

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Pertumbuhan eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* di dalam kultur *in vitro* dipengaruhi oleh medium kultur dan zat pengatur tumbuh. Eksplan yang mengalami *browning*, kontaminasi, maupun vitrifikasi akan mengakibatkan penurunan pada keberhasilan kultur *in vitro*. Hasil pengamatan persentase eksplan hidup, *browning*, dan vitrifikasi yang dilakukan selama 8 minggu menunjukkan adanya perbedaan, akan tetapi tidak ada kontaminasi. Hasil pengamatan persentase eksplan hidup, *browning*, dan vitrifikasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Persentase Eksplan Hidup, *Browning*, dan Vitrifikasi Tunas Anggrek *Vanda tricolor* Pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)	Persentase Eksplan <i>Browning</i> (%)	Persentase Eksplan 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

Persentase eksplan hidup menunjukkan kemampuan eksplan untuk bertahan hidup, tumbuh, dan berkembang. Persentase eksplan hidup diamati untuk melihat jumlah eksplan yang dapat bertahan hidup pada medium perlakuan yang diberikan. Persentase eksplan hidup dipengaruhi oleh persentase eksplan *browning*, persentase eksplan terkontaminasi, dan

persentase eksplan vitrifikasi, serta kemampuan eksplan dalam menyerap unsur hara maupun zat pengatur tumbuh pada medium. Persentase eksplan hidup pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Persentase eksplan hidup semua perlakuan antara 36,67 - 70,00% dengan persentase eksplan hidup tertinggi pada perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D. Hal ini diduga penggunaan medium POC dengan penambahan 1 mg/l auksin 2,4-D dapat memacu pembelahan sel terbaik. 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 yang dilakukan sudah tepat.

Browning terjadi akibat adanya kandungan fenolik pada eksplan, sehingga menghambat pertumbuhan dan bahkan dapat menyebabkan terjadinya kematian. Selain *browning*, eksplan juga mengalami vitrifikasi yang terjadi akibat kandungan air yang tinggi pada medium masuk ke dalam eksplan sehingga eksplan berubah warna menjadi putih bening. Eksplan yang mengalami vitrifikasi tidak mampu untuk melakukan *recovery* (pemulihan) dan mengakibatkan kematian pada eksplan.

Eksplan hidup ditandai dengan eksplan berwarna hijau tua, hijau muda, atau hijau kekuningan dan tidak mengalami *browning*, terkontaminasi, dan vitrifikasi. Eksplan yang mengalami *browning* dan vitrifikasi dapat menyebabkan kematian sel yang pada akhirnya persentase eksplan hidup menjadi rendah. Hal ini disebabkan oleh hilangnya kemampuan eksplan dalam penyerapan unsur hara.

Secara umum, persentase eksplan hidup dari 4 perlakuan POC lebih tinggi dibandingkan NDM. POC merupakan sumber alami, mengandung hormon auksin IAA, sitokinin Zeatin dan Kinetin, serta Giberelin GA-3 (Lampiran 4). Sementara NDM murni tidak mengandung hormon apabila tidak ditambahkan, tapi juga dipengaruhi oleh persentase *browning* dan vitrifikasi. Penggunaan auksin 2,4-D mempunyai peranan yang sangat penting dalam menginduksi dan memelihara kelangsungan pembelahan sel (Dudits *et al.*, 1995) dan mengarahkan perkembangan sel membentuk kalus yang embriogenik (Raghavan 2000 dalam Kadir 2007).

2. Persentase Eksplan *Browning*

Browning merupakan suatu perubahan warna eksplan dari hijau menjadi coklat. Pengamatan eksplan *browning* bertujuan untuk mengetahui banyaknya eksplan yang mengalami perubahan warna menjadi coklat. Eksplan dapat dikatakan *browning* apabila perubahan warna eksplan dari hijau menjadi coklat lebih dari 50%. Persentase eksplan *browning* dapat mempengaruhi persentase eksplan hidup. Persentase eksplan *browning* pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Semua perlakuan mengalami *browning*, namun persentase eksplan *browning* pada semua perlakuan tidak melebihi 50%. Persentase eksplan *browning* tertinggi pada penelitian ini sebesar 45,56% terjadi pada perlakuan POC + 3 mg/l 2,4-D. Persentase tersebut menunjukkan bahwa eksplan yang ditanam rata-rata masih bisa mempertahankan hidup, akan tetapi berpengaruh terhadap persentase eksplan hidup.

Browning diduga terjadi akibat adanya senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh eksplan. Beberapa tumbuhan terutama tumbuhan tropis seperti anggrek *Vanda tricolor* memiliki kandungan fenolik dalam konsentrasi tinggi yang akan teroksidasi ketika sel tumbuhan terluka, yang berakibat jaringan tumbuhan akan berwarna coklat atau hitam dan gagal untuk tumbuh (George *et al.*, 2008). Selain itu, beberapa eksplan sudah mengalami gejala *browning* sebelum inokulasi, tetapi tidak semua eksplan dapat melakukan *recovery* dan kembali berwarna hijau. Hal ini terjadi saat proses subkultur eksplan pada medium NDM 0.

Browning juga terjadi karena penggunaan pinset yang panas. Eksplan yang terkena pinset panas akan mengalami luka dan mengeluarkan senyawa fenolik. *Browning* dimulai dengan munculnya warna coklat pada eksplan yang terkena pinset saat inokulasi, hingga akhirnya seluruh bagian eksplan tampak berwarna coklat. Pencoklatan tersebut sering membuat pertumbuhan dan perkembangan eksplan terhambat. Diperkuat oleh pernyataan Hutami (2008), pencoklatan merupakan peristiwa alamiah yang bisa terjadi pada sistem biologi, yaitu proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat pengaruh fisik dan biokimia. Gejala pencoklatan pada kultur apabila dibiarkan terlalu lama maka dapat menyebabkan kematian eksplan.

Beberapa upaya yang telah dilakukan untuk mengurangi resiko *browning* pada eksplan yaitu pada tahap sterilisasi eksplan dicelupkan dengan larutan Iodin, sehingga mampu mengurangi resiko terjadinya masalah *browning* pada saat pertumbuhan eksplan selama dalam botol kultur. Selain itu, peran arang aktif yang diberikan pada setiap medium perlakuan dapat mengadsorpsi

persenyawaan-persenyawaan beracun yang terdapat dalam medium yang dapat menghambat pertumbuhan, terutama persenyawaan-persenyawaan fenolik dari jaringan yang terluka waktu inisiasi (Prasetyo, 2017).

Dwiyani dkk. (2012) menyatakan bahwa seringkali pencoklatan atau *browning* dengan intensitas yang tinggi pada eksplan karena kandungan fenolik pada jaringan tanaman juga relatif tinggi dan memicu pencoklatan. Eksplan yang telah *browning* tidak mampu berkembang, sehingga kandungan air yang tinggi pada medium masuk ke dalam eksplan dan mengakibatkan terjadinya vitrifikasi.

3. Persentase Eksplan Terkontaminasi

Pengamatan eksplan terkontaminasi bertujuan untuk mengetahui banyaknya eksplan yang mengalami kontaminasi akibat jamur dan bakteri. Kontaminasi dalam kultur *in vitro* adalah tumbuhnya mikroba yang tidak dikehendaki (kontaminan) pada medium maupun eksplan selama inkubasi. Kontaminasi dapat terjadi disebabkan oleh beberapa faktor antara lain metode sterilisasi, eksplan, dan alat.

Semua perlakuan yang diujikan tidak mengalami kontaminasi. Hal ini karena eksplan yang digunakan adalah eksplan yang telah steril. Sterilisasi medium dan alat yang digunakan juga sudah tepat. Selain itu, sebelum inokulasi eksplan yang digunakan disterilisasi menggunakan larutan Iodin, sehingga kontaminasi tidak terjadi.

Medium juga ditambah *Plant Preservative Mixture* (PPM) untuk membantu menghambat pertumbuhan patogen dan mencegah terjadinya kontaminasi. Menurut Probawati (2011) *Plant Preservative Mixture* (PPM)

merupakan antibiotika sintetik yang memiliki spektrum luas, sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif.

4. Persentase Eksplan Vitrifikasi

Vitrifikasi yang terjadi pada umumnya berhubungan dengan eksplan yang mengalami *browning*. Sebagian besar eksplan yang *browning* akan mengalami vitrifikasi pada 2 - 4 minggu setelah eksplan mengalami *browning*, akan tetapi tidak sepenuhnya vitrifikasi diawali dengan *browning*. Beberapa eksplan mengalami vitrifikasi secara langsung dimana eksplan yang berwarna hijau akan berubah menjadi putih bening. Persentase eksplan vitrifikasi pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Semua perlakuan mengalami vitrifikasi, namun persentase eksplan vitrifikasi pada semua perlakuan tidak melebihi 50%. Persentase eksplan vitrifikasi tertinggi sebesar 44,44% pada perlakuan NDM + 5 mg/l 2,4-D. Eksplan yang mengalami 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 mengakibatkan terjadinya vitrifikasi.

Persentase vitrifikasi semua perlakuan NDM lebih tinggi dibanding POC. Hal ini diduga dikarenakan tekstur medium POC lebih padat dibandingkan tekstur medium NDM. Takaran bahan yang digunakan sudah sesuai dengan literatur, akan tetapi pH medium menurun setelah proses pemasakan. Sesuai dengan pernyataan Agisimanto (2014), penyiapan media tanpa pemanasan

sebelum pengukuran pH menyebabkan penurunan pH media yang signifikan besarnya dikarenakan kelarutan bahan kimia akan lebih tinggi dengan bantuan pemanasan.

pH yang terlalu asam pada saat pembuatan medium menyebabkan medium tidak dapat memadat dengan baik, sehingga kandungan air pada medium NDM lebih banyak dibandingkan medium POC. Kandungan air yang tinggi pada medium akan diserap oleh eksplan. Eksplan yang memiliki kandungan air tinggi akan mengalami vitrifikasi. Tingkat vitrifikasi yang tinggi dapat mengakibatkan kematian pada eksplan.

Menurut Agriani (2010) vitrifikasi merupakan abnormalitas pada tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* yang ditandai dengan kandungan air jaringan terlalu tinggi, sukulensi atau *translucency*. Phan *et al.* (1986) dalam Karyanti & Royani (2013) menyatakan bahwa penyebab dasar terjadinya vitrifikasi terletak pada potensial air di dalam jaringan tanaman, konsentrasi media maupun sitokinin yang digunakan.

B. Perkembangan Pro-Embrio

Perkembangan pro-embrio merupakan indikator adanya pertumbuhan embriogenesis secara langsung pada eksplan dalam kultur *in vitro*. Pro-embrio merupakan kumpulan sel-sel dengan struktur berbentuk bulatan. Pro-embrio dapat berkembang menjadi akar maupun tunas. Pengamatan perkembangan pro-embrio pada eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* meliputi waktu muncul pro-embrio dan jumlah pro-embrio yang dilakukan selama 8 minggu. Hasil pengamatan waktu muncul pro-embrio dan jumlah pro-embrio disajikan pada Tabel 3.

Tabel 2. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Waktu Muncul Pro-Embrio dan Jumlah Pro-Embrio Tunas Anggrek *Vanda tricolor* Pada 8 Minggu Setelah Tanam (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

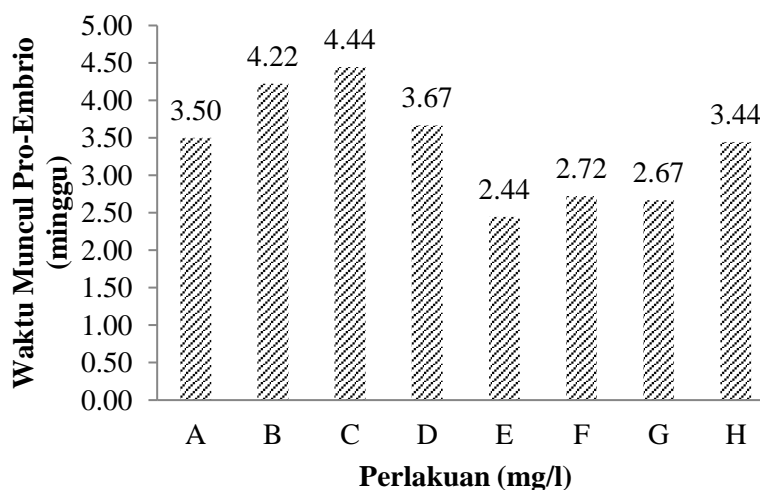
Keterangan: Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan hasil DMRT pada α 5 %

1. Waktu Muncul Pro-Embrio

Waktu muncul pro-embrio merupakan kemampuan eksplan untuk tumbuh pro-embrio pada waktu tertentu. Kemunculan pro-embrio merupakan indikator adanya pertumbuhan embriogenesis secara langsung. Semakin cepat muncul pro-embrio, maka respon eksplan terhadap medium dan zat pengatur tumbuh semakin baik. Parameter ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan eksplan untuk tumbuh pro-embrio pada waktu tertentu.

Berdasarkan hasil sidik ragam waktu muncul pro-embrio (Lampiran 6.a1) menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan yang diujikan memberikan pengaruh yang berbeda nyata. Perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D merupakan perlakuan tercepat pada waktu muncul pro-embrio ditunjukkan dengan nilai rerata 2,44 minggu, akan tetapi perlakuan NDM + 0 mg/l 2,4-D (3,50 minggu); NDM + 5 mg/l 2,4-D (3,67 minggu); POC + 1 mg/l 2,4-D (2,72 minggu); POC + 3 mg/l 2,4-D (2,67 minggu); dan POC + 5 mg/l 2,4-D (3,44 minggu) tidak nyata perbedaannya dalam memberikan pengaruh terhadap waktu muncul pro-embrio (Tabel 3).

Penggunaan auksin konsentrasi tinggi dan sitokinin konsentrasi rendah merupakan imbangun terbaik untuk menginduksi embriogenesis, namun sebaliknya apabila auksin konsentrasi rendah dan sitokinin konsentrasi tinggi maka yang terbentuk ialah tunas (Gambar 2). Hasil pengamatan waktu muncul pro-embrio disajikan pada histogram Gambar 4.



Keterangan :

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

Semua perlakuan POC memiliki hasil yang lebih cepat dalam memunculkan pro-embrio dibanding dengan NDM. POC memiliki kandungan asam amino (Lampiran 4). Asam amino memiliki peranan dalam mendorong pembentukan embrio somatik. Sesuai dengan pernyataan Remita dkk. (2013) bahwa dalam memacu pertumbuhan tunas pada eksplan diperlukan suatu asam amino. Pro-embrio dapat tumbuh pada bagian pangkal,

tengah, maupun bagian atas batang eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* yang digunakan. Pro-embrio dapat bertambah bahkan berkembang menjadi akar maupun tunas. Hal ini tergantung pada kemampuan eksplan, komposisi medium, maupun zat pengatur tumbuh yang diberikan.

Penambahan 2,4-D dalam medium dapat merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan, sehingga eksplan mampu membentuk pro-embrio. Menurut Santoso dan Nursandi (2004), keberadaan zat pengatur tumbuh dalam kegiatan kultur *in vitro* sangat diperlukan. Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam medium, pertumbuhan akan sangat terhambat bahkan mungkin eksplan tidak dapat tumbuh.

2. Jumlah Pro-Embrio

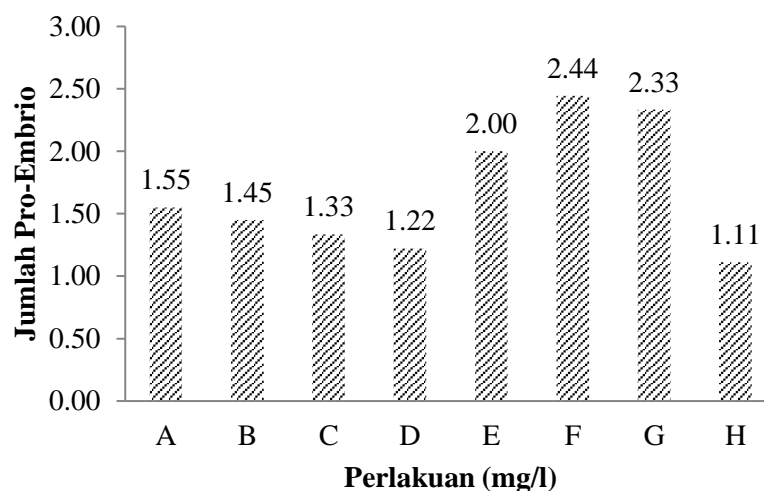
Jumlah pro-embrio merupakan salah satu indikator adanya pertumbuhan pada eksplan. Pro-embrio pada eksplan dapat bertambah dan berkembang seiring waktu. Parameter ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan eksplan dalam memunculkan pro-embrio baru. Pertambahan jumlah pro-embrio pada eksplan menunjukkan adanya respon eksplan terhadap medium dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Jumlah pro-embrio sangat penting diamati karena semakin banyak pro-embrio yang terbentuk maka akan berpeluang mendapatkan calon tunas, calon akar, maupun calon embrio.

Berdasarkan hasil sidik ragam jumlah pro-embrio (Lampiran 6.a2) menunjukkan bahwa ada beda nyata pada masing-masing perlakuan yang diujikan. Hasil terbaik dari pertambahan jumlah pro-embrio ditunjukkan oleh

perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D dengan nilai rerata 2,44 pro-embrio. Perlakuan tersebut tidak berbeda nyata dengan perlakuan NDM + 0 mg/l 2,4-D (1,55 pro-embrio); NDM + 1 mg/l 2,4-D (1,45 pro-embrio); NDM + 3 mg/l 2,4-D (1,33 pro-embrio); POC + 0 mg/l 2,4-D (2,00 pro-embrio); dan POC + 3 mg/l 2,4-D (2,33 pro-embrio) dalam memberikan pengaruh terhadap jumlah pro-embrio (Tabel 3).

Waktu inkubasi 8 minggu belum cukup untuk menginduksi tunas. Eksplan belum dapat merespon zat pengatur tumbuh yang ada pada medium. Penelitian Latip *et al.* (2010) menyebutkan proliferasi protocorm anggrek *Phalaenopsis gigantea* secara kultur *in vitro* memerlukan waktu 40 - 80 hari (6 - 12 minggu), sehingga dibutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama. Hasil pengamatan pertambahan jumlah pro-embrio disajikan pada histogram Gambar 5.

Secara umum, pertambahan jumlah pro-embrio dari 4 perlakuan POC lebih tinggi dibandingkan NDM. Hal ini dikarenakan POC memiliki kandungan asam amino (Lampiran 4). Asam amino sebagai sumber Nitrogen yang jika disertai pemberian auksin dan sitokinin dengan konsentrasi yang tepat dapat memacu pertambahan pro-embrio. Rasullah dkk. (2013) menyatakan bahwa asam amino merupakan penyusun protein yang memiliki berbagai fungsi pada tumbuhan diantaranya sebagai pendukung, pengangkut substansi, pengkoordinasi aktifitas organisme, perespon sel terhadap rangsangan, pergerakan, perlindungan terhadap penyakit, dan mempercepat reaksi-reaksi kimiawi secara selektif.



Keterangan :

A : NDM + 0 mg/l 2,4-D

B : NDM + 1 mg/l 2,4-D

C : NDM + 3 mg/l 2,4-D

D : NDM + 5 mg/l 2,4-D

E : POC + 0 mg/l 2,4-D

F : POC + 1 mg/l 2,4-D

G : POC + 3 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 Anggrek *Vanda tricolor* Pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Pro-embrio dapat berkembang menjadi akar dan tunas. Perkembangan pro-embrio menjadi akar dan tunas merupakan salah satu langkah penting yang menentukan keberhasilan teknik kultur *in vitro*. Pembentukan dan pertambahan jumlah pro-embrio ditentukan oleh sumber eksplan, komposisi nutrisi pada medium, dan zat pengatur tumbuh yang digunakan.

C. Perkembangan Kalus

Perkembangan kalus merupakan indikator adanya pertumbuhan embriogenesis secara tidak langsung pada eksplan dalam kultur *in vitro*. Kalus adalah sel yang belum terorganisir dan terbentuk dari hasil pembelahan sel yang

berpotensi tinggi untuk terus menerus membelah diri (Wattimena dkk., 1992). Menurut Krikorian (2004) dalam Kadir (2007) bahwa pembelahan sel terus menerus tanpa diikuti pembesaran dan pembelahan sel akan menyebabkan terbentuknya kalus. Kalus dapat berkembang dan berdiferensiasi menjadi akar dan tunas tergantung dari zat pengatur tumbuh yang ditambahkan. Hasil pengamatan persentase eksplan berkalus, waktu muncul kalus, dan diameter kalus tunas anggrek *Vanda tricolor* yang dilakukan selama 8 minggu disajikan pada Tabel 4.

Tabel 3. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Persentase Eksplan Berkalus, Waktu Muncul Kalus, dan Diameter Kalus Tunas Anggrek *Vanda tricolor* Pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Persentase Eksplan 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 yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan hasil DMRT pada α 5 %

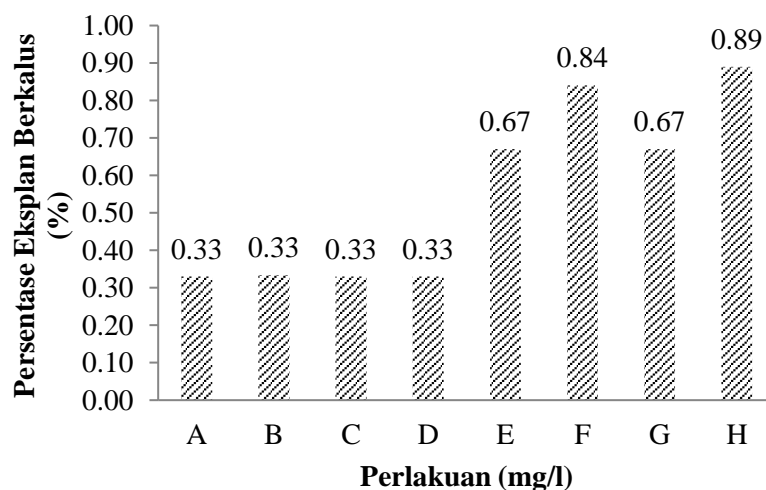
1. Persentase Eksplan Berkalus

Persentase eksplan berkalus merupakan kemampuan eksplan dalam membentuk kalus. Semakin besar persentase eksplan berkalus maka respon eksplan terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan pada medium semakin baik. Parameter persentase eksplan berkalus bertujuan untuk mengetahui berapa persentase kemampuan eksplan dalam menghasilkan kalus.

Berdasarkan hasil sidik ragam persentase eksplan berkalus (Lampiran 6.b1) menunjukkan bahwa perlakuan yang diujikan memberikan pengaruh beda nyata. Hasil terbaik pada persentase eksplan berkalus ditunjukkan pada

perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D sebesar 0,84% dan POC + 5 mg/l 2,4-D sebesar 0,89% namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D sebesar 0,67% dan POC + 3 mg/l 2,4-D sebesar 0,67% (Tabel 4).

Semua perlakuan POC memiliki persentase eksplan berkalus yang lebih tinggi dibanding NDM. POC memiliki kandungan asam amino yang berfungsi sebagai sumber Nitrogen organik dan dapat dimanfaatkan langsung oleh jaringan tanaman, serta mengandung hormon yang dapat merangsang pertumbuhan jaringan tanaman, sehingga berperan dalam induksi pembentukan kalus. Hasil pengamatan persentase eksplan berkalus disajikan pada histogram Gambar 6.



Keterangan :

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

Gambar 3. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Persentase Eksplan Berkalus Tunas Angrek *Vanda tricolor* Pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan POC + 5 mg/l 2,4-D memberikan nilai rerata persentase eksplan berkalus paling tinggi sebesar 0,89% dan cenderung dapat dikatakan semakin tinggi konsentrasi 2,4-D maka dapat meningkatkan persentase eksplan berkalus, akan tetapi rerata 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.

Menurut Warnita (2011), tingginya persentase pembentukan kalus dikarenakan zat pengatur tumbuh yang diberikan mendukung untuk pertumbuhan kalus. Medium kultur yang dapat memunculkan persentase kalus yang tinggi dimungkinkan karena medium tersebut mampu menyuplai kebutuhan nutrisi secara keseluruhan, sehingga eksplan dapat berkembang menjadi kalus.

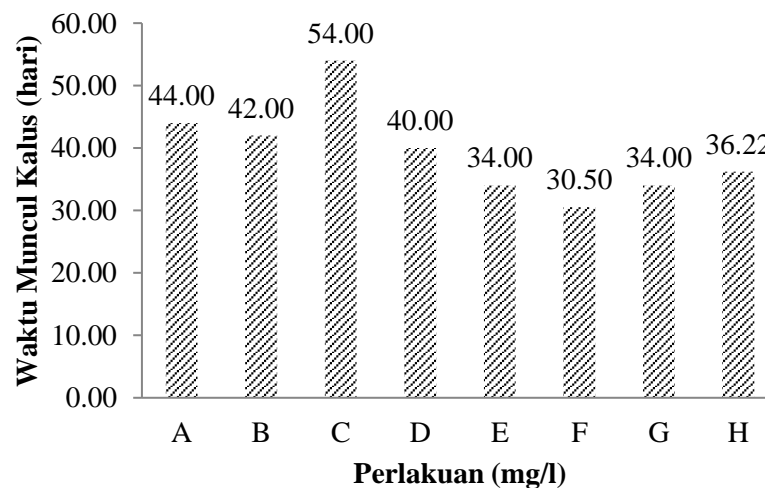
Penambahan auksin seperti 2,4-D dalam medium akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan, sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus. Penambahan zat pengatur tumbuh yang tidak sesuai dengan takaran maka tidak akan meningkatkan nilai rerata persentase eksplan berkalus. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), pembentukan kalus dan organ-organ pada eksplan kultur *in vitro* ditentukan oleh penggunaan yang tepat dari zat pengatur tumbuh.

2. Waktu Muncul Kalus

Waktu muncul kalus merupakan kemampuan eksplan untuk tumbuh kalus pada waktu tertentu. Semakin cepat waktu muncul kalus, maka respon eksplan terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan semakin baik.

Pembentukan kalus merupakan salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro*. Waktu yang diperlukan eksplan untuk membentuk kalus tergantung dari bahan eksplan serta komposisi medium yang digunakan.

Berdasarkan hasil sidik ragam waktu muncul kalus (Lampiran 6.b2) menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan yang diujikan tidak ada beda nyata. Artinya, penggunaan medium NDM dan POC dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Akan tetapi, semua perlakuan POC memiliki hasil yang lebih cepat dibanding NDM dalam memunculkan kalus (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa eksplan memiliki respon yang lebih baik terhadap POC sebagai medium tumbuh. Hasil pengamatan waktu muncul kalus disajikan pada histogram Gambar 7.



Keterangan :

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

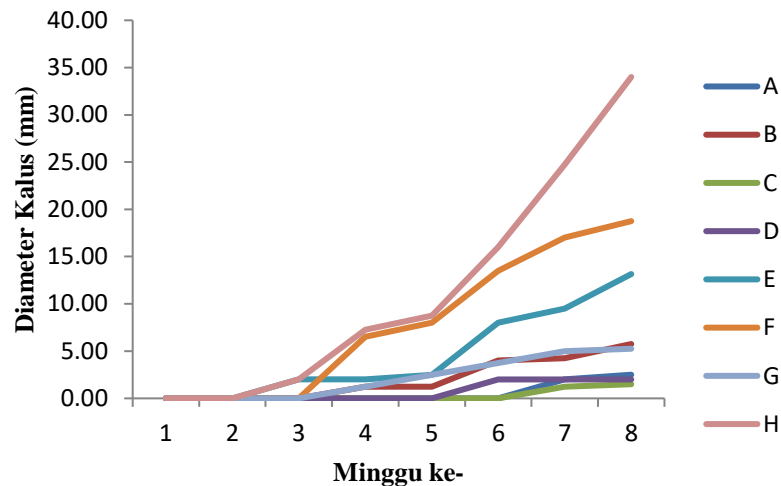
Hasil terbaik pada waktu muncul kalus ditunjukkan oleh perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D dengan nilai rerata 30,50 hari dan waktu terlama muncul kalus pada perlakuan NDM + 3 mg/l 2,4-D dengan nilai rerata 54,00 hari. Semakin rendah nilai rerata yang diperoleh menunjukkan semakin cepat kalus muncul. Hal ini diduga karena auksin pada medium tidak diserap dengan baik oleh eksplan, sehingga tidak cukup untuk membentuk kalus. Keadaan eksplan yang mengalami *browning* dan vitrifikasi juga menjadi penghambat eksplan dalam penyerapan auksin yang berperan dalam pembelahan, pembesaran, dan pemanjangan sel, sehingga berpengaruh terhadap waktu muncul kalus.

3. Diameter Kalus

Diameter kalus menunjukkan pertumbuhan atau pembentukan sel-sel baru dari kalus. Diameter kalus berkaitan erat dengan adanya pertumbuhan, penambahan jumlah sel, dan komposisi dari medium. Pembentukan kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya bahan eksplan, umur eksplan, dan zat pengatur tumbuh.

Berdasarkan hasil sidik ragam diameter kalus (Lampiran 6.b3) menunjukkan tidak ada beda nyata pada masing-masing perlakuan yang diujikan. Jenis medium yang digunakan yaitu NDM dan POC dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D memberikan pengaruh yang sama baik pada diameter kalus. Secara umum, diameter kalus dari 4 perlakuan POC menunjukkan hasil lebih tinggi dibandingkan dengan NDM (Tabel 4). Diduga komponen medium POC lebih mudah diserap oleh tanaman. Akan tetapi rerata diameter kalus dengan perlakuan 0 mg/l 2,4-D dan 1 mg/l 2,4-D lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 3 mg/l 2,4-D. Hal ini dikarenakan pada

persentase eksplan berkalus juga memiliki hasil demikian, sehingga berpengaruh pada diameter kalus. Hasil pengamatan diameter kalus disajikan pada grafik Gambar 8.



Keterangan :

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

Hasil terbaik pada diameter kalus ditunjukkan oleh perlakuan POC + 5 mg/l 2,4-D. Peningkatan diameter kalus akan meningkatkan persentase eksplan berkalus. Hal tersebut dapat dilihat pada Tabel 4 yang menunjukkan bahwa semakin besar diameter kalus maka semakin besar persentase eksplan berkalus, begitu pula sebaliknya semakin kecil diameter kalus maka semakin kecil nilai persentase eksplan berkalus.

Peningkatan diameter kalus menunjukkan adanya proses pertumbuhan. Menurut Widiastoety (2014), dalam hubungannya dengan permeabilitas sel,

auksin meningkatkan difusi masuknya air ke dalam sel. Hal ini menyebabkan volume kalus meningkat. Penambahan diameter kalus diduga dari proses induksi kalus yang diawali dengan kemunculan bulatan, karena jumlah sel semakin banyak maka membentuk gumpalan yang semakin besar yang menyebabkan penebalan. Penebalan tersebut merupakan interaksi antara eksplan dengan medium tumbuh, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan tumbuh, sehingga diameter kalus bertambah besar.

4. Tekstur Kalus

Tekstur kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan kalus. Tekstur yang baik adalah remah (*friable*) karena lebih mudah dipisahkan antar sel-selnya. Selain remah, kalus juga dapat bertekstur kompak yang memiliki sel-sel berikatan rapat dan padat. Kalus kompak memiliki ciri antar sel-selnya sulit dipisahkan dan cenderung padat menggumpal. Hasil pengamatan tekstur kalus disajikan pada Tabel 5.

Tabel 4. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Tekstur Kalus Tunas Anggrek *Vanda tricolor* Pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Tekstur Kalus pada Eksplan
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>

Pada Tabel 5 menunjukkan bahwa hasil kalus dengan tekstur kompak diperoleh pada semua perlakuan. Hal ini dapat disebabkan konsentrasi tinggi auksin eksogen (2,4-D) yang diberikan mempengaruhi peningkatan konsentrasi auksin endogen eksplan. Selain itu, adanya sitokinin (TDZ) dalam

konsentrasi rendah juga dapat mempengaruhi terbentuknya kalus kompak tersebut. Diperkuat pernyataan Ariati (2012) bahwa tekstur kalus yang 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.

Andaryani (2010) menyatakan bahwa terbentuknya kalus yang bertekstur kompak dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang telah tumbuh membentuk kalus tersebut. Kalus kompak membutuhkan proses subkultur dengan waktu yang lama untuk dapat menjadi kalus remah. Menurut Pierik (1987) dalam Lizawati (2012), tekstur kalus yang bervariasi dari kompak hingga remah, tergantung dari jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi medium, zat pengatur tumbuh, dan kondisi lingkungan kultur.

D. Perkembangan Eksplan

Parameter pengamatan terhadap pertumbuhan eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* meliputi pengamatan tinggi eksplan, jumlah daun, dan warna daun. Pengamatan perkembangan eksplan bertujuan untuk mengetahui seberapa besar respon eksplan terhadap perlakuan jenis medium dan zat pengatur tumbuh yang diberikan. Pengamatan tinggi eksplan, jumlah daun, dan warna daun pada eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* yang dilakukan selama 8 minggu menunjukkan adanya perkembangan. Hasil pengamatan pertambahan tinggi eksplan dan pertambahan jumlah daun disajikan pada Tabel 6.

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

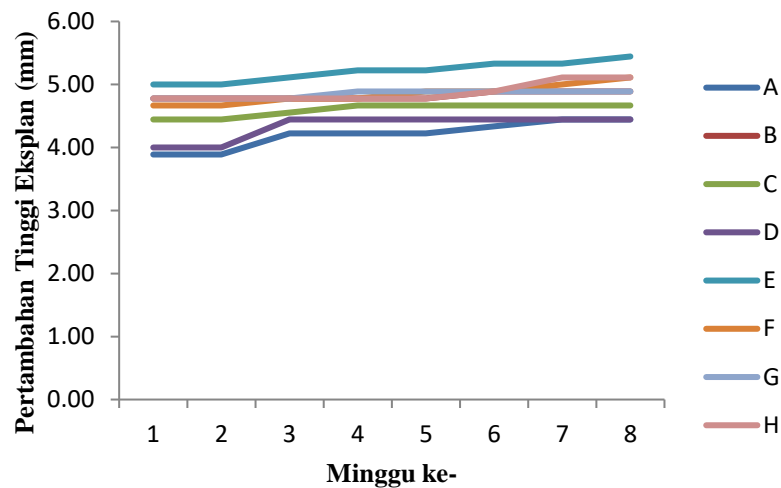
Perlakuan	Pertambahan Tinggi Eksplan (mm)	Pertambahan Jumlah Daun (helai)
NDM + 0 mg/l 2,4-D	0,55 a	0,33 a
NDM + 1 mg/l 2,4-D	0,33 a	0,33 a
NDM + 3 mg/l 2,4-D	0,67 a	0,33 a
NDM + 5 mg/l 2,4-D	0,67 a	0,33 a
POC + 0 mg/l 2,4-D	0,67 a	1,55 a
POC + 1 mg/l 2,4-D	0,67 a	0,67 a
POC + 3 mg/l 2,4-D	0,33 a	1,00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

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

1. Tinggi Eksplan

Tinggi eksplan adalah ukuran tanaman yang biasa diamati atau dilihat baik sebagai indikator pertumbuhan maupun sebagai indikator keberhasilan dari perlakuan yang dilakukan. Parameter tinggi eksplan diamati untuk mengetahui pertumbuhan pada eksplan. Pertumbuhan eksplan yang baik merupakan indikator keberhasilan suatu perbanyakan secara kultur *in vitro*.

Berdasarkan hasil sidik ragam tinggi eksplan (Lampiran 6.c1) menunjukkan bahwa tidak ada beda nyata pada masing-masing perlakuan yang diujikan. Pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D pada medium NDM dan POC memberikan pengaruh yang sama tinggi terhadap pertambahan tinggi eksplan (Tabel 6). Hal ini diduga karena medium dan zat pengatur tumbuh yang digunakan telah memberikan nutrisi yang cukup untuk pertambahan tinggi eksplan. Hasil pengamatan pertambahan tinggi eksplan disajikan pada grafik Gambar 9.



Keterangan :

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

Semua perlakuan mengalami pertambahan tinggi dari hari ke-0 penanaman sampai minggu ke-8 setelah tanam. Pertambahan tinggi eksplan tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan NDM + 0 mg/l 2,4-D. Pada 1 sampai 8 minggu setelah tanam, perlakuan ini memiliki tinggi yang paling rendah dari semua perlakuan, akan tetapi memiliki pertambahan tinggi paling banyak. Penggunaan zat pengatur tumbuh auksin 2,4-D dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari sitokinin (TDZ) memiliki fungsi mempengaruhi pertambahan panjang dan pertumbuhan batang (Dewi, 2008). Dimungkinkan auksin endogen yang terdapat pada eksplan masih berperan dalam metabolisme tanaman.

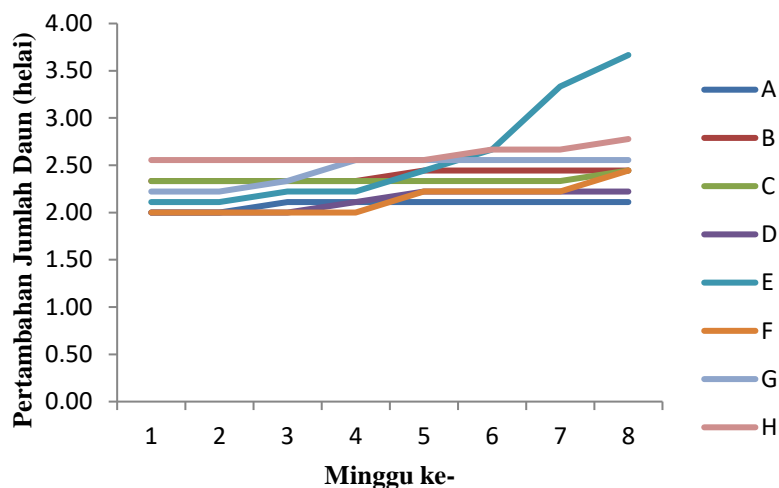
2. Jumlah Daun

Daun adalah suatu organ yang penting bagi tumbuhan dalam melangsungkan hidup. Fungsi daun diantaranya sebagai tempat terjadinya fotosintesis, sebagai alat respirasi, dan alat reproduksi vegetatif (Bitar, 2019). Pertumbuhan daun dipengaruhi oleh kandungan Nitrogen dalam medium tanam. Semakin banyak jumlah daun, mengindikasikan pertumbuhan eksplan yang semakin baik (Acima, 2006). Parameter pengamatan jumlah daun bertujuan untuk mengetahui pertambahan jumlah daun yang tumbuh pada tiap perlakuan yang diujikan.

Berdasarkan hasil sidik ragam jumlah daun (Lampiran 6.c2) menunjukkan bahwa pada masing-masing perlakuan yang diujikan tidak berbeda nyata. Penggunaan medium NDM dan POC dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertambahan jumlah daun (Tabel 6). Diduga eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* yang digunakan memerlukan waktu yang lebih lama untuk membentuk daun baru. Sebagaimana pendapat Rupawan dkk. (2014) yang menyatakan bahwa untuk pengamatan 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 grafik Gambar 10.

Pertambahan jumlah daun yang terbentuk selama 8 minggu pengamatan relatif sedikit dan hampir sama untuk semua perlakuan, akan tetapi eksplan pada perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D memiliki pertambahan jumlah daun yang cenderung lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lain. Diduga kandungan

unsur hara terutama asam amino sebagai sumber Nitrogen organik yang terdapat dalam medium POC dapat memenuhi kebutuhan unsur hara yang dibutuhkan eksplan pada proses pembentukan daun. Nitrogen organik dapat dimanfaatkan secara langsung oleh jaringan tanaman sebagai bahan utama penyusun protein dalam pembelahan sel.



Keterangan :

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

















Pangestuti (2011) menyatakan pertambahan daun pada eksplan anggrek selain karena dipengaruhi oleh fotosintat dan hormon, juga dipengaruhi oleh adanya nitrogen. Selain itu, tingginya pertambahan jumlah daun pada perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D juga dipengaruhi oleh kemampuan eksplan dalam memunculkan pro-embrio yang berkembang menjadi tunas. Setiap

tunas yang terbentuk pada perlakuan tersebut dapat menumbuhkan daun, sehingga mempengaruhi parameter pertambahan jumlah daun.

3. Warna Daun

Pengamatan warna daun dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan atau perubahan warna daun pada eksplan. Warna daun dibandingkan dengan intensitas warna dalam buku *Munsell Plant Tissue Colour Chart*. Parameter warna daun didasarkan pada nilai skoring dari penampakan daun. Semakin hijau warna daun maka nilai skoring semakin tinggi, sebaliknya semakin kuning warna daun maka nilai skoring semakin rendah. Hasil pengamatan warna daun pada eksplan dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 6. Pengaruh Jenis Medium dan 2,4-D Terhadap Warna Daun Tunas Anggrek *Vanda tricolor* Pada 1 dan 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Warna daun minggu ke-1	Skoring minggu ke-1	Warna daun minggu ke-8	Skoring 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

Pada Tabel 7 menunjukkan bahwa secara umum warna daun pada minggu ke-1 hampir sama di setiap perlakuan. Daun pada minggu ke-1 mula-mula berwarna hijau agak kekuningan dan pada minggu ke-8 warna daun berubah menjadi kuning. Tidak terjadinya peningkatan warna hijau ini diduga karena penggunaan konsentrasi 2,4-D lebih tinggi dibandingkan konsentrasi TDZ, juga adanya auksin endogen maka sistem kerja sitokinin dalam pembentukan klorofil menjadi terhambat. Sesuai dengan pernyataan Santoso dan Nursandi (2004), zat pengatur tumbuh sitokinin dapat mendorong pembentukan klorofil.

Warna daun yang paling hijau ditunjukkan oleh perlakuan POC + 1 mg/l 2,4-D karena mempunyai nilai skoring warna daun yang tinggi yaitu 5 GY 7/8. Perlakuan ini dapat mempertahankan warna hijau daun dari minggu ke-1 hingga minggu ke-8. Kestabilan warna hijau pada daun eksplan 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 eksplan tetap hijau.

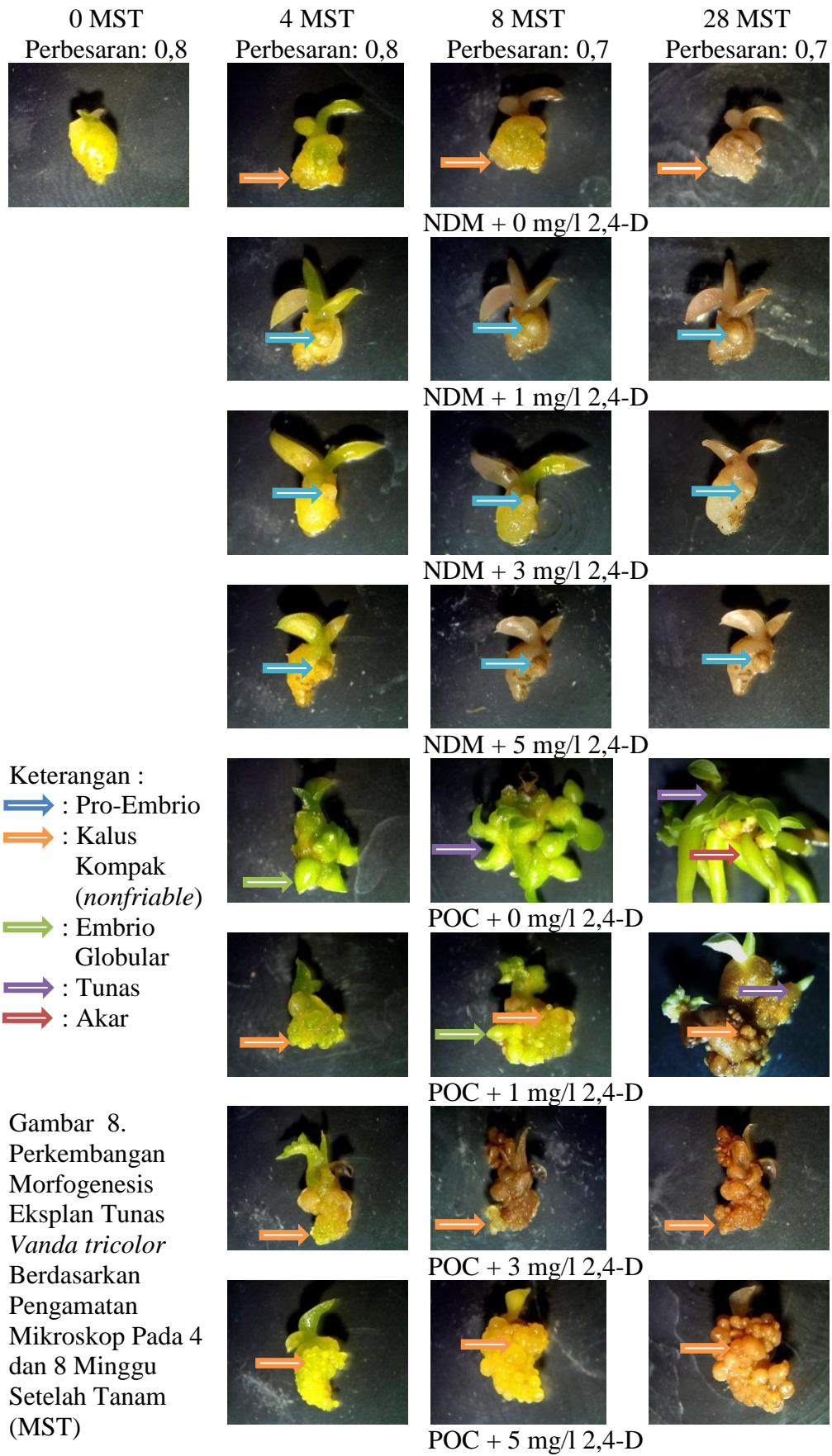
Unsur hara makro N dan Mg serta unsur hara mikro Fe dan Mn dalam medium tumbuh mempunyai peranan yang sangat penting dalam sintesis klorofil. Mukhlis (2017) mengungkapkan bahwa unsur hara N, Fe, dan Mn sebagai penyusun klorofil atau zat hijau daun. Selain unsur hara tersebut, unsur hara Mg membantu dalam pembentukan klorofil. Mg merupakan bahan yang mempunyai peran penting dalam penyusunan klorofil yang digunakan untuk kegiatan fotosintesis untuk menghasilkan karbohidrat. Selain itu, penambahan zat pengatur tumbuh terutama sitokinin dapat memacu

perkembangan kloroplas dan meningkatkan sintesis protein, sehingga laju klorofil lebih stabil.

Perubahan warna daun dari warna hijau menjadi warna kuning kecoklatan terlihat jelas pada perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D dan POC + 3 mg/l 2,4-D. Perubahan warna daun ditandai dengan terjadinya perubahan warna daun yang semula berwarna hijau menjadi kuning kecoklatan. Hal ini diduga karena eksplan kekurangan hara makro N dan Mg serta hara mikro Fe dan Mn yang menyebabkan proses sintesis klorofil dalam sel turun atau tidak terbentuk. Akibat lebih lanjut dengan terhambatnya sintesis klorofil menyebabkan sel tidak mampu berfotosintesis, sehingga mengalami *browning* dan menghambat pertumbuhan eksplan.

E. Pengamatan Mikroskop

Peristiwa terjadinya struktur-struktur atau bentukan-bentukan baru pada eksplan yang sebelumnya tidak ada disebut dengan morfogenesis (Katuuk, 1989). Eksplan yang digunakan yaitu tunas anggrek *Vanda tricolor* usia 13 bulan dengan bentuk yang masih kecil, sehingga pengamatan morfogenesis dan perkembangan eksplan sulit untuk dilihat secara kasat mata. Pengamatan mikroskop bertujuan untuk mengetahui perkembangan kalus dan fase embrio pada eksplan secara detail menggunakan mikroskop apabila terbentuk fase globular, heart, torpedo, dan kotiledon. Pengamatan mikroskop dilihat menggunakan mikroskop Stereo SZM45 B2 + Optilab *advance* pada perbesaran 0,7 dan perbesaran 0,8. Pengamatan ini dilakukan pada 4 MST dan 8 MST (minggu setelah tanam). Hasil pengamatan mikroskop disajikan pada Gambar 11.



Gambar 8.
Perkembangan
Morfogenesis
Eksplan Tunas
Vanda tricolor
Berdasarkan
Pengamatan
Mikroskop Pada 4
dan 8 Minggu
Setelah Tanam
(MST)

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan eksplan kalus selama 8 minggu diketahui bahwa eksplan tumbuh kalus. Posisi kalus yang terbentuk berada di batang dan di daun eksplan. Pada mulanya eksplan membentuk bulatan terlebih dahulu, kemudian eksplan mulai terlihat adanya pembengkakan atau pembesaran yang disebabkan oleh adanya imbibisi penyerapan unsur hara dari medium. Pembentukan kalus sangat lambat dan hingga akhir pengamatan beberapa kalus yang terbentuk belum membesar. Bentuk pertumbuhan ini dipengaruhi antara lain oleh jenis eksplan, medium tumbuh, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan pengkulturan.

Penggunaan jenis medium dan zat pengatur tumbuh berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus pada eksplan. Kalus yang terbentuk berwarna kuning dan hijau serta bersifat kompak. Sedangkan kalus yang embriogenik adalah kalus yang remah berwarna putih dan bila dikulturkan kembali kemungkinan akan membentuk tunas. Menurut Soeryowinoto (1996) terbentuknya kalus dapat disebabkan oleh adanya sel-sel yang kontak dengan medium terdorong menjadi meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan. Adapun auksin 2,4-D yang diberikan mampu menstimulasi terjadinya pembelahan sel dan pembesaran kalus.

Berdasarkan Gambar 11, perkembangan morfogenesis eksplan yang paling baik ditunjukkan oleh perlakuan POC + 0 mg/l 2,4-D. Pada 4 MST eksplan menunjukkan adanya pertumbuhan embrio fase globular dan pada 8 MST berkembang menjadi beberapa tunas serta terbentuk daun. Hal ini diduga karena adanya pengaruh auksin endogen yang terdapat pada eksplan mampu mempengaruhi pembelahan dan pembesaran sel. Pada perlakuan POC + 1 mg/l

2,4-D juga menunjukkan adanya perkembangan morfogenesis eksplan dari kalus pada 4 MST menjadi embrio fase globular pada 8 MST.

Perlakuan NDM + 1 mg/l 2,4-D; NDM + 3 mg/l 2,4-D; dan NDM + 5 mg/l 2,4-D cenderung pada pembentukan pro-embrio, sedangkan perlakuan NDM + 0 mg/l 2,4-D; POC + 3 mg/l 2,4-D; dan POC + 5 mg/l 2,4-D cenderung hanya membentuk kalus. Kalus yang terbentuk mengalami pertambahan diameter pada 8 MST, akan tetapi beberapa eksplan mengalami *browning* sehingga berdampak pada perkembangan kalus.