

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman anggrek merupakan tanaman yang mempunyai biji tanpa endosperm atau cadangan makanan, sehingga jika biji jatuh di tempat yang kurang memadai maka tanaman anggrek untuk bisa tumbuh keberhasilannya rendah. Persemaian dengan kultur *in vitro* adalah salah satu solusi untuk menumbuhkan tanaman anggrek dengan keberhasilan tinggi.

Tunas yang digunakan pada penelitian ini berasal dari hasil persemaian anggrek *Vanda tricolor* secara kultur *in vitro*.

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

Pertumbuhan eksplan di dalam kultur *in vitro* dipengaruhi oleh medium kultur dan eksplan. Eksplan yang mengalami kontaminasi, *browning* maupun vitrifikasi akan mengakibatkan penurunan dari keberhasilan kultur *in vitro* tersebut. Selain itu, kesesuaian antara medium dan eksplan merupakan faktor utama keberhasilan teknik kultur *in vitro* (George, et al., 2007). Kontaminasi pada eksplan tidak terjadi karena eksplan yang digunakan adalah Tunas Anggrek *Vanda tricolor* steril. Selain itu, sewaktu penanaman dilakukan dalam keadaan yang steril. Persentase Eksplan Hidup, Persentase Eksplan Kontaminasi, Persentase Eksplan *Browning*, dan Persentase Eksplan Vitrifikasi Tunas Anggrek *Vanda tricolor* disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh 2,4 D dan BAP terhadap Persentase Eksplan Hidup, Persentase Eksplan Kontaminasi, Persentase Eksplan *Browning*, dan Persentase Eksplan Vitrifikasi Tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST).

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)	Persentase Eksplan Kontaminasi (%)	Persentase Ekplan <i>Browning</i> (%)	Persentase Eksplan Vitrifikasi (%)
2,4D 0 mg/l + BAP 0 mg/l	55,56	0	22,22	22,22
2,4D 0 mg/l + BAP 0,1 mg/l	66,67	0	22,22	11,11
2,4D 0 mg/l + BAP 0,5 mg/l	55,56	0	22,22	22,22
2,4D 2 mg/l + BAP 0 mg/l	55,56	0	22,22	22,22
2,4D 2 mg/l + BAP 0,1 mg/l	44,45	0	33,33	22,22
2,4D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l	100,00	0	0,00	0,00
2,4D 4 mg/l + BAP 0 mg/l	33,33	0	55,56	11,11
2,4D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l	33,34	0	33,33	33,33
2, D 4 mg/l + BAP 0,5 mg/l	33,34	0	33,33	33,33



a. Eksplan *Browning*



b. Eksplan Vitrifikasi

Gambar 2. Eksplan *Vanda tricolor* yang mengalami *Browning* (a) dan Vitrifikasi (b)

1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup adalah jumlah eksplan yang dapat bertahan hidup, tumbuh dan berkembang dengan adaptasi di suatu media. Persentase eksplan hidup diamati untuk melihat jumlah eksplan yang bertahan hidup pada medium perlakuan yang diberikan. Eksplan yang hidup ditandai dengan warna eksplan berwarna hijau atau hijau muda dan tidak mengalami kontaminasi serta *browning*.

Berdasarkan data Tabel 1 diketahui bahwa perlakuan yang menggunakan konsentrasi ZPT 2,4 D tinggi memiliki persentase hidup eksplan rendah. Pada perlakuan 2,4D 4 mg/l + BAP 0 mg/l persentase hidup 33,33%, perlakuan 2,4D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l persentase hidup eksplan 33,34% dan pada perlakuan 2, D 4 mg/l + BAP 0,5 mg/l persentase hidup 33,34%. Rendahnya persentase eksplan hidup pada perlakuan tersebut bukan disebabkan oleh kontaminasi namun disebabkan oleh pencoklatan atau *browning* dan vitrifikasi. Eksplan mengalami *browning* sehingga mengakibatkan pertumbuhan dan perkembangan menjadi terhambat. *Browning* terjadi karena senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh eksplan yang bereaksi dengan oksigen sehingga terjadi oksidasi yang mengakibatkan pencoklatan pada permukaan eksplan.

Persentase eksplan hidup dalam penelitian ini tidak ditentukan dari ZPT yang digunakan. Hal ini disebabkan oleh kecepatan *browning* yang lebih cepat dibandingkan proses penyerapan unsur hara yang ada pada medium sehingga eksplan tidak mengalami pembentukan kalus dan mengalami kematian. Faktor yang mempengaruhi persentase eksplan hidup salah satunya adalah persentase *browning*.

2. Persentase Eksplan Terkontaminasi

Kontaminasi yang diakibatkan oleh jamur ditandai adanya miselium berwarna tidak berlendir. Sementara kontaminasi akibat bakteri dilihat dengan adanya lendir. Hasil data pengamatan Tabel 1 persentase eksplan kontaminasi 0%. Hal ini dikarenakan eksplan yang digunakan merupakan eksplan yang berasal dari kultur steril, sehingga dapat mencegah terjadinya kontaminasi.

Sterilisasi medium dan alat yang digunakan juga sudah tepat. Peran *Plant Preservative Mixure* atau (PPM) di dalam medium yang diberikan pada setiap perlakuan membantu meminimalisir terjadinya kontaminasi. Hal ini dikarenakan PPM merupakan salah satu bahan biosida dalam kultur cair yang termasuk golongan Isotiazolon yang dapat menghambat mikroba dan jamur (Sharaf dan Weathers, 2006).

3. Persentase Eksplan *Browning*

Persentase eksplan *browning* diamati untuk mengetahui adaptasi dari tunas Anggrek *Vanda tricolor* dari media awal ke dalam media perlakuan. Persentase eksplan yang telah mengalami *browning* dihitung dari adanya perubahan warna pada permukaan eksplan. Warna eksplan dari hijau kemudian berubah menjadi kecoklatan lebih dari 50%.

Pada Tabel 1 menunjukkan eksplan yang mengalami *browning* terjadi hampir seluruh perlakuan. Persentase *browning* pada tunas Anggrek *Vanda tricolor* sebesar 22,22 - 55,56% dengan perlakuan yang paling tinggi mengalami *browning* adalah perlakuan 2,4D 4 mg/l + BAP 0 mg/l.

Pencoklatan atau *browning* terjadi pada perlakuan 2,4D 0 mg/l + BAP 0 mg/l, perlakuan 2,4D 0 mg/l + BAP 0,1 mg/l, perlakuan 2,4D 2 mg/l + BAP 0 mg/l dan perlakuan 2,4D 2 mg/l + BAP 0,1 mg/l pada minggu ke-4 dan minggu ke-5. Diikuti dengan perlakuan 2,4D 4 mg/l + BAP 0 mg/l, perlakuan 2,4D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l, perlakuan 2,4D 4 mg/l + BAP 0,5 mg/l pada minggu ke 6,7 dan 8 (Gambar 2). Eksplan yang menggunakan ZPT 2,4 D tinggi menjadi *browning* Menurut Trigiano and Gray (2000), 2,4-D tergolong auksin eksogen

kuat yang dapat bersifat racun karena dapat menstimulasi produksi gas ethylene. Selain itu, eksplan mengalami pencoklatan atau *browning* diakibatkan oleh kandungan senyawa fenol yang tinggi yang teroksidasi.

Dwiyani (2012) menyatakan bahwa seringkali pencoklatan atau *browning* dengan intensitas yang tinggi pada eksplan karena kandungan fenolik yang relatif tinggi pula pada jaringan tanaman sehingga memicu pencoklatan.. Awalnya pencoklatan terjadi dari pucuk dan kemudian merambat ke seluruh bagian ekplan. Pencoklatan mengakibatkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan menjadi terhambat. Menurut Dwiyani (2012) permasalahan yang spesifik dimiliki dengan riset *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis* di laboratorium yaitu seringkali terjadi pencoklatan (*browning*) dengan intensitas yang tinggi pada eksplan karena kandungan fenolik yang relatif tinggi pada jaringan tanaman sehingga memicu terjadinya pencoklatan tersebut.

Pada penelitian ini *browning* terjadi hampir di setiap perlakuan kecuali pada perlakuan 2,4 D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l. Keberhasilan penanaman anggrek *Vanda tricolor* yang tidak mengalami *browning* pada eksplan tunas anggrek, tidak lepas dari peran arang aktif yang diberikan pada setiap perlakuan, dimana arang aktif dapat mengurangi pencoklatan medium akibat pemanasan tinggi setelah sterilisasi (Madhusudhanan dan Rohiman, 2000) Arang aktif juga dapat menyerap senyawa fenol yang keluar dari jaringan tanaman yang terluka pada saat inisiasi (Fridborg dan Erikson, 1975).

4. Persentase Vitrifikasi

Persentase eksplan yang mengalami vitrifikasi dapat dilihat pada Tabel 1. Vitrifikasi yang terjadi pada penelitian ini rendah yaitu 11,11-33,33%. Vitrifikasi yang terjadi umumnya berhubungan dengan eksplan yang mengalami pencoklatan atau *browning*. Eksplan yang mengalami *browning* akan mengalami vitrifikasi. Umumnya vitrifikasi terjadi pada 2-4 minggu setelah eksplan mengalami *browning*. Eksplan yang mengalami vitrifikasi tidak sepenuhnya diawali dengan *browning* pada eksplan. Sebagian kecil eksplan mengalami vitrifikasi secara langsung dimana eksplan yang berwarna hijau akan berubah menjadi putih transparan. Seperti halnya vitrifikasi terjadi pada eksplan yang mengalami *browning*, vitrifikasi yang terjadi secara langsung juga disebabkan oleh kandungan air yang cukup tinggi pada medium. Kandungan fenolik yang tinggi menyebabkan terjadinya *browning* pada eksplan mengakibatkan menurunnya kemampuan eksplan dalam pertumbuhan dan potensial air yang terkandung dalam medium menyebabkan terjadinya vitrifikasi yang ditandai dengan perubahan warna pada eksplan menjadi kebeningan. Persentase eksplan vitrifikasi paling tinggi pada perlakuan 2,4D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l dan perlakuan 2,4D 4 mg/l + BAP 0,5 mg/l (Gambar 2) dengan persentase eksplan vitrifikasi 33,33%.

B. Pertumbuhan pada Tunas Anggrek *Vanda tricolor*

Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi 2,4D dan konsentrasi BAP tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap semua parameter. Pertumbuhan tunas Anggrek *Vanda tricolor* sangat dipengaruhi oleh

parameter pertambahan tinggi tanaman, pertambahan jumlah daun dan jumlah akar untuk dapat mengetahui seberapa besar respon eksplan terhadap perlakuan ZPT yang diberikan. Hasil sidik ragam terhadap parameter pertumbuhan tinggi tanaman, jumlah daun dan jumlah akar tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh 2,4D dan Konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan Tunas Anggrek *Vanda tricolor* (8 MST).

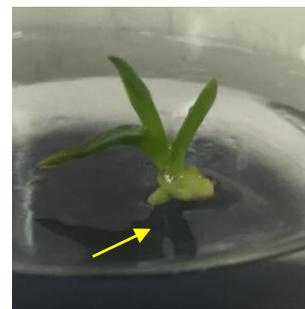
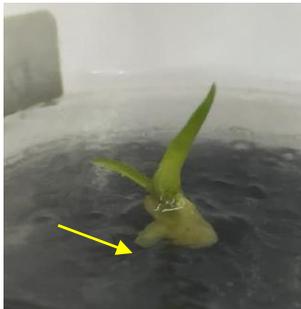
Perlakuan	Pertambahan Tinggi Tanaman (cm)	Pertambahan Jumlah Daun (helai)	Jumlah Akar
Konsentrasi 2,4D			
0 mg/l	0,21a	2,25a	0,22a
2 mg/l	0,25a	2,37a	0,44a
4 mg/l	0,22a	2,29a	0,25a
Konsentrasi BAP			
0 mg/l	0,25a	2,40a	0,40 a
0,1 mg/l	0,19a	2,18a	0,22a
0,5 mg/l	0,24a	2,33a	0,29a
Interaksi	(-)	(-)	(-)

Keterangan :

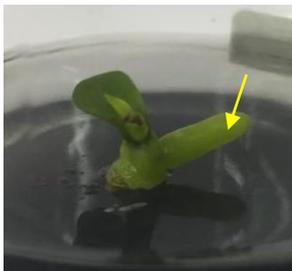
- Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak beda nyata pada uji F $\alpha = 5\%$.
- (-) menunjukkan tidak ada interaksi antar perlakuan.

Menurut Gardner *et al.* (1991), pertumbuhan maupun perkembangan suatu organisme akan tergantung pada tersedianya meristem, hormon, hasil asimilasi dan substansi lain, serta lingkungan yang mendukung. Pertumbuhan adalah pertambahan ukuran yang ditandai dengan pertambahan jumlah sel, bobot, volume, banyaknya protoplasma dan tingkat kerumitan. Perkembangan merupakan pertumbuhan serta spesialisasi sel atau diferensiasi menjadi jaringan, organ dan organisme (Salisbury dan Ross, 1993). Gambar

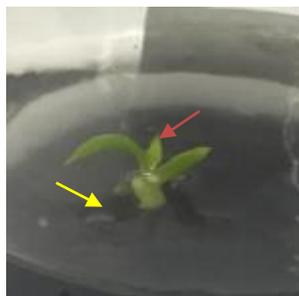
pertumbuhan Tinggi Tanaman, Jumlah Daun dan Jumlah Akar Anggrek *Vanda tricolor* disajikan pada Gambar 2.



0 mg/l 2,4-D+ 0 mg/l BAP 0 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BAP 0 mg/l 2,4-D+0,5 mg/l BAP



2 mg/l 2,4-D+ 0 mg/l BAP 2 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BAP 2 mg/l 2,4-D+0,5 mg/l BAP



4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BAP 4 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP

Keterangan:

→ : Menunjukkan kemunculan daun

→ : Menunjukkan kemunculan akar

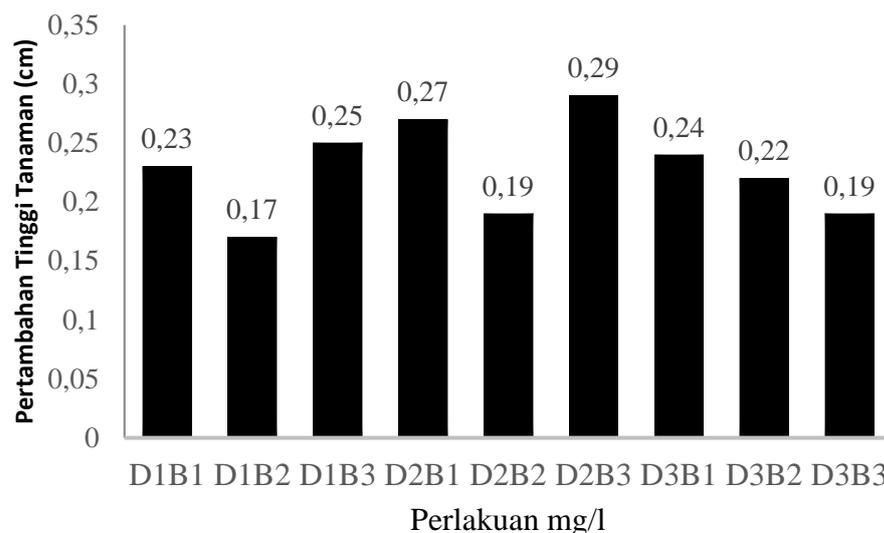
Gambar 3. Pertumbuhan Tunas Anggrek *Vanda tricolor* umur 8 minggu setelah tanam pada semua perlakuan

1. Pertambahan Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang bertujuan untuk mengetahui respon dari perlakuan terhadap eksplan tunas *Vanda*

tricolor. Sitompul dan Guritno (1995) menyatakan bahwa tinggi tanaman merupakan ukuran tanaman yang sering diamati baik sebagai indikator pertumbuhan maupun sebagai parameter yang digunakan untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan.

Hasil sidik ragam parameter tinggi tanaman tunas Anggrek *Vanda tricolor* (Lampiran 5a) menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara konsentrasi 2,4D dengan BAP terhadap tinggi tanaman tunas sampai dengan minggu ke-8 dan tidak ada beda nyata antar perlakuan 2,4D maupun BAP. Grafik tinggi tanaman disajikan pada Gambar 4.



Keterangan :

D1 : 2,4D 0 mg/l

D2 : 2,4D 2 mg/l

D3 : 2,4D 4 mg/l

B1 : BAP 0 mg/l

B2 : BAP 0,1 mg/l

B3 : BAP 0,5 mg/l

Gambar 4. Pengaruh 2,4 D dan BAP terhadap tinggi tanaman pada tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 MST

Faktor lain selain browning dan vitrifikasi yang menyebabkan tidak terjadinya perkembangan adalah respon dari tanaman *Vanda tricolor* yang lambat sehingga tidak terjadi perkembangan yang signifikan (Rineksane dan Sukarjan,

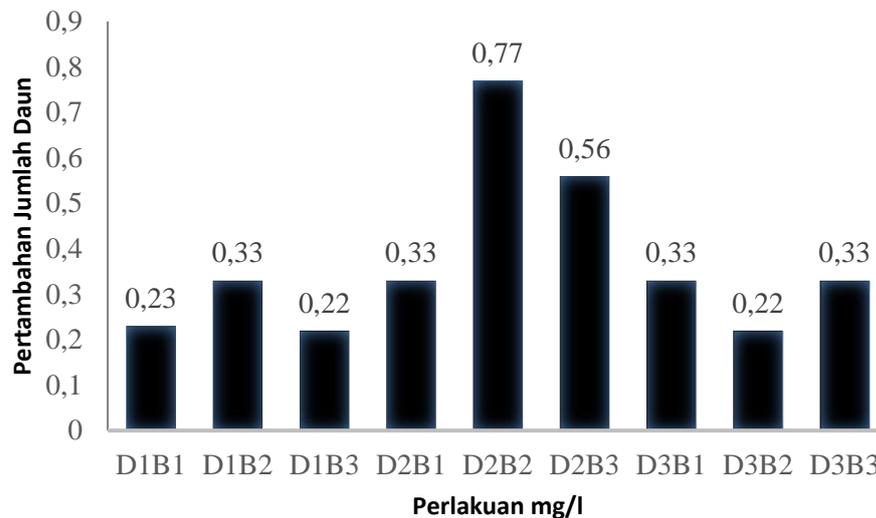
2015). Tinggi tanaman yang tertinggi pada perlakuan 2,4D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l kemudian tinggi tanaman terendah pada perlakuan 2,4D 0 mg/l + BAP 0,1 mg/l. Hal ini dikarenakan BAP yang merupakan hormon sitokinin lebih kepada memacu pembelahan sel dan belum menyebabkan penambahan tinggi. Selain itu, terjadinya *browning* pada eksplan, sehingga mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan eksplan terutama pada tinggi tanaman. Sedangkan terkait ZPT yang ditambahkan yaitu 2,4D dan BAP dengan konsentrasi berbeda-beda pada tiap perlakuan, maka diduga pemberian ZPT tidak memberikan respon yang berbeda pula. Hal ini ditunjukkan pada Tabel 2 yang memberikan hasil bahwa tidak ada pengaruh beda nyata terhadap tinggi tanaman. Dimungkinkan adanya hormon endogen atau internal yang masih berperan dalam metabolisme tunas Anggrek *Vanda tricolor*.

2. Pertambahan Jumlah Daun

Hasil sidik ragam terhadap parameter jumlah daun Anggrek *Vanda tricolor* (Lampiran 5b), menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antar perlakuan dan tidak ada beda nyata antar perlakuan 2,4D maupun BAP. Hal tersebut menunjukkan perlakuan berbagai konsentrasi 2,4D dan BAP tidak memberikan pengaruh terhadap pertambahan jumlah daun pada minggu ke-8. Hal ini dapat disebabkan oleh persamaan respon pada pertumbuhan daun pada setiap ulangan.

Dari gambar 5, daun muncul pada semua kombinasi perlakuan, jumlah daun dipengaruhi oleh adanya penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) ke dalam media. Jumlah daun cenderung tertinggi diperoleh pada perlakuan 2,4D 2 mg/l + BAP 0,1 mg/l dan jumlah daun cenderung terkecil diperoleh pada perlakuan 2,4D

0 mg/l+ BAP 0,5 mg/ dan 2,4D 4 mg/l+BAP 0,1 mg/ (Gambar 1). Wetherell (1982) menyebutkan bahwa perbandingan sitokinin-auksin yang tinggi, baik untuk pembentukan daun. Grafik jumlah daun disajikan pada Gambar 5.



Keterangan :

D1 : 2,4D 0 mg/l

D2 : 2,4D 2 mg/l

D3 : 2,4D 4 mg/l

B1 : BAP 0 mg/l

B2 : BAP 0,1 mg/l

B3 : BAP 0,5 mg/l

Gambar 5. Pengaruh 2,4 D dan BAP terhadap jumlah daun pada tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 MST

Hasil penelitian ini, jumlah daun yang muncul pada eksplan di setiap kombinasi perlakuan bervariasi. Jumlah daun yang bervariasi ini diduga karena adanya hormon endogen yang kadar pada tiap eksplannya tidak sama persis sehingga respon terhadap penambahan zat pengatur tumbuh menjadi bervariasi. Menurut Paramartha (2012) dengan penambahan auksin atau sitokinin dengan konsentrasi tinggi memiliki efek menghambat pertumbuhan jaringan yang dapat disebabkan karena persaingan dengan auksin atau sitokinin endogen untuk mendapatkan tempat sebagai penerima sinyal membran sel sehingga penambahan

konsentrasi auksin atau sitokinin dari luar berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan pada sel.

Daun yang terbentuk pada eksplan yang telah berakar juga relatif tinggi dengan penampakan visual dan ukuran normal. Akar muncul pada penambahan 2,4 D 2 mg/l. Akar dapat menyerap nutrisi yang ada di alam medium kultur maka dari itu digunakan untuk proses pertumbuhan tanaman termasuk pembentukan daun. Akar dapat mensintesis sitokinin sehingga kandungan sitokinin endogen meningkat. Peningkatan level sitokinin endogen dapat meningkatkan jumlah daun yang terbentuk. Wetherell (1984) menyebutkan bahwa pembentukan dan perkembangan daun yang normal tergantung dari sitokinin yang biasanya disintesa di dalam akar dan diangkut ke pucuk tanaman. Salisbury dan Ross (1995) berhasil membuktikan bahwa sitokinin dari akar mampu memacu pertumbuhan pada daun.

3. Warna Daun

Berdasarkan data pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa warna daun merata di setiap perlakuan. Pada minggu pertama daun mula-mula berwarna Hijau agak kekuning-kuningan dan hingga minggu ke delapan warna daun berubah menjadi Hijau muda. Hal ini bisa terjadi karena di dalam media tidak ada interaksi antara auksin dan sitokinin. Tidak terdapat perbedaan warna daun dengan penambahan BAP yang meningkatkan warna hijau. Tidak terjadinya peningkatan warna hijau ini diduga karena penambahan 2,4 D, pada penelitian ini konsentrasi 2,4 D yang digunakan lebih tinggi dibandingkan konsentrasi BAP, adanya auksin endogen maka sistem kerja BAP dalam pembentukan klorofil menjadi terhambat. Sesuai

dengan pernyataan George dan Sherrington (1984) bahwa Sitokinin dapat mendukung pembentukan klorofil sedangkan auksin bekerja untuk menghambatnya dan bekerja sebaliknya.

Tabel 3. Pengaruh 2,4 D dan BAP terhadap Warna Daun Tunas Anggrek *Vanda tricolor* Minggu-1 dan minggu-8.

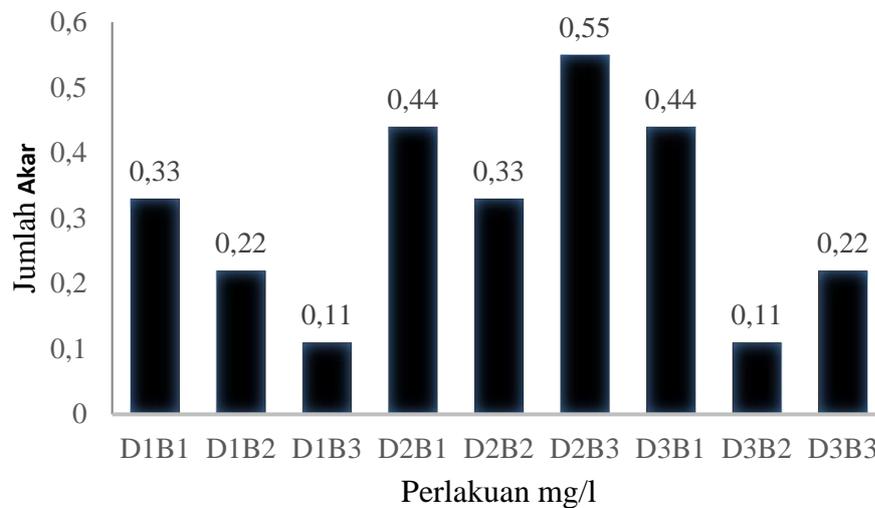
Perlakuan	Skoring		Skoring	
	Warna Daun Minggu-1	Warna Daun Minggu 1	Warna Daun Minggu 8	Warna Daun Minggu 8
2,4 D 0 mg/l + BAP 0 mg/l	5 G/Y 6/8	+++	5 G/Y 6/8	++++
2,4 D 0 mg/l + BAP 0,1 mg/l	5 G/Y 6/6	+++	5 G/Y 6/6	++++
2,4 D 0 mg/l + BAP 0,5 mg/l	5 G/Y 6/8	+++	5 G/Y 6/8	++++
2,4 D 2 mg/l + BAP 0 mg/l	5 G/Y 6/8	+++	5 G/Y 6/8	++++
2,4 D 2 mg/l + BAP 0,1 mg/l	5 G/Y 5/6	+++	5 G/Y 5/6	++++
2,4 D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l	5 G/Y 5/8	+++	5 G/Y 5/8	++++
2,4 D 4 mg/l + BAP 0 mg/l	5 G/Y 6/6	+++	5 G/Y 6/6	++++
2,4 D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l	5 G/Y 6/6	+++	5 G/Y 6/8	++++
2,4 D 4 mg/l + BAP 0,5 mg/l	5 G/Y 6/6	+++	5 G/Y 6/6	++++

Keterangan :

G = Green Kategori Kesegaran Eksplan :
 Y = Yellow +++++ = Hijau Tua +++ = Hijau kekuningan
 +++++ = Hijau Muda + = Hijau keputih-putihan

4. Jumlah Akar

Hasil sidik ragam pada parameter akar tunas Anggrek *Vanda tricolor* (Lampiran 5c) menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara konsentrasi 2,4D dan BAP terhadap rata rata jumlah akar pada minggu ke-8. Tidak adanya beda nyata pada parameter jumlah akar dapat disebabkan karena waktu yang dibutuhkan dalam perbanyakan dengan menggunakan kultur *in vitro* pada Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* memang cukup lambat dalam pertumbuhannya (Rineksane dan Sukarjan 2015). Grafik pertumbuhan jumlah akar pada tunas Anggrek *Vanda tricolor* disajikan pada gambar 6.



Keterangan :

D1 : 2,4D 0 mg/l D2 : 2,4D 2 mg/l D3 : 2,4D 4 mg/l

B1 : BAP 0 mg/l B2 : BAP 0,1 mg/l B3 : BAP 0,5 mg/l

Gambar 6. Pengaruh 2,4 D dan BAP terhadap jumlah akar pada tunas Anggrek *Vanda tricolor*

Jumlah akar menunjukkan kemampuan dalam melakukan penyerapan unsur hara (Schuurman dan Goedewaagen, 1971). Tanaman dengan jumlah akar yang banyak akan meningkatkan penyerapan unsur hara dan air yang dapat mendukung pertumbuhan dari tanaman pula. Pada penambahan BAP dalam berbagai konsentrasi tidak mampu memunculkan akar yang banyak. Hal ini dapat diduga pemberian BAP pada media kultur lebih banyak digunakan untuk multiplikasi tunas daripada untuk pembentukan akar. Hal ini sama dengan penelitian Marlin (2005) pada eksplan jahe, untuk penambahan BAP dalam konsentrasi yang lebih tinggi pada media menyebabkan terhambatnya pembentukan akar. Intensitas cahaya yang rendah dapat merangsang ZPT endogen untuk bekerja lebih aktif dalam melakukan proses pertumbuhan dan perkembangan akar. Menurut Martin-Urdiroz *et al.* (2004) kondisi terang berpengaruh nyata terhadap perbaikan kemampuan regenerasi planlet.

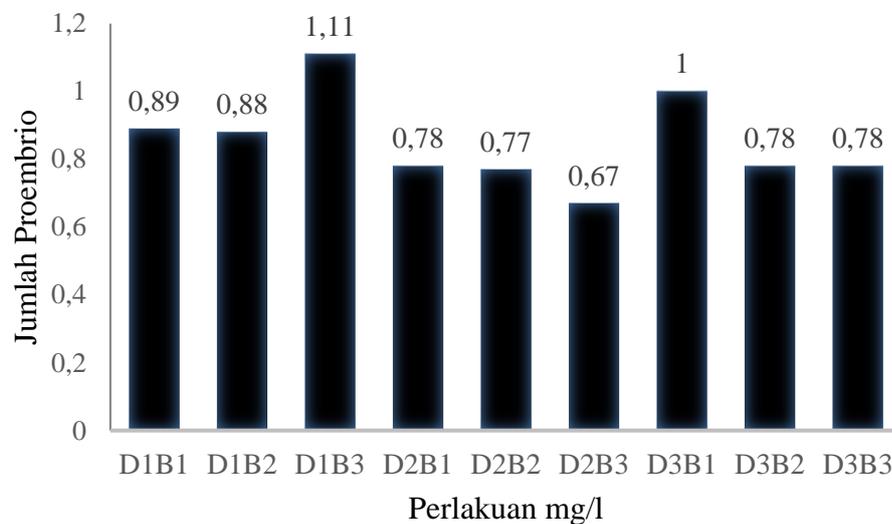
Pada penelitian ini jumlah akar terbanyak diperoleh pada penambahan 2,4D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l (Gambar 4), sel-sel yang berada di dalam eksplan diduga memiliki kemampuan untuk memproduksi auksin sendiri sehingga mampu mendorong metabolisme sel. Namun demikian eksplan mengalami penurunan pembentukan akar pada perlakuan 2,4 D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l dan 2,4 D 4 mg/l + BAP 0,5 mg/l. Hasil tersebut dikarenakan konsentrasi ZPT yang tinggi dapat menekan pertumbuhan tunas. Hal ini disebabkan adanya peningkatan tekanan osmotik dalam media, sehingga penyerapan nutrisi secara berlebihan oleh tanaman dapat mengakibatkan gangguan proses metabolisme. Tekanan osmotik ini menyebabkan hilangnya energi akibat terlarutnya ZPT pada media tumbuh, sehingga pertumbuhan dan perkembangannya menjadi terhambat (Garvita dan Handini, 2011). Pada penelitian ini konsentrasi 2,4 D yang digunakan lebih tinggi dari BAP karena tujuan penelitian ini adalah pembentukan embrio somatik.

C. Pertumbuhan Pro-embrio dan Kalus Anggrek *Vanda tricolor*

1. Jumlah Pro-embrio

Jumlah pro-embrio merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan sejauh mana eksplan merespon perlakuan yang diberikan. Jumlah pro-embrio ini sangat penting diamati karena semakin banyak pro-embrio yang terbentuk maka akan berpeluang mendapatkan calon tunas, calon akar maupun calon embrio. Parameter ini diamati pada setiap minggunya selama 8 minggu (Gambar 9). Berdasarkan hasil analisis, menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi 2,4D dan konsentrasi BAP tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap semua parameter.

Hal ini diduga tunas anggrek *Vanda tricolor* belum merespon zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang ada pada medium. Hal tersebut dikarenakan waktu inkubasi yang pendek (8 minggu) untuk menginduksi tunas. Sejalan dengan penelitian Latip *et al.*, (2010) menyebutkan proliferasi protocorm anggrek *Phalaenopsis gigantea* asal kultur *in vitro* memerlukan waktu 40 – 80 hari (6 – 12 minggu). Grafik jumlah pro-embrio disajikan pada Gambar 7.



Keterangan :

D1 : 2,4D 0 mg/l

D2 : 2,4D 2 mg/l

D3 : 2,4D 4 mg/l

B1 : BAP 0 mg/l

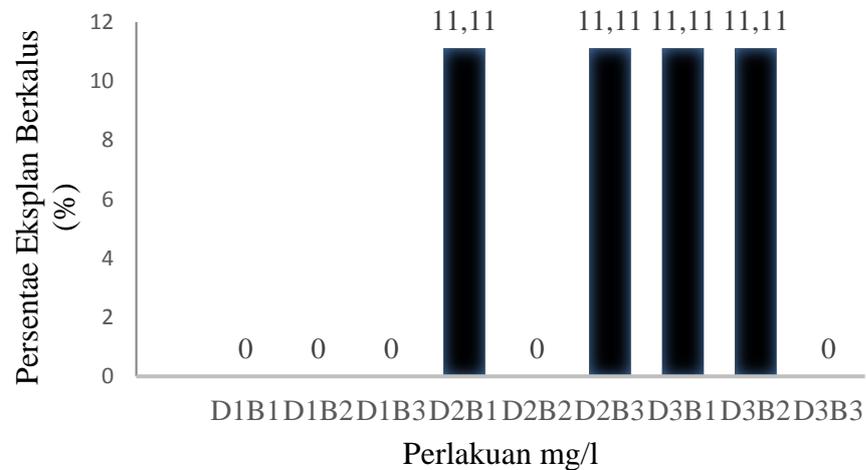
B2 : BAP 0,1 mg/l

B3 : BAP 0,5 mg/l

Gambar 7. Pengaruh 2,4 D dan BAP terhadap jumlah pro-embrio pada tunas Anggrek *Vanda tricolor*

2. Persentase Eksplan Berkalus

Perhitungan parameter eksplan berkalus dilakukan dengan melihat pertambahan kalus baru pada eksplan kemudian dibagi dengan jumlah ulangan dan dikalikan 100%. Grafik parameter eksplan berkalus pada akhir pengamatan (8 MST) disajikan pada Gambar 8.



Keterangan :

D1 : 2,4D 0 mg/l

D2 : 2,4D 2 mg/l

D3 : 2,4D 4 mg/l

B1 : BAP 0 mg/l

B2 : BAP 0,1 mg/l

B3 : BAP 0,5 mg/l

Gambar 8. Pengaruh 2,4D dan BAP terhadap Persentase Eksplan Berkalus pada tunas Angrek *Vanda tricolor* pada (8 MST) .

Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid (Bekti dkk., 2003). Selain *browning*, faktor lain yang menyebabkan tidak terjadinya perkembangan pada kalus adalah respon dari tanaman *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang sangat lambat sehingga tidak terjadi perkembangan yang signifikan bahkan beberapa perlakuan hanya menunjukkan respon pembengkakan saja dan belum menunjukkan perkembangan kalus.

Menurut Dwiyani (2013) salah satu permasalahan dalam budidaya anggrek genus *Vanda*, adalah masa vegetatif yang panjang, sehingga memerlukan waktu yang relatif lama dalam proses pembungaan (*flowering*). *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* ini membutuhkan waktu kurang lebih 5 tahun setelah disemai untuk

menghasilkan bunga pertama kali. Begitu pula dengan perbanyakan menggunakan kultur *in vitro* dimana pertumbuhan *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* cukup lambat dalam pertumbuhan atau pembentukan kalus maupun tunas. Kecepatan respon terhadap perlakuan yang diberikan pada eksplan *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* cenderung lebih lama dibandingkan kecepatan *browning*. Kecepatan *browning* yang lebih tinggi mengakibatkan eksplan tidak mengalami pembentukan kalus yang disebabkan oleh terhambatnya proses penyerapan unsur hara sehingga perlakuan yang diberikan belum dapat direspon oleh eksplan. Menurut Rineksane dan Sukarjan (2015) waktu yang dibutuhkan dalam perbanyakan dengan kultur *in vitro* pada *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* cukup lambat, baik dalam pertumbuhannya maupun pembentukan kalus dan tunas.

Pada penelitian ini pembentukan kalus pada perlakuan 2,4 D 2 mg/l + BAP 0 mg/l, perlakuan 2,4 D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l, perlakuan 2,4 D 4 mg/l + BAP 0 mg/l dan perlakuan 2,4 D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l menunjukkan bahwa 2,4 D sebagai auksin sesuai yaitu merangsang pembesaran dan perpanjangan sel. 2,4 D dengan konsentrasi 1-6 mg/l efektif dalam menginduksi pembentukan kalus tanaman tebu, Sukamadja dan Mulyana (2011).

3. Tekstur Kalus

Pengamatan tekstur kalus dilakukan pada akhir pengamatan (8 MST) dengan mengamati tekstur kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan. Tekstur kalus yang muncul pada eksplan dikelompokkan menjadi 2 yaitu *friable* (remah) dan *nonfriable* atau kompak (Tabel 5). Pada Tabel 5 terlihat bahwa semua kalus yang dihasilkan yaitu *nonfriable* atau kompak dan tidak semua perlakuan

menghasilkan kalus. Kalus yang kompak mempunyai tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat. Kalus yang non embriogenik berwarna kuning kecokelatan, agak pucat, dan lembek berair sehingga sulit dipisahkan (Peterson dan Smith, 1991). Dalam hal ini, kalus yang berstruktur kompak diindikasikan sebagai kalus yang tidak embriogenik atau *non friable*.

Tabel 4. Pengaruh perlakuan 2,4D dan BAP terhadap tekstur kalus pada tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada (8 MST).

Perlakuan	Tekstur Kalus
2,4 D 0 mg/l + BAP 0 mg/l	Tidak muncul
2,4 D 0 mg/l + BAP 0,1 mg/l	Tidak muncul
2,4 D 0 mg/l + BAP 0,5 mg/l	Tidak muncul
2,4 D 2 mg/l + BAP 0 mg/l	Kompak
2,4 D 2 mg/l + BAP 0,1 mg/l	Tidak muncul
2,4 D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l	Kompak
2,4 D 4 mg/l + BAP 0 mg/l	Kompak
2,4 D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l	Kompak
2,4 D 4 mg/l + BAP 0,5 mg/l	Tidak muncul

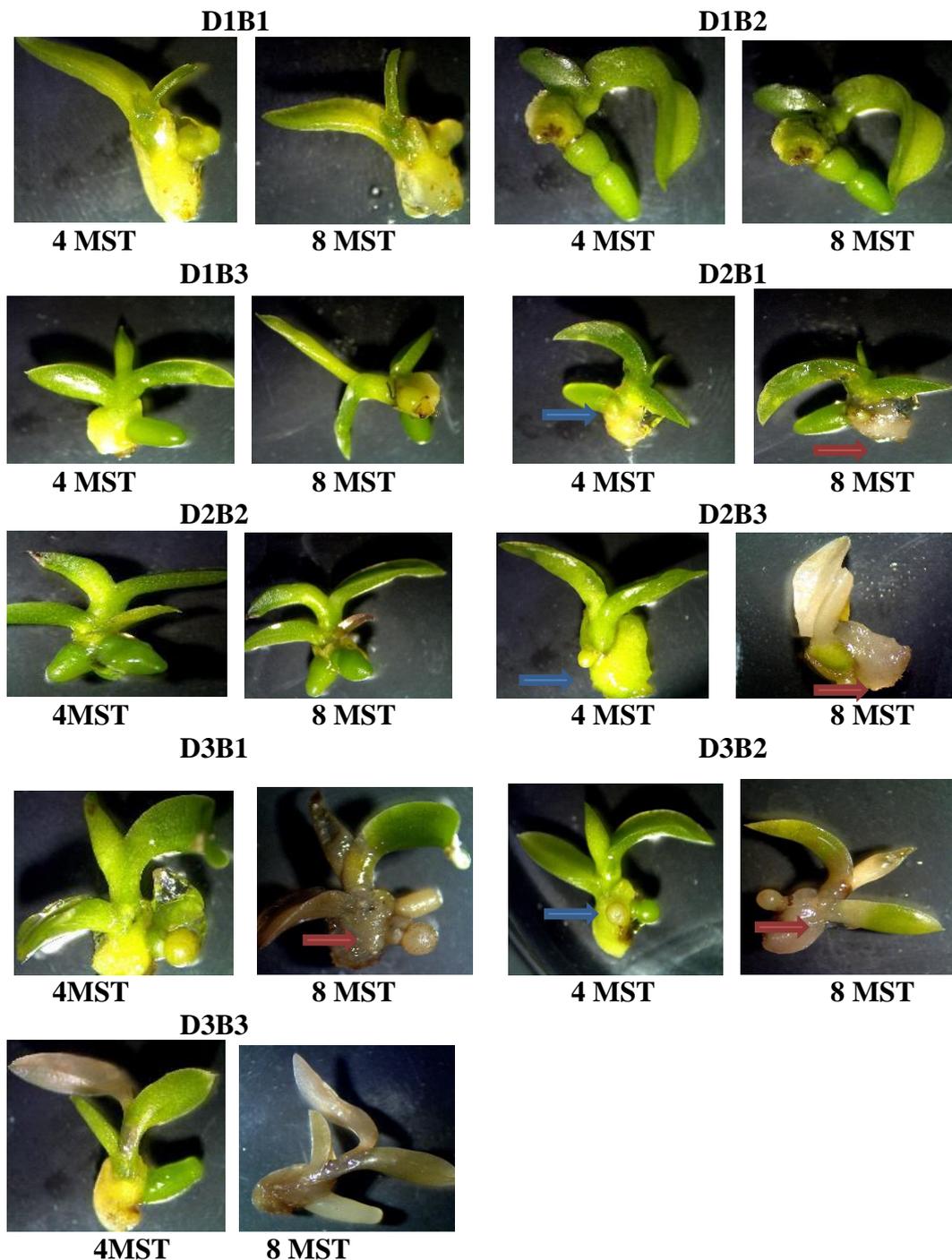
Dari tabel 5, pengamatan minggu ke-8 kalus hanya dihasilkan pada beberapa perlakuan saja. Pada perlakuan 2,4 D 2 mg/l + BAP 0 mg/l, perlakuan 2,4 D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l, perlakuan 2,4 D 4 mg/l + BAP 0 mg/l dan perlakuan 2,4 D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l menghasilkan kalus yang kompak. Menurut Wattimena (1992), Zat pengatur tumbuh golongan auksin berperan dalam pembentukan kalus, morfogenesis akar dan tunas serta embriogenesis. Menurut Sellars *et al.* (1990) auksin dengan daya aktivitas yang kuat antara lain 2,4 D, NAA atau dapat dikombinasikan dengan sitokinin dengan konsentrasi yang rendah, biasanya digunakan untuk induksi kalus embriogenik.

Menurut Doods and Roberts (1984) pertumbuhan kalus embriogenik membutuhkan zat pengatur tumbuh auksin berkonsentrasi tinggi serta konsentrasi

sitokinin rendah. Auksin yang dibutuhkan pada tanaman monokotil antara 2 -5ppm (Yuanti, 2004). Pada kalus embriogenik tanaman temulawak tidak dipengaruhi oleh konsentrasi BAP, yang mana temulawak merupakan tanaman monokotil. Sesuai yang dikemukakan (George, 1993) induksi kalus tanaman monokotil fungsi sitokinin tidak terlalu diperhatikan.

4. Pengamatan Mikroskop

Pengamatan mikroskop bertujuan untuk mengetahui perkembangan eksplan yang membentuk kalus dan fase embrio secara detail menggunakan mikroskop. Dengan menggunakan mikroskop eksplan tunas Anggrek *Vanda tricolor* diharapkan akan terlihat pembentukan fase globular, heart, torpedo, dan kotiledon. Pengamatan mikroskop ini dilakukan pada 4 MST dan 8 MST. Pengamatan mikroskop dilihat pada perbesaran 0,7 dan perbesaran 0,8. Parameter pengamatan mikroskop pada 4 MST dan 8 MST disajikan pada Gambar 9.



Keterangan :

D1 : 2,4D 0 mg/l

D2 : 2,4D 2 mg/l

D3 : 2,4D 4 mg/l

B1 : BAP 0 mg/l

B2 : BAP 0,1 mg/l

B3 : BAP 0,5 mg/l

➡ : Pro-embrio

➡ : Kalus yang terbentuk bersifat Kompak

MST : Minggu Setelah Tanam

Gambar 9. Perkembangan Eksplan *Vanda tricolor* berdasarkan Pengamatan Mikroskop pada umur 4 MST dan 8 MST

Pada pengamatan mikroskop minggu ke-4 belum terlihat adanya kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan. Pada minggu ke-8 (Gambar 9) di beberapa perlakuan sudah terlihat kalus yang terbentuk. Hal ini sejalan dengan pernyataan Rineksane dan Sukarjan (2015) waktu yang dibutuhkan dalam perbanyakan dengan kultur *in vitro* pada *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* cukup lambat, baik dalam pertumbuhannya maupun pembentukan kalus dan tunas. Oleh karena itu fase embrio belum dapat terlihat secara detail karena waktu inkubasi yang cukup pendek 8 minggu. Pada Gambar 9 menunjukkan kalus yang membentuk kalus bertekstur kompak. Terbentuknya kalus yang bertekstur kompak menurut Andaryani (2010) dapat dipacu karena keberadaan hormon auksin endogen yang dihasilkan oleh eksplan yang tumbuh yang telah membentuk kalus.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Tunas masih memberikan respon pertumbuhan terhadap perlakuan yang diberikan, meskipun dari hasil analisis menunjukkan tidak ada interaksi atau tidak beda nyata pada parameter tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah akar, dan jumlah proembrio. Konsentrasi 2 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l BAP merupakan perlakuan yang memiliki hasil cenderung lebih tinggi dalam tinggi tanaman, konsentrasi 2 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l BAP merupakan perlakuan yang memiliki hasil cenderung lebih tinggi dalam jumlah daun, konsentrasi 2 mg/l 2,4 D + 0 mg/l BAP merupakan perlakuan yang memiliki hasil lebih cenderung tinggi dalam jumlah akar, dan konsentrasi 0 mg/l 2,4 D + 0 mg/l BAP merupakan perlakuan yang memiliki hasil cenderung lebih tinggi dalam jumlah proembrio, konsentrasi 2 mg/l 2,4 D + 0 mg/l BAP, 2 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l

BAP, 4 mg/l 2,4 D + 0 mg/l BAP, 4 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l BAP merupakan perlakuan yang telah muncul kalus.