

IV. PEMBAHASAN

A. Keberhasilan Teknik Kultur *In Vitro*

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

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

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

1. Persentase Eksplan Hidup

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

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

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

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

2. Persentase Eksplan Kontaminasi

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

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

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

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

3. Persentase Eksplan *Browning*

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

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

4. Persentase Eksplan Vitrifikasi

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



transparan. Eksplan terkena vitrifikasi ditunjukkan oleh Gambar 2.

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

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

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

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

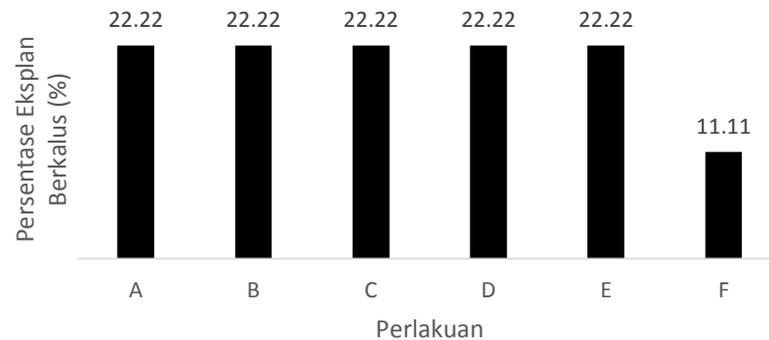
kematian. Potensial air yang terkandung dalam medium dan melemahnya jaringan eksplan menyebabkan terjadinya peristiwa difusi dalam intensitas yang tinggi. Konsentrasi air di bagian luar sel yang lebih tinggi dan terlalu tinggi dibandingkan dengan konsentrasi air pada bagian dalam sel menyebabkan air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

B. Pertumbuhan Kalus

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

1. Persentase Eksplan Berkalus

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



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

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

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

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

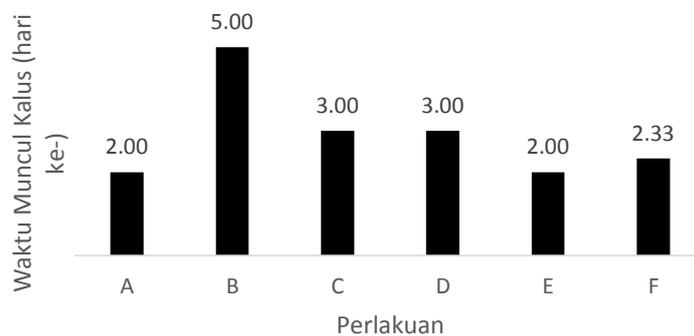
mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ, 4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ memiliki persentase kalus 22,22% hal tersebut diduga kandungan zat pengatur tumbuh 2,4-D dalam medium mampu menginduksi kalus pada eksplan. 2,4-D yang merupakan herbisida yang dalam konsentrasi rendah memiliki aktifitas seperti auksin sehingga mampu merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat. Penggunaan kombinasi antara auksin dengan sitokinin akan meningkatkan proses induksi kalus (Litz dkk., 1995 dalam Kartika dkk., 2013). Sejalan dengan itu Yusnita (2004) dalam 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 (Lampiran II) 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 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ 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 induski kalus yang aktif pada konsentrasi rendah, sedangkan pemberian 2,4-D yang berlebih dapat menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel.

2. Waktu Muncul Kalus

Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam teknik *in vitro* adalah munculnya kalus pada eksplan. Pada penelitian ini pertumbuhan kalus diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian eksplan membentuk gelombang (swelling). Kalus terbentuk karena adanya respon terhadap hormon atau zat pengatur tumbuh. Waktu muncul kalus ditunjukkan oleh Gambar 4.



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

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

Menurut Bekti dkk (2003) penambahan 2,4-D dalam medium kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid. Hal serupa juga disampaikan oleh Pierik (1987), yang menyatakan bahwa 2,4-D dapat menyebabkan elongasi sel, pembengkakan jaringan dan pembentukan kalus. Data Gambar 4 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 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

Salah satu indikator pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* adalah tekstur kalus yang menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Pierik (1987) menyatakan bahwa tipe kalus dapat bervariasi dari kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi medium, zat pengatur tumbuh, dan kondisi lingkungan kultur.

Menurut Turhan (2004) secara visual kalus dibedakan menjadi tiga yaitu kalus bertekstur kompak, intermediet dan remah. Kalus embriogenik mempunyai ciri-ciri tekstur remah, noduler dan berwarna putih atau kekuningan (Yelnititis, 2012). Kalus embriogenik dapat diinduksi menggunakan auksin atau kombinasi dengan sitokinin. Menurut Bertryda dkk (2018), semakin tinggi konsentrasi auksin dan sitokinin yang digunakan

maka semakin friabel kalus yang dihasilkan. Visualisasi kalus ditunjukkan oleh Gambar 5.



Gambar 5. Kalus Kompak pada Eksplan Tunas *Vanda tricolor* dalam Medium NDM Cair

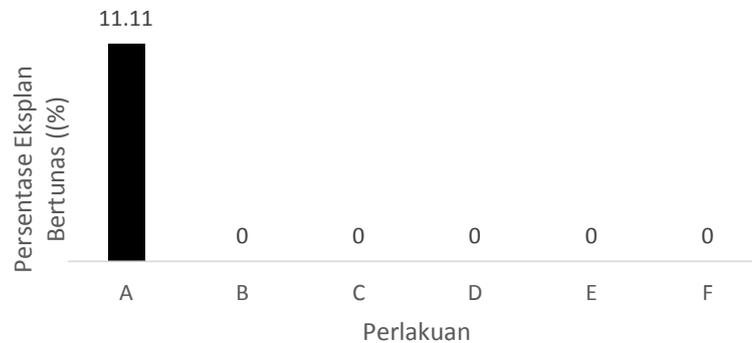
Hasil pengamatan pada Gambar 5 menunjukkan eksplan yang ditanam pada medium NDM pada semua perlakuan menghasilkan kalus yang bertekstur kompak, kalus yang memiliki tekstur kompak artinya kalus tersebut belum embriogenik. Menurut Yelnititis (2012), kalus bertekstur kompak dihasilkan pada tahap induksi kalus, untuk mendapatkan kalus yang remah dan noduler kalus yang diperoleh diperbanyak dengan melakukan subkultur kalus secara berulang yang diharapkan berkembang menjadi kalus embriogenik. Kalus remah dapat dihasilkan melalui subkultur berulang pada perlakuan yang sama atau dikombinasikan dengan perlakuan yang berbeda sehingga membutuhkan waktu yang cukup lama.

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. Persentase eksplan bertunas ditunjukkan pada Gambar 6.



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

Gambar 6. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Persentase Eksplan Berkalus *Vanda tricolor* pada Medium Cair 8 MST

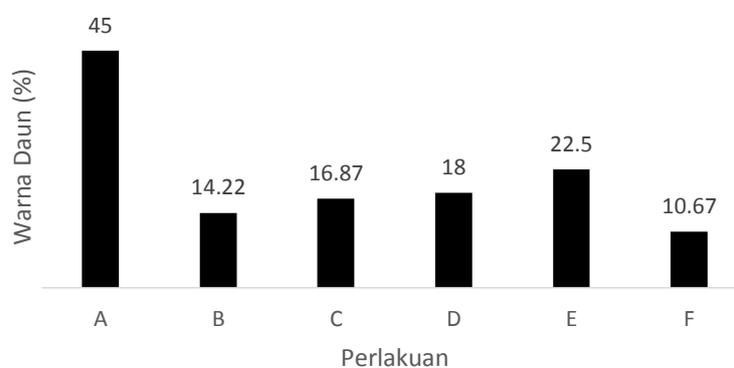
Pada Gambar 6, hasil penelitian menunjukkan eksplan tunas *Vanda tricolor* pada perlakuan Tanpa 2,4-D dan Tanpa TDZ mengalami pertumbuhan secara langsung karena sudah terdapat tunas pada 4 MST. Sitokinin endogen yang terkandung dalam eksplan diduga sudah dapat memacu pembentukan tunas. George dan Sherrington (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 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. Persentase warna daun ditunjukkan pada Gambar 7.



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

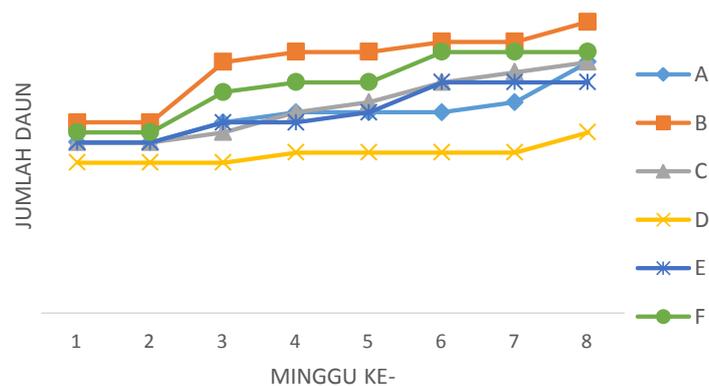
Gambar 7. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Warna Daun Eksplan tunas *Vanda tricolor* pada Medium Cair 8 MST

Berdasarkan hasil skoring, persentase warna daun tertinggi diperoleh pada Tanpa perlakuan 2,4-D + Tanpa TDZ sebesar 45% (Gambar 7), 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). 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 vitrifikasi.

3. Jumlah Daun

Jumlah daun pada pertumbuhan suatu tanaman memegang peranan yang sangat penting, hal ini berkaitan dengan pertumbuhan vegetatif dan kemampuan tanaman untuk melakukan proses fotosintesis dan melakukan berbagai metabolisme lainnya. Pembentukan daun diawali dengan inisiasi primordia daun yang diikuti dengan proses pembelahan sel, pembesaran sel, dan diferensiasi (Wareing dan Philips, 1970). Pertumbuhan daun ditunjukkan pada grafik Gambar 8.



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

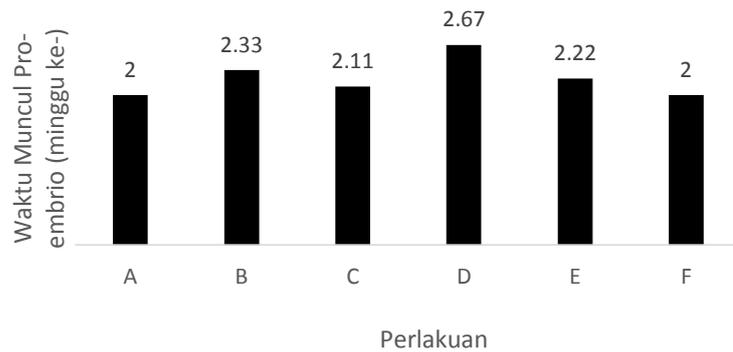
Gambar 8. Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Jumlah Daun Eksplan Tunas *Vanda tricolor* Tiap Minggu pada Medium Cair

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.

D. Pertumbuhan Pro-Embrio

1. Waktu Muncul Pro-Embrio

Waktu muncul pro-embrio merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan sejauh mana eksplan merespon perlakuan yang diberikan. 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 waktu munculnya pro-embrio diamati setiap minggunya selama 8 minggu. Waktu munculnya pro-embrio ditunjukkan oleh Gambar 9.



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

Gambar 9. Histogram Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Waktu Muncul Pro-Embrio Eksplan *Vanda tricolor* Pada Medium Cair 8 MST

Berdasarkan Gambar 9 waktu muncul pro-embrio paling cepat yaitu pada perlakuan 4 mg/l 2,4-D + 0,5mg/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. Menurut Salisbury dan Ross 1995), secara terpisah sitokinin dan auksin memiliki fungsi yang antagonis, namun dalam kenyataannya untuk menghasilkan respon fisiologis tertentu diperlukan interaksi antar keduanya. 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

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 (Tabel 3).

Tabel 3. 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 + 0,5mg/l TDZ	0,2233b

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

Data pada Tabel 3 menunjukkan adanya perbedaan pengaruh antar perlakuan perlakuan terhadap jumlah pro-embrioPerlakuan 0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ merupakan perlakuan terbaik untuk jumlah pro-embrio eksplan, tetap tidak berbeda nyata dengan perlakuan 4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ.

Pemberian 0,5 TDZ berpengaruh terhadap jumlah pro-embrio yang terbentuk. Menurut Arteca (1996), hal tersebut dikarenakan TDZ sebagai

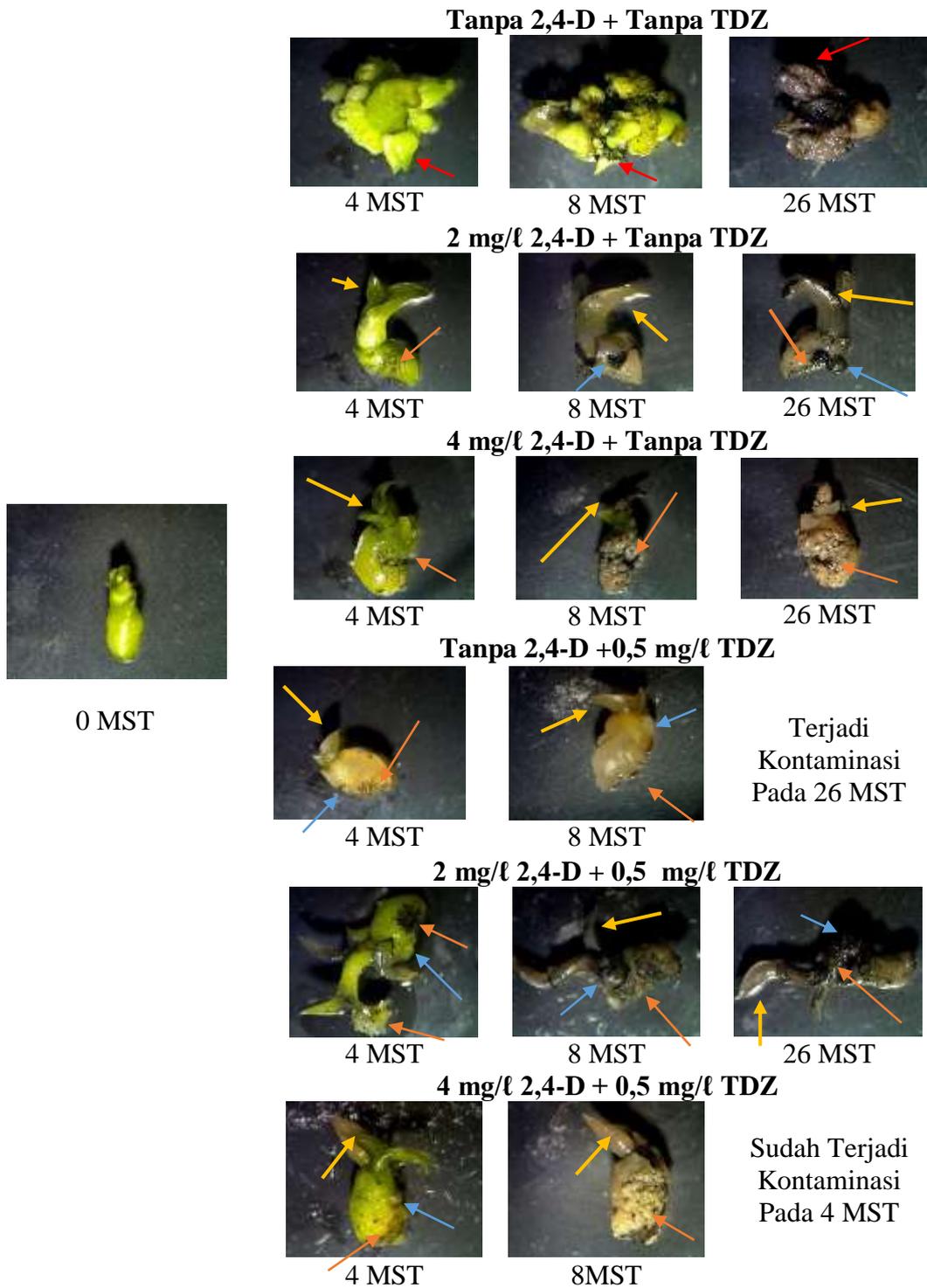
sitokinin berperan dalam proses pembelahan dan pembesaran sel, yang mengarah pada pembentukan organ. TDZ sangat berperan dalam merangsang morfogenesis pada kultur *in vitro* tanaman, dengan beberapa respon seperti mampu menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai macam sumber eksplan, mempersingkat waktu dalam regenerasi kultur, dan meningkatkan jumlah tunas per eksplan (Sculze, 2007). 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.

Selain itu, dalam medium NDM terdapat hara makro, mikro, vitamin dan asam amino yang diperlukan untuk pertumbuhan eksplan. Umur dan ukuran eksplan juga berpengaruh dalam pertumbuhan. Chawla (2003), menyatakan bahwa eksplan yang berasal dari jaringan muda dan sehat lebih responsif dalam kultur *in vitro*, sehingga proses regenerasi sel dapat berlangsung dengan cepat.

3. Perkembangan Kalus dan Fase Embrio

Pengamatan mikroskop bertujuan untuk mengetahui perkembangan eksplan yang membentuk kalus dan fase embrio secara detail menggunakan mikroskop. Pengamatan 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, 8 MST dan 26 MST. Pengamatan mikroskop dilihat

pada perbesaran 0,7, 0,8 dan 0,9 kali. Seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 10.



Keterangan: Merah : Tunas

Biru : Pro-embrio
 Kuning : Daun
 Jingga : Kalus Kompak

Gambar 10. Perkembangan eksplan tunas 4 MST, 8 MST dan 26 MST

Pada pengamatan mikroskop minggu ke-4 (Gambar 10) sudah terlihat adanya kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan walaupun hanya sedikit.

Pada minggu ke-8 di beberapa perlakuan yang ditunjukkan oleh panah jingga pengamatan mikroskop minggu ke-4 (Gambar 10) sudah terlihat adanya kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan walaupun hanya sedikit.

Pada minggu ke 26 pembentukan kalus juga tidak terlalu signifikan. 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 minggu ke-8 perlakuan 0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ tidak melalui fase kalus terlebih dahulu tetapi tunas langsung terbentuk sehingga pertumbuhan eksplan lebih cepat seperti yang ditunjukkan oleh panah hitam Gambar 10. Hal tersebut dikarenakan pada medium NDM cair sudah terdapat unsur makro, mikro dan berbagai vitamin yang dapat menunjang pertumbuhan tanaman. Selain itu, didalam eksplan terdapat hormon endogen berupa auksin. Adanya hormon endogen dengan sitokinin yang rendah diduga menyebabkan tunas dapat terbentuk. Pada Gambar 10 terbentuknya pro-embrio ditunjukkan oleh panah biru. Terbentuknya pro-embrio sangat berpeluang untuk mendapatkan calon tunas, calon akar, maupun calon

embrio. 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 10 hanya bertambah 1 helai daun saja. Pada minggu ke-26 eksplan tunas perlakuan Tanpa 2,4-D +0,5 mg/l TDZ dan 4 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ mengalami kontaminasi.