunas
- : Akar

Gambar 8. Perkembangan Morfogenesis Eksplan Tunas *Vanda tricolor* Berdasarkan Pengamatan Mikroskop Pada 4 dan 8 MST

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Induksi embrio somatik anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro* pada medium POC dengan konsentrasi 1 mg/l 2,4-D cenderung memberikan pengaruh terbaik yang ditunjukkan oleh waktu muncul pro-embrio pada 2,72 minggu; jumlah pro-embrio sebanyak 2,44 pro-embrio; persentase eksplan berkalus sebesar 0,84 %; waktu muncul kalus pada 30,50 hari; dan diameter kalus sebesar 3,13 mm.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk subkultur agar menghasilkan kalus embriogenik yang bertekstur remah.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariati, S.N. 2012. Induksi Tanaman Kakao Pada Medium MS dengan Penambahan 2,4-D. *Jurnal Natural Science*. 1(1): 74-84.
- Dewi, I.R. 2008. Peranan dan Fungsi Fitohormon bagi Pertumbuhan Tanaman. Skripsi. Universitas Padjajaran. Hal 43.
- Dwiyani, R., Indrianto, A., Purwantoro, A., & Semiarti, E. 2012. Konservasi Anggrek Alam Indonesia *Vanda tricolor* Lindl. Varietas Suavis Melalui Kultur Embrio Secara *in Vitro*. *Jurnal Bumi Lestari*. 12(1): 93-98.
- George, E.F. & P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Hand Book and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetics Limited. England. 709 p.
- Gunawan, L.W. 1987. *Teknik Kultur Jaringan*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Hal 252.
- Jiang, B., Yang, Y., Guo, Y., Guo, Z., & Chen, Y. 2005. Thidiazuron-induced *in Vitro* Shoot Organogenesis of the Medicinal Plant *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In vitro Cell Dev. Biol-Plant*. 41: 677-681.
- Katuuk, J.R.P. 1989. *Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropopagasi Tanaman*. Depdikbut. Jakarta. Hal 186.

- Latip, M.A., R. Murdad, Z.A. Aziz, L.H. Ting, L.M. Govindasamy, & R. Ripin. 2010. Effects of N6-Benzyladenine and Thidiazuron on Proliferation of *Phalaenopsis gigantea* Protocorms. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology Biotechnology*. 18(1): 217-220.
- Metusala, D. 2006. Melirik Konservasi Anggrek *Vanda tricolor* di Merapi. <http://anggrek.org/melirik-konservasi-anggrek-vanda-tricolor-di-merapi-2.html>. Diakses 25 Maret 2018.
- Prasetyo, R. 2017. Fungsi Arang Aktif (*Charcoal*) Pada Medium Kultur. <https://www.coursehero.com/file/22609090/Fungsi-Arang-Aktif/>. Diakses 28 April 2019.
- Probowati, D.W.N. 2011. Pengaruh Pemberian Antibiotika Pada Kultur *in Vitro* Pulai (*Alstonia scholaris* (L.) R. Br). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Hal 85.
- Remita, Y., Nurhidayati, T., & Nurmalasari. 2013. Pengaruh Medium MS dengan Penambahan Arginin 100 ppm Terhadap Pertumbuhan Tunas Apikal Tebu (*Saccharum officinarum*) Varietas NXI. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(1): 2337-3520.
- Republika. 2015. Anggrek Khas Lereng Merapi Terancam Punah. <http://www.republika.co.id/berita/nasional/daerah/15/02/03/nj6qlj-anggrekkhas-lereng-merapi-terancam-punah>. Diakses 31 Maret 2018.
- Rupawan, I. M., Basri, Z. & Bustami, M. 2014. Pertumbuhan Anggrek *Vanda* sp Pada Berbagai Komposisi Media Secara *in Vitro*. *Jurnal Agrotekbis*. 2(5): 488-494.
- Saputra, B. 2012. Induksi Kalus Embriogenik dan Inisiasi Embrio Somatik Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) Menggunakan Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat. S1 Thesis. Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Hal 11.
- Soeryowinoto, M. 1996. Pemuliaan Tanaman Secara *in Vitro*. Kanisius. Yogyakarta. Hal 252.
- Tokuhara, K. & M. Mii. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by Culturing Shoot Tips of Flower Stalk Buds. *Plant Cell Reports*. 13: 7-11.
- Widiastoety, D. 2014. Pengaruh Auksin dan Sitokinin Terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek *Mokara*. *J. Hort*. 24(3): 230-238.