

**PENGARUH *Benzyl Adenin* DAN MEDIA DASAR
PADA PERBANYAKAN EMBRIO ANGGREK BULAN
(*Phalaenopsis amabilis*) SECARA *IN VITRO***

Oleh:

CAECILIA PUSPITA CHANDRA P. A.



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
MALANG**

2011

**PENGARUH *Benzyl Adenin* DAN MEDIA DASAR
PADA PERBANYAKAN EMBRIO ANGGREK BULAN
(*Phalaenopsis amabilis*) SECARA *IN VITRO***



Oleh:
CAECILIA PUSPITA CHANDRA P. A.

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
MALANG**

2011

RINGKASAN

Caecilia Puspita C.P.A. 0610410006-41. PENGARUH *Benzyl Adenin* DAN MEDIA DASAR PADA PERBANYAKAN EMBRIO ANGGREK BULAN (*Phalaenopsis amabilis*) SECARA *IN VITRO*. Di bawah bimbingan Prof.Dr.Ir. Sudiarmo, MS sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Ir. Tatik Wardiyati, MS sebagai Pembimbing kedua.

Anggrek adalah salah satu jenis tanaman hias yang banyak dicari oleh kolektor baik dari dalam maupun luar negeri. Permintaan pasar luar negeri pada tahun 2000 mencapai 1,598 juta tanaman (Anonymous, 2011) menuntut kualitas yang seragam. Untuk menghasilkan anggrek yang banyak dan seragam, maka cara yang dapat dilakukan adalah dengan metode kultur jaringan (Wardiyati, 1998). Kultur jaringan anggrek yang banyak berkembang di masyarakat adalah kultur dengan biji. Untuk menghasilkan embrio dalam jumlah lebih banyak diperlukan meristem yang berasal dari perkembangan biji dalam media kultur jaringan. Sama seperti tanaman lain, kultur jaringan tanaman anggrek memerlukan media dan komposisi zat pengatur tumbuh yang tepat sehingga dapat dihasilkan tanaman yang sesuai (Hendaryono, 2000). Menurut Gunawan (1988) Zat pengatur tumbuh yang banyak berperan dalam pertumbuhan adalah auksin dan sitokinin. Walaupun fungsi kedua zat pengatur tumbuh tersebut saling berlawanan, tapi keduanya tetap diperlukan. Tujuan dari penelitian ini yaitu mendapatkan jenis media, konsentrasi sitokinin jenis *Benzyl Adenin* (BA) serta kombinasi yang paling sesuai untuk perbanyakan dan pertumbuhan *explant* anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis*).

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2010 hingga bulan Februari 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan di Nursery "Venus Orchids" Jl. Supit Urang, Dusun Kraguman, Desa Tegalweru, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang. Alat yang digunakan pada penelitian ini ialah timbangan analitik, oven, aquadestilator, lemari es, autoclaf, pH meter, kompor gas, sendok plastik, penggaris, tabung volumetrik, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, botol kultur, pipet, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), scalpel, gunting, pinset, petridish, bunsen, kamera digital, lampu TL 40 watt, AC dan timer. Sedangkan bahan yang digunakan ini ialah media $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS), media Vacin and Went (VW), media New *Phalaenopsis* (NP) dan embrio anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis*) warna putih. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 2 faktor dan diulang sebanyak 3 kali. Faktor pertama adalah jenis media terdiri dari Media $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS), media Vacin and Went (VW) dan media New *Phalaenopsis* (NP). Faktor kedua adalah konsentrasi *benzy adenine* yang ditambahkan yaitu 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm dan 1.5 ppm.

Pengamatan dilakukan setelah inokulasi yang didasarkan pada pengamatan secara visual yang meliputi persentase hidup *explant* yang didapat dengan cara menghitung jumlah *explant* yang tumbuh dibagi dengan jumlah *explant* kali 100 %; saat inisiasi *protocrom like bodies* (PLB), tunas dan akar diamati setiap hari sampai terbentuk *protocrom like bodies* (PLB) atau organ lain, jumlah *explant* yang membentuk embrio, tunas atau akar pada 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 dan 56 hari setelah subkultur, jumlah *protocrom like bodies* (PLB), daun

dan akar yang terbentuk pada 56 hari setelah subkultur, panjang dan diameter akar yang terbentuk pada 56 hari setelah subkultur.

. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji F pada taraf 5%. Apabila terdapat pengaruh yang nyata, maka dilakukan uji perbandingan dengan menggunakan Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.

Hasil penelitian menunjukkan persentase hidup *explant* berkisar antara 75-100%. Perbedaan jenis media dan konsentrasi BA yang ditambahkan tidak berpengaruh nyata pada saat inisiasi embrio, tunas dan akar. Jumlah *explant* yang membentuk embrio dipengaruhi oleh konsentrasi BA dan yang terbanyak adalah pada perlakuan BA 0.5 ppm yaitu 3.89 *explant* per botol (77.80%). Perbedaan konsentrasi BA yang ditambah mempengaruhi jumlah *explant* yang membentuk tunas pada 35, 42, 49 dan 56 hss. Jumlah *explant* terbanyak yang membentuk tunas adalah dari perlakuan tanpa penambahan BA, yaitu 4.43 *explant* per botol (88.60%). Rerata jumlah daun pada 56 hss dipengaruhi oleh jenis media dan konsentrasi BA yang ditambahkan, tetapi tidak ada interaksi antara keduanya. Jumlah daun terbanyak dihasilkan oleh media NP yaitu 22.75 daun atau lebih banyak 20.88% dari media $\frac{1}{2}$ MS. Sedangkan media tanpa penambahan BA menghasilkan daun terbanyak yaitu 23.00 daun atau lebih banyak 13.04% dari perlakuan BA 0.5 ppm. Jumlah akar pada 56 hss juga dipengaruhi jenis media dan konsentrasi BA tanpa ada interaksi. Jumlah akar terbanyak adalah pada media NP yaitu 13.50 akar atau 34.62% lebih banyak daripada perlakuan $\frac{1}{2}$ MS. Media tanpa penambahan BA juga menghasilkan akar dalam jumlah terbanyak yaitu 16.00 atau lebih banyak 37.50% dari perlakuan BA 0.5 ppm. Terjadi interaksi antara jenis media dan konsentrasi BA pada jumlah embrio yang dihasilkan dan diameter akar. Perlakuan $\frac{1}{2}$ MS dengan kombinasi BA 0.5 ppm menghasilkan 20.40 embrio per *explant*. Sedangkan media VW dengan kombinasi BA 1.5 ppm menghasilkan akar berdiameter rata – rata 2.33 mm.



KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah memberikan rahmat dan kasih-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian yang berjudul “Pengaruh *Benyl Adenin* dan Media Dasar Pada Perbanyakan Embrio Angrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis*) Secara *In Vitro*”.

Dalam penulisan laporan penelitian ini tidak sedikit bantuan yang telah penulis terima dari beberapa pihak yang berupa informasi dan bimbingan. Berkaitan dengan itu semua, maka pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Ir. Moch. Dewani, MS. (alm), Prof.Dr.Ir.Sudiarso,MS dan Prof. Dr. Ir. Tatik Wardiyati, MS selaku dosen pembimbing atas segala bimbingan dan arahnya serta Prof. Dr. Ir. Husni Tamrin Sebayang, MS selaku dosen pembahas. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Nursery Venus Orchid, Desa Tegalweru, Kec. Dau, Kab. Malang. Atas bimbingan dan semua fasilitas yang telah diberikan, penulis sampaikan terima kasih tak terhingga kepada Prof. Dr. Ir. Titis Adisarwanto, MS. selaku pemilik Nursery. Penghargaan setulus – tulusnya penulis sampaikan pula kepada Ayah, Ibu dan Adik atas doa dan kasih sayangnya. Terima kasih untuk staf Laboratorium Kultur Jaringan dan teman – teman Mahasiswa Agronomi 2006 serta semua orang yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang mendukung dalam pengerjaan laporan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa pasti ada kekurangan dalam penyusunan laporan penelitian ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga laporan penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkannya.

Malang, Juli 2011

Penulis

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 26 Januari 1989 di Malang Jawa Timur sebagai anak pertama dari pasangan Drs. Marianus Ali Pele Alu dan Lucia Sumartini,S.Pd. Penulis menyelesaikan Pendidikan Dasar di SDK St. Yusup I Malang pada tahun 2000. Pendidikan Sekolah Menengah Pertama diselesaikan di SLTPK St. Maria I Malang pada tahun 2003 dan menyelesaikan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMAN 2 Malang pada tahun 2006.

Pada tahun 2006, penulis melanjutkan pendidikan Strata 1 (S1) Program Studi Agronomi, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya melalui program Penjarangan Siswa Berprestasi (PSB). Tahun 2007 penulis menjadi asisten praktikum Dasar Agronomi. Tahun 2007-2008 penulis menjadi asisten praktikum Fisiologi Tumbuhan, tahun 2008 menjadi asisten praktikum Teknologi Benih. Tahun 2009-2010 penulis menjadi asisten praktikum Fisiologi Tanaman, tahun 2009 menjadi asisten praktikum lapang Perbanyakan Vegetatif dan pada tahun 2010 menjadi asisten praktikum laboratorium Perbanyakan Vegetatif.

Penulis pernah menjabat sebagai Ketua Umum Unit Kegiatan Mahasiswa Keluarga Mahasiswa Katolik (UKM KMK) periode tahun 2007-2008 dan periode tahun 2008-2009.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
RIWAYAT HIDUP	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
DAFTAR ISTILAH	vii
1. Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	2
1.3 Hipotesis.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Pembibitan tanaman anggrek	4
2.2 Zat pengatur tumbuh	5
2.3 Kultur jaringan tanaman anggrek	6
2.4 Media kultur jaringan anggrek	9
2.5 Teknik penaburan biji	10
III. BAHAN DAN METODE	12
3.1 Tempat dan waktu.....	12
3.2 Alat dan bahan.....	12
3.3 Metode penelitian.....	12
3.4 Pelaksanaan penelitian.....	13
3.5 Pengamatan	18
3.6 Analisis data	19
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Hasil	20
4.2 Pembahasan.....	32
V. KESIMPULAN DAN SARAN	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

No	Teks	Hal
1.	Perlakuan yang dicobakan	13
2.	Komposisi media dasar	15
3.	Persentase hidup <i>explant</i> sampai akhir pengamatan	19
4.	Rerata saat inisiasi embrio	20
5.	Rerata saat inisiasi tunas	20
6.	Rerata saat inisiasi akar	21
7.	Rerata jumlah <i>explant</i> yang membentuk embrio pada berbagai umur pengamatan	21
8.	Rerata jumlah <i>explant</i> yang membentuk tunas pada berbagai umur pengamatan	23
9.	Rerata jumlah <i>explant</i> yang membentuk akar pada berbagai umur pengamatan	24
10.	Rerata jumlah daun dan jumlah akar pada 56 hss	25
11.	Rerata jumlah embrio per <i>explant</i> pada 56 hss	26
12.	Rerata diameter akar pada 56 hss	28
13.	Rerata panjang akar pada 56 hss	30
14.	Jumlah PLB per <i>explant</i> dengan berbagai ukuran	30



DAFTAR GAMBAR

No	Teks	Hal
1.	Interaksi antara auksin dan sitokinin	6
2.	Tanaman Anggrek Bulan dan embrio calon <i>explant</i>	12
3.	Jumlah <i>explant</i> yang membentuk embrio tiap pengamatan	23
4.	Jumlah embrio yang dihasilkan per <i>explant</i>	28
5.	Embrio yang dihasilkan pada 56 hss tiap perlakuan	28
6.	Diameter akar yang dihasilkan per <i>explant</i>	29
7.	Diameter akar umur 56 hss pada berbagai perlakuan	30
8.	Ukuran embrio pada 56 hss	32



DAFTAR LAMPIRAN

No	Teks	Hal
1.	Perhitungan Pembuatan Media $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS)	41
2.	Perhitungan Pembuatan Media Vacin and Went (VW)	42
3.	Perhitungan Pembuatan Media New Phalaenopsis (NP)	43
4.	Gambar Denah Percobaan	44
5.	Hasil analisis ragam saat inisiasi embrio, tunas dan akar	45
6.	Hasil analisis ragam jumlah <i>explant</i> yang menghasilkan embrio pada berbagai umur pengamatan	46
7.	Hasil analisis ragam jumlah <i>explant</i> yang menghasilkan tunas pada berbagai umur pengamatan	48
8.	Hasil analisis ragam jumlah <i>explant</i> yang menghasilkan akar pada berbagai umur pengamatan	50
9.	Hasil analisis ragam jumlah daun, akar dan embrio pada akhir pengamatan (56 hari setelah subkultur)	52
10.	Hasil analisis ragam rerata diameter dan panjang akar pada akhir pengamatan (56 hari setelah subkultur)	53



DAFTAR ISTILAH

Aseptik	bebas dari segala bentuk mikroorganisme (jamur, bakteri, virus, dan sebagainya)
Autoklaf	alat yang cara kerjanya seperti presto / pressure cooker, digunakan untuk sterilisasi media dan alat – alat
Browning	pencoklatan yang terjadi karena teroksidasinya fenol dalam jaringan menjadi quinon saat sel luka / mengalami penuaan
Dormansi	masa istirahat benih saat tidak tumbuh dan berkembang, tetapi tidak mati
Embrio	tanaman yang sangat muda, berkembang dalam gametofit betina dengan atau tanpa pembuahan
Embrio somatic	embrio yang bukan berasal dari zigot, tetapi dari sel biasa dari tubuh tanaman
Embrio zigotik	embrio yang berasal dari zigot (perkawinan sel jantan dan betina)
Embriogenesis	proses terbentuknya embrio somatik
Endosperm	cadangan makanan untuk embrio dalam biji
Explant	organ atau sepotong jaringan yang digunakan untuk memulai kultur ; bahan tanam dalam kultur jaringan
In vitro	terpisah dari induk, tetapi dalam bahasa latin yang lebih tepat adalah di dalam gelas
Inisiasi	pembentukan struktur organ, seperti primordia akar atau pucuk
Inokulasi	meletakkan <i>explant</i> di dalam atau pada media nutrisi
Isolasi	pengambilan <i>explant</i> dari lapang
Kalus	kumpulan sel yang tidak teratur dan belum jelas fungsinya
Laminar air flow cabinet	kotak yang digunakan untuk inokulasi <i>explant</i> , LAFC harus dijaga agar tetap steril dengan mengalirkan udara steril secara teratur dengan arah horizontal. Dilengkapi juga dengan sinar ultraviolet.

Meristem	adalah jaringan muda, yaitu jaringan yang terdiri dari sel-sel yang selalu membelah, dindingnya tipis, belum mempunyai penebalan dari zat pektin, plasmanya penuh dan vakuolanya kecil-kecil
Morfogenesis	proses terjadinya organisasi serta bentuk – bentuk baru yang sebelumnya tidak ada
Multiplikasi	perbanyak tanaman pada saat telah mengalami pembesaran sel
Organogenesis	proses terbentuknya organ – organ seperti pucuk, akar, tunas, bunga, batang dan sebagainya.
Plantlet	tanaman lengkap hasil regenerasi dalam kultur jaringan
ppm	part per million; mg per liter larutan
Proliferasi	perbanyak dari bagian terkecil tanaman
Protocorm like bodies (PLB)	embrio pada anggrek yang belum terorganisasi, biasanya terbentuk dalam suatu kumpulan yang terdiri dari bulatan-bulatan kecil yang masing – masing dapat berkembang menjadi tanaman lengkap
Scalpel	pisau bedah kecil dan tajam yang digunakan untuk memotong bahan <i>explant</i>
Steril	bebas mikroorganisme
Sterilisasi	proses eliminasi mikroorganisme, misalnya secara kimiawi, panas, radiasi, penyaringan dan sebagainya.
Subkultur	pemindahan kultur ke media lain baik media yang sama ataupun yang lain
totipotensi	total genetic potential ; bahwa setiap sel tanaman yang hidup dilengkapi dengan informasi genetik dan perangkat fisiologis yang lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh, jika kondisinya sesuai

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang luar biasa, salah satunya ialah anggrek. Anggrek ialah salah satu tanaman yang banyak diminati para penggemar tanaman hias. Hal ini dikarenakan anggrek mempunyai berbagai macam spesies yang berasal dari genus yang berbeda. Warna dan coraknya yang bervariasi menjadi daya tarik tersendiri.

Diperkirakan sekitar 5000 jenis anggrek spesies tersebar di hutan wilayah Indonesia. Potensi ini sangat berharga bagi pengembang dan pecinta anggrek di Indonesia, khususnya potensi genetik untuk menghasilkan anggrek silangan yang memiliki nilai komersial tinggi. Potensi tersebut akan menjadi tidak berarti manakala penebangan hutan dan eksploitasi besar-besaran terjadi di hutan kita, belum lagi pencurian terang-terangan ataupun terselubung dengan dalih kerja sama dan sumbangan penelitian baik oleh masyarakat kita maupun orang asing.

Permintaan pasar akan bunga anggrek khususnya *Phalaenopsis* baik di dalam maupun luar negeri sangat banyak, sementara hanya sebagian kecil pihak yang mampu melakukan pengembangan dan pemanfaatan anggrek bulan. Pada tahun 2000 permintaan akan bunga anggrek mencapai 1,598 juta tanaman (Anonymous, 2011). Tetapi para pengusaha di Indonesia belum sanggup memenuhi permintaan tersebut. Tidak dipungkiri bahwa metode terbaik hingga saat ini dalam pelestarian dan perbanyakan anggrek ialah dengan kultur jaringan, karena melalui kultur jaringan banyak hal yang menguntungkan dibandingkan dengan metode konvensional, misalnya dapat dihasilkan dalam jumlah besar dan bebas penyakit.

Prinsip kultur jaringan ada dua. Pertama mengisolasi (memisahkan) bagian tanaman dari tanaman induk. Kedua menumbuhkan dan mengembangkan bagian tanaman tersebut dalam media yang kondisinya mendorong pertumbuhan bagian tanaman. Kedua prinsip tersebut dilakukan dalam kondisi suci hama dan mikroorganisme (aseptik). Ini berarti bahwa kultur jaringan harus bebas dari

bakteri, jamur dan kontaminan lain. Kontaminasi oleh organ mikro merupakan suatu masalah penting. Oleh karenanya diperlukan ketelitian dan keahlian karena media yang dipakai untuk pertumbuhan bagian tanaman yang dikultur juga amat baik untuk pertumbuhan organ mikro lain. (Wardiyati,1998)

Keberhasilan kultur jaringan dipengaruhi berbagai macam faktor. Antara lain media yang digunakan, jenis *explant*, lingkungan kerja dan juga jenis zat pengatur tumbuh yang diberikan. Pemilihan jenis media dan pemberian zat pengatur tumbuh yang kurang tepat dapat mengakibatkan kegagalan pada pertumbuhan *explant* yang ditanam. Menurut Gunawan (1988), media kultur jaringan tanaman menyediakan tidak hanya unsur hara makro dan mikro, tetapi juga karbohidrat untuk pertumbuhan. Hasil yang baik akan didapat, bila dalam media tersebut ditambahkan vitamin, asam amino dan zat pengatur tumbuh. Dalam kultur jaringan zat pengatur tumbuh yang sangat penting ialah auksin dan sitokinin. Kedua zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan dan organ. Perbedaan konsentrasi auksin dan sitokinin yang diberikan serta hormon yang diproduksi oleh sel secara endogen akan menentukan arah perkembangan hasil kultur. Penambahan auksin atau sitokinin eksogen dapat mengubah level zat pengatur tumbuh endogen sel. Salah satu zat pengatur tumbuh dari golongan auksin ialah NAA (*Naphtalene Acetic Acid*), sedangkan dari golongan sitokinin ialah BA (*Benzyl Adenine*). Hendaryono dan Wijayani (1994) menambahkan bahwa NAA dan 2,4 D merupakan golongan auksin sintesis yang mempunyai sifat lebih stabil dibanding IAA, karena tidak mudah terurai oleh enzim – enzim yang dikeluarkan oleh sel atau pemanasan pada proses sterilisasi. Kombinasi unsur makro, mikro dan zat pengatur tumbuh tertentu sangat berpengaruh pada perbanyakan tanaman secara *in vitro*.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis media, konsentrasi zat pengatur tumbuh *Benzyl Adenine* (BA) dan kombinasinya yang terbaik untuk pertumbuhan dan perbanyakan embrio atau *protocorm like bodies* (PLB) anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis*).

1.3 Hipotesis

1. Terdapat interaksi antara komposisi media dasar dengan konsentrasi *Benzyl Adenin* yang ditambahkan.
2. Media dasar mempengaruhi proliferasi embrio dan perkembangan *explant*.
3. Semakin tinggi konsentrasi *Benzyl Adenin* yang ditambahkan semakin banyak embrio yang terbentuk.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pembibitan tanaman anggrek

Tanaman anggrek dapat diperbanyak dengan cara vegetatif maupun generatif, baik secara konvensional maupun modern. Perbanyak secara generatif ialah penyebaran biji di lapangan dan penebaran biji dalam botol, sedangkan perbanyak secara vegetatif ialah stek, tunas akar, bulb dan melalui kultur jaringan bagian tanaman. Perbanyak secara stek, tunas akar dan bulb hanya dapat dilakukan pada beberapa jenis anggrek tertentu. Perbanyak vegetatif modern pada anggrek dapat juga dilakukan dengan kultur jaringan mata tunas. Namun penanaman mata tunas secara utuh dalam media VW (*Vacint and Went*) baik cair maupun padat, hanya akan menghasilkan satu plantlet saja. Saat ini perbanyak yang umum dilakukan adalah dengan biji. Arditti (2008) menuliskan biji anggrek sulit berkecambah di alam terbuka karena faktor lingkungan (terutama kelembaban yang tinggi) kurang mendukung dan biji anggrek tidak mempunyai banyak cadangan makanan. Menurut Pierik (1987) hal tersebut menyebabkan biji yang dihasilkan dari proses polinasi lebih baik dikecambahkan pada media *in vitro* atau yang biasa disebut kultur embrio.

Untuk melakukan kultur embrio, perlu dilakukan persilangan terlebih dahulu. Benang sari dari bunga tanaman (dapat yang sejenis atau beda varietas) diambil, kemudian dimasukkan dalam putik bunga induk. Apabila proses penyebukan berhasil, maka proses selanjutnya, yaitu penaburan biji pada media padat, dapat dilakukan. Biji yang ditabur harus diambil dari buah anggrek yang tepat masak. Karena kulit buahnya yang keras, maka sterilisasi buah dapat dilakukan dengan cara mekanik yaitu dengan membakarnya di atas api spiritus. Pelaksanaan pembakaran ini dilakukan di dalam entkas atau *Lamiar Air Flow Cabinet* (LAFC) (Hendaryono, 2000)

Perbanyak dengan biji pada anggrek akan menghasilkan anakan dengan variasi genotip yang cukup beragam. Variasi akan terjadi walaupun buah terbentuk melalui pembuahan *self* (pollen dari bunga sendiri). Variasi akan semakin banyak apabila buah dihasilkan dari persilangan antar jenis (Santoso dan Nursandi, 2001). Tetapi tanaman anggrek yang dihasilkan akan bernilai tinggi bila

berasal dari persilangan antara dua macam anggrek, yang masing – masing mempunyai warna bunga yang indah dan daya tahan yang tinggi terhadap penyakit maupun tekanan lingkungan (Hendaryono, 2000).

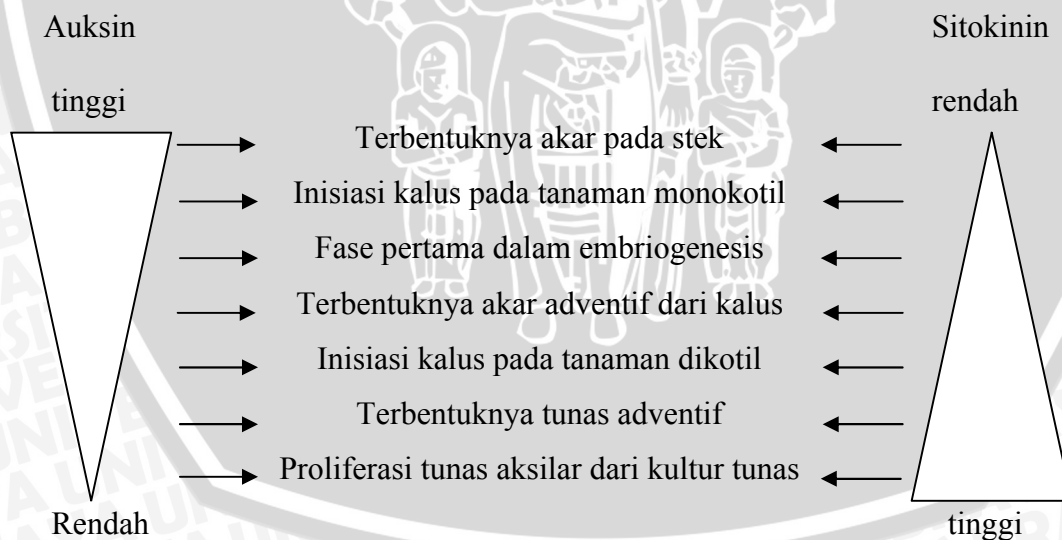
2.2 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah (<1 mM) mampu mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Santoso dan Nursandi, 2001). Abidin (1985) mengungkapkan bahwa zat pengatur tumbuh dalam tanaman (ZPT) terdiri dari lima kelompok yaitu Auksin, Giberelin, Sitokinin, Etilen dan Inhibitor dengan ciri khas serta pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis. Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam medium, pertumbuhan sangat terhambat bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali. Gunawan (1988) menambahkan bahwa dalam kegiatan kultur jaringan, zat pengatur tumbuh yang penting ialah auksin dan sitokinin. Faktor yang perlu diperhatikan dalam penggunaan zat pengatur tumbuh antara lain jenis zat pengatur tumbuh yang akan digunakan, konsentrasi, urutan penggunaan dan periode masa induksi dalam kultur tertentu.

Auksin alami pada tumbuhan ialah IAA. IAA disintesis dari triptofan di primordial daun, daun muda dan biji yang sedang berkembang. Translokasi di dalam daun tanaman terjadi melalui floem. Auksin sintetik terdiri dari IAA, IBA, NAA dan herbisida yang bersifat auksin. Herbisida tersebut ialah 2,4-D, 2,4-5T, Dicamba, Todong 4-CPA, Picloram dan lain - lain. Peran fisiologis auksin adalah mendorong pembesaran sel, penghambatan mata tunas samping, pertumbuhan sekunder (termasuk pembelahan sel di daerah kambium dan pembentukan jaringan xilem dan floem) tanaman serta pertumbuhan akar (Wattimena, 1988). George dan Sherrington (1984) menulis bahwa pengaruh auksin yang penting dalam kultur jaringan ialah untuk induksi kalus, pembentukan klorofil dan morfogenesis. Jenis auksin yang umum dipakai dalam media kultur jaringan ialah IAA (1 H-indole-3-acetic acid), IBA (1H-indole-3-butyric acid), 2,4-D (2,4-

dichloro-penoxy acetic acid) dan NAA (1-naphtalene acetic acid) (Wardiyati, 1998).

Zat pengatur tumbuh lain yang sangat berperan pada kultur jaringan ialah sitokinin. Fungsi sitokinin ialah mendorong pembelahan sel, perkembangan embrio, memperlambat proses penghancuran butir – butir klorofil pada daun yang terlepas dari tanaman dan memperlambat proses senescence pada daun, buah dan organ – organ lain. Santoso dan Nursandi (2001) mengungkapkan bahwa peran sitokinin dalam kultur jaringan ialah untuk proliferasi tunas, pembentukan tunas, mendorong proliferasi meristem ujung, menghambat pembentukan akar dan pembentukan klorofil pada kalus. Sitokinin yang biasa digunakan dalam kultur jaringan ialah thidiazuron, 2iP (6-y-y-dimetyl aminopurine), kinetin (N-2-furanylmethyl-1H-purine-6-amino), zeatin (6-4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylamino-purine) BAP (6-benzyl aminopurine) atau BA (6-benzyl adenin). Golongan sitokinin yang aktif ialah BAP dan Thidiazuron. Dalam jumlah yang sangat kecil (0,01 – 0,05 mg/liter), Thidiazuron berfungsi merangsang multiplikasi pucuk. Utami (2007) mendapatkan hasil bahwa pada NAA dengan konsentrasi 2 ppm dapat menghasilkan kalus anggrek bulan dalam jumlah tinggi.



Gambar 1. Pengaruh auksin dan sitokinin (Katuuk,1989)

2.3 Kultur Jaringan Tanaman Anggrek

Kultur Jaringan adalah metode isolasi bagian tanaman dan menumbuhkannya dalam media aseptik (Gunawan, 1988). Sedangkan Santoso

dan Nursandi (2001) mengungkapkan bahwa kultur jaringan tanaman adalah budidaya secara *in vitro* dari semua bagian tanaman, misalnya sel tunggal, jaringan atau organ di bawah lingkungan aseptik (bebas hama). Jadi prinsip utama teknik kultur jaringan adalah penanaman bagian tanaman pada kondisi steril.

Kultur jaringan telah berkembang di masyarakat secara umum. Dasar pelaksanaan kultur jaringan ialah kemampuan alamiah untuk memproduksi sendiri tanpa perkawinan sel jantan dan betina yang biasa disebut totipotensi (Mineo, 1990). Kegunaan kultur jaringan ialah untuk memperbanyak tanaman tertentu yang mempunyai nilai ekonomis tinggi atau merupakan tanaman yang langka dan sulit untuk dikembangkan secara generatif. Zulkarnain (2009) mengungkapkan bibit yang dihasilkan dari kultur jaringan mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan bibit hasil persilangan generatif atau memperbanyak secara vegetatif konvensional, antara lain bibit dihasilkan dalam jumlah banyak sehingga tidak membutuhkan tempat yang luas, mampu menghasilkan bibit dengan jumlah besar dalam waktu singkat, kesehatan dan mutu bibit lebih terjamin, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibandingkan memperbanyak generatif atau konvensional. Selain itu pada kalus beberapa jenis tanaman yang dikultur telah mengandung persenyawaan yang berguna bagi kesehatan, antara lain tapakdara (*Catharantus roseus*) menghasilkan indol alkaloid yang bermanfaat untuk obat anti leukimia, *Coptis japonica* menghasilkan berberin yang dapat digunakan sebagai obat antiseptik dan *Camptotheca* menghasilkan vindolin tabernanthin yang bermanfaat untuk anti tumor (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Dalam kultur jaringan, hampir seluruh bagian tanaman dapat digunakan sebagai bahan tanam (*explant*). Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan *explant* ialah jenis tanaman, bagian tanaman yang akan digunakan, morfologi permukaan, lingkungan tumbuh, musim waktu pengambilan, umur tanaman dan kondisi tanaman (Gunawan, 1988). *Explant* yang dapat digunakan untuk kultur jaringan anggrek bulan ialah bagian meristem, tunas, daun dan biji (Anonymous, 2002).

Awal kultur jaringan pada anggrek dimulai tahun 1922 saat Knudson berhasil mengecambahkan biji anggrek. Kemudian banyak penelitian lain untuk meningkatkan kualitas kultur pada anggrek dari semua bahan tanam. Kultur tunas

banyak diteliti oleh beberapa ahli, antara lain Ernst (1984, dalam Arditti and Ernst, 1993) yang menggunakan media REM dengan modifikasi. Ada pula Ball et al. (1874 – 1975, dalam Arditti and Ernst, 1993) menggunakan media Knop yang dimodifikasi untuk kultur mata tunas *Phalaenopsis*. Sedangkan Intuwong dan Sagawa (1974, dalam Arditti and Ernst, 1993) memperbanyak tanaman anggrek menggunakan potongan tangkai bunga dengan modifikasi media VW.

Teknik pertama yang digunakan pada perbanyakan vegetatif anggrek adalah kultur meristem. Morel pada tahun 1960 menggunakan teknik kultur meristem ini untuk memperoleh bibit bebas virus dari tanaman yang terinfeksi oleh virus. Teknik ini kemudian dikembangkan untuk perbanyakan vegetatif anggrek yaitu dengan cara mengkulturkan meristem, menumbuhkannya, membelahnya menjadi beberapa bagian, masing-masing bagian dikulturkan, sub kultur ini dilakukan berulang-ulang. Dengan teknik ini dapat diperoleh ratusan tanaman dari satu meristem. Kultur meristem ini merupakan salah satu teknik komersial pertama untuk perbanyakan vegetatif anggrek (David, 2009).

Kultur jaringan yang berasal dari biji disebut kultur embrio (Suarez dan Bozhkov, 2008). Gunawan (1988) mengungkapkan bahwa kultur embrio diperlukan untuk embrio yang mempunyai masalah, antara lain mempunyai masa dormansi yang panjang, embrio dengan endosperm rusak seperti kelapa kopyor, bahkan embrio tanpa endosperm seperti anggrek. Katuuk (1989) menyatakan biji anggrek perlu dikulturkan karena bijinya sangat halus dan mengandung sangat sedikit cadangan makanan, sehingga dapat mudah terbang dan kekurangan makanan cadangan dalam biji tidak mampu untuk mempertahankan hidupnya. Hendaryono (2000) menambahkan biji anggrek di alam dapat tumbuh (walau dalam presentase yang sangat kecil) karena adanya bahan – bahan organik yang disuplai oleh jamur *Micoryza* yang bersimbiosis dengan biji anggrek. Sivaprasad dan Sulochana (2011) menuliskan biji anggrek tidak akan tumbuh tanpa adanya simbiosis mutualisme dengan koloni *micoryza* yang juga disebut jamur akar. Oleh karena itu, diperlukan kultur embrio agar biji anggrek mendapatkan makanan sekaligus bahan organik yang diperlukan untuk berkecambah dan tumbuh ke fase selanjutnya.

2.4 Media Kultur Jaringan Anggrek

Jenis media untuk kultur jaringan ada bermacam – macam. Pemberian nama media disesuaikan dengan penemunya. Masing – masing media mempunyai spesifikasi kecocokan bagi jenis tanaman tertentu. Tanaman hortikultura baik diusahakan pada media *Murashige and Skoog* (MS), tetapi pada beberapa penelitian, ternyata anggrek lebih baik diusahakan dengan menggunakan media *Vacin and Went* (VW). Sedangkan belakangan ditemukan lagi media yang khusus untuk anggrek bulan dan diberi nama media *New Phalaenopsis* atau lebih dikenal dengan NP (Anonymous, 2011).

Penggunaan zat pengatur tumbuh memang sudah sering dilakukan, tetapi pemakaian yang berlebihan justru dapat merugikan dan malah menghambat pertumbuhan *explant*. Maka sebagai penggantinya, biasa digunakan hormon alami seperti air kelapa, kapri, taoge, pisang, kecambah sereal, kedelai, kacang panjang atau kecambah jagung dan beberapa macam bahan lain yang dapat digunakan sebagai hormon alami pada media agar.

Bahan lain yang perlu ditambahkan ke dalam media adalah arang tempurung kelapa (arang aktif atau *active charcoal*). Fungsi arang (berwarna hitam) dalam media adalah untuk melindungi zat pengatur tumbuh dari cahaya yang menembus botol transparan. Cahaya (baik yang berasal dari matahari ataupun lampu), dapat merusak beberapa komponen media seperti zat – zat yang terlarut di dalam media. Menurut George dan Sherrington (1984), peranan arang aktif adalah mengabsorpsi zat sekresi yang dapat mengakibatkan penghambatan pertumbuhan, mencegah penghambatan induksi kalus, merangsang morfogenesis dan embriogenesis, merangsang pembentukan akar dan mencuci permukaan jaringan yang dikulturkan dari media yang mengandung zat penghambat.

Jaringan tanaman yang mengandung tanin atau hidroksifenol dalam kadar tinggi, sering mengalami pencoklatan atau browning. Hal ini disebabkan karena teroksidasinya fenol menjadi quinon pada saat sel terluka atau mengalami penuaan (George dan Sherrington). Oksidasi fenol juga dirangsang oleh sinar yang menimpa *explant* maupun media tanam. Fenol ini dapat menjadi racun karena pengikatan hidrogen pada protein – protein. Akibat browning, sel menjadi berair dan mudah terserang bakteri atau jamur, sehingga akhirnya mati. Oleh

karena itu, penambahan arang aktif dapat menciptakan suasana gelap dan menghindarkan *explant* pada media terkena sinar secara langsung yang menyebabkan browning.

Ernst (1984) menggunakan media REM yang dimodifikasi untuk perbanyakan anggrek menggunakan mata tunas. REM ditambah dengan ZPT berupa *Benzlaminopurine* (BAP) sebanyak 25 mg.L^{-1} , gula sukrosa 25 g.L^{-1} dan agar 2 g.L^{-1} . Sedangkan Ball et al (1974 – 1975) menambahkan inositol sebanyak 100 mg.L^{-1} , Asam Amino (L-isoleucine) 13 mg.L^{-1} , Vitamin berupa thiamin HCl $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$, Anti Auksin (trans – Cinamic Acid) 148 mg.L^{-1} , *Benzyilaminopurine* (BAP) 20 g.L^{-1} , gula sukrosa sebanyak 20 g.L^{-1} dan agar 130 g.L^{-1} dalam media Knop untuk perbanyakan menggunakan tunas anggrek.

Intuwong dan Sagawa (1974) menambahkan air kelapa muda sebanyak 150 ml.L^{-1} , gula sukrosa 20 g.L^{-1} dan agar 9 g.L^{-1} dalam media VW untuk perbanyakan anggrek menggunakan potongan tangkai bunga. Sedangkan Widiastoety et al (2004) memodifikasi media VW dengan penambahan bubur pisang 50 g.L^{-1} dan thiamin $0,5 - 1 \text{ ppm}$ untuk memperbanyak anggrek oncidium. Anggrek Langka *Grammatophyllum scriptum* diperbanyak oleh Anggraeny (2004) dengan media VW yang ditambah madu sebanyak 6 ml dan ekstrak tauge 75%. Tokuhara dan Mii (2003) menggunakan kultur suspensi sel pada New Dogashima Medium (NDM) dengan sumber karbohidrat berupa glukosa $58,4 \text{ mM}$ untuk memperbanyak embrio yang muncul dari anggrek *Doritaenopsis*. Kalimutu et al., (2006) menggunakan media MS dengan penambahan BAP sebanyak 2 ppm pada media perbanyakan anggrek oncidium.

2.5 Teknik Penaburan Biji

2.5.1 Penaburan dengan Metode Cair

Penaburan dengan metode cair terbagi menjadi 2 yaitu metode cair diam dan metode cair bergerak.

Metode cair diam digunakan dengan menggunakan bantuan kertas saring sebagai penyangga serta penyedia nutrisi melalui perembesan media cair ke dalam kertas saring tersebut. Buah anggrek yang telah disterilisasi secara mekanik (dicelup spiritus dan dibakar dengan api lampu bunsen sebanyak tiga kali),

dibelah di atas petridish. Biji – biji diambil dengan pinset, diletakkan di atas kertas saring secukupnya dan ditutupi aluminium foil. Pengisian botol atau tabung reaksi dengan media diusahakan jangan terlalu banyak, sehingga kertas saring tidak tenggelam. Kertas saring bagian bawah yang menyentuh bagian dasar botol akan merembeskan nutrisi ke bagian atas, sehingga biji akan berada di bagian atas kertas yang basah. Keuntungan dari metode ini adalah biji dapat tumbuh lebih cepat dari pada metode lain. Namun kelemahannya, hanya akan diperoleh bibit angrek sebanyak biji yang ditaburkan.

Perbanyak menggunakan metode cair bergerak membutuhkan alat penggojog (*shaker*). Adanya penggojogan memungkinkan nutrisi dapat terserap merata ke biji. Tujuan pengocokan antara lain membantu agar permukaan *explant* dapat menyerap nutrisi secara merata, menunda pertumbuhan organ (tunas daun dan akar) karena keadaan yang bergerak terus menerus akan memacu terjadinya pembelahan sel secara terus menerus, mengeluarkan zat ekskresi sel yang dihasilkan melalui proses metabolisme dalam bentuk gas.

2.5.2 Penaburan dengan metode padat

Buah yang akan ditanam disterilisasi terlebih dahulu. Kemudian dibelah memanjang dengan scalpel steril yang tajam, sehingga terlihat biji angrek berwarna putih dalam jumlah sangat banyak yang berukuran sangat kecil menyerupai serbuk. Biji diambil dengan pinset panjang kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi media padat. Biji ditaburkan di atas media padat dengan cara mengetuk-ngetuk bagian atas pinset dengan telunjuk sehingga biji berjatuh di atas media. Supaya biji dapat jatuh secara merata di atas permukaan media, maka saat pinset diketuk, pinset digerakkan mengitari botol. Bila penaburan selesai, botol segera ditutup dengan penutup botol yang terbuat dari karet.

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2010 sampai dengan Februari 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan di Nursery “Venus Orchid”, Jl. Supit Urang Dsn. Kraguman Desa Tegalweru, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini ialah timbangan analitik, oven, aquadestilator, lemari es, autoklaf, pH meter, kompor gas, sendok plastik, penggaris, tabung volumetrik, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, botol kultur, pipet, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), scalpel, gunting, pinset, petridish, bunsen, kamera digital, lampu TL 40 watt, AC dan timer.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah embrio atau plb (*protocorm like bodies*) bunga anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis*) warna putih (gambar 2), media $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog (1/2 MS), media Vacin and Went (VW), media New Phalaenopsis (NP).



Gambar 2. a. tanaman anggrek bulan; b. embrio calon *explant*

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menguji beberapa jenis media yang dikombinasikan dengan berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh BA (*Benzyl*

Adenin). Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial yang terdiri dari 2 faktor yang dikombinasikan menjadi 12 perlakuan dengan 3 kali ulangan dan setiap botol kultur berisi 5 embrio.

Perlakuan yang dicobakan adalah :

Tabel 1. perlakuan yang dicobakan

BA \ media	½ MS	VW	NP
0 ppm	½ MS ; BA 0 ppm (M1B1)	VW ; BA 0 ppm (M2B1)	NP ; BA 0 ppm (M3B1)
0,5 ppm	½ MS ; BA 0,5 ppm (M1B2)	VW ; BA 0,5 ppm (M2B2)	NP ; BA 0,5 ppm (M3B2)
1 ppm	½ MS ; BA 1 ppm (M1B3)	VW ; BA 1 ppm (M2B3)	NP ; BA 1 ppm (M3B3)
1,5 ppm	½ MS ; BA 1,5 ppm (M1B4)	VW ; BA 1,5 ppm (M2B4)	NP ; BA 1,5 ppm (M3B4)

Keterangan : ½ MS = media ½ Murashige and Skoog ; VW = media Vacin and Went ; NP = New Phalaenopsis

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi alat dan bahan bertujuan untuk meminimalisir adanya kontaminasi baik oleh jamur maupun bakteri. Alat yang perlu disterilisasi ialah botol kultur, petridish, gunting, scalpel dan pinset. Cara sterilisasi berbeda – beda tergantung jenis alat yang digunakan. Untuk botol kultur, sterilisasi dilakukan dalam oven pada suhu 80° C selama 5 jam. Petridish, pinset, gunting dan scalpel disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 psi selama 25 menit. Sebelum digunakan, pinset, gunting dan scalpel dicelupkan ke dalam alkohol 96% lalu dibakar di atas bunsen. Sedangkan petridish ditetesi alkohol 96% kemudian dibakar.

Selain alat – alat tersebut, *laminar air flow cabinet* juga harus disterilisasi sebelum digunakan. Sterilisasi dilakukan dengan cara menyemprotkan alkohol 75% pada permukaan di dalam *laminar air flow cabinet* kemudian mengeringkannya dengan tissue bersih.

Bahan – bahan yang disterilisasi ialah media tanam. Sterilisasi dilakukan dalam autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 psi selama 25 menit. Perlu diperhatikan bahwa penghitungan waktu baru dimulai pada saat suhu telah

mencapai 121° C (tekanan 15 psi). Untuk mengontrol kestabilan suhu dan tekanan, maka besar kecil api harus disesuaikan sehingga suhu dan tekanan tidak melebihi batas. Apabila dalam proses sterilisasi, suhu dan tekanan melebihi batas, gula akan membatu sehingga dapat menjadi racun dalam media, garam akan mengendap dan terjadi dipolimerisasi agar, pH turun sekitar 0,3 – 0,5 unit serta dapat merusak substansi yang mudah menguap, seperti etherel dan ethylene (Katuuk,1989) .

3.4.2 Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok bertujuan untuk memudahkan penimbangan bahan kimia yang dibutuhkan dalam media, terlebih untuk bahan kimia yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit. Ada 5 macam larutan stok yang akan dibuat yaitu stok hara makro, hara mikro, Fe-EDTA, vitamin, zat pengatur tumbuh dan myo-inositol. Larutan stok hara makro dibuat dengan kepekatan 10x, larutan stok vitamin dibuat dengan kepekatan 1000x, sedangkan larutan stok lain dibuat dengan kepekatan 100x.

Langkah awal ialah menimbang masing – masing bahan kimia sesuai kebutuhan. Kemudian satu per satu dilarutkan dengan aquadest. Bahan kimia digolongkan masing – masing sesuai jenis larutan stok dan dicampur menjadi satu sesuai dengan nama larutan stok. Langkah selanjutnya ialah menambahkan aquadest sampai volume yang diinginkan. Untuk stok Fe-EDTA harus dipanaskan terlebih dahulu karena sukar larut dan disimpan dalam botol gelap untuk menghindari kerusakan karena cahaya.

Pembuatan larutan stok zat pengatur tumbuh NAA dan BA harus dilarutkan terlebih dahulu dengan beberapa tetes NaOH 1 M sampai larut kemudian ditambahkan aquadest sampai volume yang diinginkan. Untuk membuat larutan stok 100 ppm maka dibutuhkan 0,01 g dalam 100 ml aquadest.

Masing – masing larutan stok yang telah dibuat diletakkan dalam botol berbeda dan ditutup rapat. Botol diberi label yang berisi nama larutan, tanggal pembuatan serta kepekatan. Larutan stok disimpan dalam lemari es dengan suhu 5–10° C. Larutan stok yang telah mengendap dan terkontaminasi tidak boleh digunakan lagi.

3.4.3 Pembuatan media tanam

Salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan kultur jaringan ialah media tanam. Media tanam yang akan dibuat adalah media jenis Murashige and Skoog (MS), Vacin and Went (VW) dan New Phalaenopsis (NP). Formulasi masing – masing media adalah sebagai berikut :

Tabel 2. Komposisi media dasar

	Senyawa	Kebutuhan untuk masing – masing media (mg.L ⁻¹)		
		Murashige and Skoog (MS)	Vacin and Went (VW)	New Phalaenopsis (NP)
Makro	NH ₄ NO ₃	1650	-	424,6
	KNO ₃	1900	525	637,6
	MgSO ₄ •7H ₂ O	170	250	-
	KH ₂ PO ₄	370	250	32
	CaCl ₂ •2H ₂ O	440	-	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	500	462,7
	Ca(NO ₃) ₂	-	-	256,4
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	-	200	-
Mikro	MnSO ₄ •4H ₂ O	22,30	5,75	11,5
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	8,6	-	4,3
	H ₃ BO ₃	6,20	-	3,1
	KI	0,83	-	0,125
	CuSO ₄ •5H ₂ O	0,025	-	0,0125
	CoCl ₂ •6H ₂ O	0,025	-	0,0125
	Na ₂ MoO ₄ •5H ₂ O	0,25	-	-
Fe	NaEDTA•2H ₂ O	37,3	-	37,3
	FeSO ₄ •7H ₂ O	27,8	28	27,8
Vitamin	Glycine	2	-	2
	Myo-inositol	100	-	100
	Thiamine	0,1	-	0,1
	Pyridoxine	0,5	-	0,5
	Nicotinic acid	0,5	-	0,5
Tambahan	Sukrosa	30000	20000	20000
	Agar	6500	9000	6000
	Yeast extract	-	-	2000
	Charcoal	-	-	1000

ZPT yang ditambahkan pada masing – masing media dasar adalah *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) 0,5 ppm.

Yang harus dilakukan ialah menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan, terutama sukrosa dan agar. Perlu diingat bahwa alat – alat yang digunakan harus melalui proses sterilisasi terlebih dahulu. Sukrosa dan agar harus ditimbang

terlebih dahulu sesuai kebutuhan sebelum mencampur larutan stok. Untuk menghitung larutan stok yang diperlukan adalah menggunakan metode pengenceran sebagai berikut :

$$V1.C1 = V2.C2$$

Keterangan :

V1 : volume yang dicari yaitu banyaknya larutan stok yang akan diambil

V2 : volume media yang akan dibuat

C1 : konsentrasi larutan stok yang dibuat

C2 : konsentrasi media

Atau dengan menggunakan cara untuk kebutuhan larutan stok untuk media tanam adalah :

$$\text{Volume larutan diambil (ml)} = \frac{\text{Konsentrasi x volume media yang dibuat (ml)}}{\text{Perbesaran larutan induk}}$$

$$\text{Volume ZPT diambil (ml)} = \frac{\text{ZPT dalam media x volume media (ml)}}{\text{Konsentrasi stok ZPT}}$$

Masing – masing larutan stok yang telah dibuat, disiapkan dan diukur sesuai kebutuhan dan dicampur jadi satu dalam gelas ukur. Kemudian ditambahkan aquadest sampai setengah volume yang diperlukan. larutan yang telah dibuat diukur pHnya 5,4 menggunakan pH meter. Apabila pHnya kurang dari 5,4 maka ditambahkan NaOH 1M dan apabila pH lebih dari 5,4 maka ditambahkan HCl 1M sampai pH meter menunjukkan angka 5,4.

Sedangkan sukrosa dicampur dengan aquadest setengah volume sisanya. Sukrosa ditimbang sesuai takaran masing – masing media, lalu diaduk sampai larut dan ditambah aquadest sampai dengan volume yang diinginkan. Saat akan mendidih, agar dimasukkan sedikit demi sedikit. Campuran sukrosa dan agar dididihkan sambil terus diaduk sehingga agar tidak menggumpal. Bila larutan telah mendidih, maka pemanasan dihentikan. Kemudian campurkan larutan sukrosa dan agar dengan larutan awal yang telah dibuat.

Media dimasukkan dalam botol kultur masing – masing 25 ml dan segera ditutup. Media dalam botol kultur disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 15 psi dengan suhu 121° C selama 25 menit. Waktu mulai dihitung setelah suhu dan tekanan mencapai yang diperlukan. Media yang sudah steril disimpan pada rak kultur selama 3 hari sebelum digunakan. Tujuannya ialah melihat kesterilan media yang dapat terlihat dari munculnya kontaminasi pada media (Yusnita,2003).

3.4.4 Inokulasi

Proses inokulasi ialah proses penanaman *explant* steril ke media in vitro yang dilakukan dalam *laminar air flow cabinet* (L AFC). 1 jam sebelum digunakan, L AFC harus disterilisasi dahulu menggunakan sinar ultraviolet untuk mengurangi mikroorganisme. Setelah 1 jam, ultraviolet dimatikan dan blower serta lampu dihidupkan. Blower dan lampu akan terus menyala selama proses inokulasi. Bila di tengah proses inokulasi terjadi lampu mati, maka inokulasi harus dihentikan karena tanpa lampu dan blower mikroorganisme akan masuk dalam L AFC sehingga kemungkinan terjadi kontaminasi semakin besar.

Sebelum digunakan, L AFC yang telah di blower selama 15 menit dibersihkan dahulu menggunakan kapas yang disemprot alkohol 70%. Semua peralatan yang akan dimasukkan dalam L AFC juga harus disemprot menggunakan alkohol 70%. Setelah berada dalam L AFC, alat – alat seperti pinset, gunting dan scalpel dicelupkan ke dalam alkohol 96% lalu dibakar di atas bunsen. Tangan pekerja juga disemprot alkohol 70% kemudian baru boleh masuk dalam L AFC. Usahakan seluruh bagian tangan yang masuk dalam L AFC telah dicuci dengan sabun dan disemprot alkohol 70 % secara merata.

Botol media dibuka penutupnya. Kemudian uap air dalam botol dibuang dengan cara membalik botol dan memanasi leher botol. *Explant* yang sudah dipisahkan dari massa PLB ditanam ke dalam media dengan cara memegang botol secara horizontal lalu menancapkan *explant* tegak lurus dan agak dalam pada media. Setelah *explant* ditanam, tutup dipanaskan sebentar lalu ditutupkan pada botol kultur. Botol media yang telah ditanami *explant* dibawa keluar dari L AFC dan diberi label. Hasil inokulasi diletakkan pada rak kultur dan diinkubasi pada suhu 22° C dengan lama penyinaran 16 jam tiap hari.

3.4.5 Subkultur

Sub kultur ialah pemindahan *explant* dari media satu ke media yang lain. Sub kultur dilakukan karena beberapa sebab, antara lain terjadi kontaminasi media, pencoklatan (*browning*), pertumbuhan *explant* telah memenuhi botol atau apabila pertumbuhan *explant* terhenti. Pertumbuhan *explant* dalam botol terhenti karena nutrisi pada media telah habis, sehingga diperlukan media baru. Pada penelitian ini, sub kultur dilakukan dengan tujuan mengatasi pencoklatan dan kontaminasi pada media. Sub kultur dilakukan sesuai kebutuhan dengan mengganti media baru yang komposisinya sama dengan komposisi media awal. Proses subkultur untuk *explant* yang mengalami pencoklatan dilakukan dengan cara membersihkan *explant* dari bagian yang coklat (biasanya bagian yang ditanam pada media) menggunakan scalpel dengan perlahan dan hati – hati. Sedangkan *explant* yang berasal dari media terkontaminasi ditanam langsung pada media bersih. *Explant* yang dapat digunakan adalah *explant* yang belum terkontaminasi. Kemudian *explant* ditanam dalam media dan disimpan di ruangan bersuhu 22°C dengan lama penyinaran 16 jam setiap hari.

3.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan setelah inokulasi yang didasarkan pada pengamatan secara visual yang meliputi :

1. Persentase hidup *explant* yang didapat dengan cara menghitung jumlah *explant* yang tumbuh dibagi dengan jumlah *explant* kali 100 % diamati setiap hari sampai akhir pengamatan.
2. Saat inisiasi *protocrom like bodies* (PLB) atau embrio diamati setiap hari sampai terbentuk *protocrom like bodies* (PLB) atau embrio
3. Saat inisiasi tunas diamati setiap hari sampai terbentuk tunas.
4. Saat inisiasi akar diamati setiap hari sampai terbentuk akar.
5. Jumlah *explant* yang semakin banyak membentuk *protocrom like bodies* (PLB) atau embrio pada umur 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 dan 56 hari setelah subkultur.
6. Jumlah *explant* yang tumbuh tunas pada umur 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 dan 56 hari setelah subkultur.

7. Jumlah *explant* yang tumbuh akar pada umur 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 dan 56 hari setelah subkultur.
8. Jumlah *protocrom like bodies* (PLB) atau embrio yang terbentuk pada 56 hari setelah subkultur.
9. Jumlah daun yang terbentuk pada 56 hari setelah subkultur.
10. Jumlah akar yang terbentuk pada 56 hari setelah subkultur.
11. Diameter dan panjang akar pada 56 hari setelah subkultur

3.6 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji F pada taraf 5%. Apabila terdapat pengaruh yang nyata, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

1. Presentase Hidup *explant*

Presentase hidup *explant* diamati sejak awal inokulasi sampai dengan akhir pengamatan yaitu 56 hari setelah inokulasi. *Explant* yang masih hidup dicirikan dengan warna yang tetap hijau segar. Sedangkan *explant* yang berwarna coklat atau hitam (tidak hijau segar seperti saat inokulasi) menandakan jaringannya telah mati. Dari data hasil pengamatan pada tabel 3 menunjukkan bahwa presentase hidup *explant* pada perlakuan $\frac{1}{2}$ MS tanpa penambahan BA, dengan dikombinasikan BA 0.5 ppm dan kombinasi dengan BA 1 ppm adalah 100%. Sedangkan pada perlakuan $\frac{1}{2}$ MS yang dikombinasikan dengan BA 1.5 ppm *explant* yang hidup sebanyak 80 %.

Tabel 3. Presentase hidup *explant* sampai akhir pengamatan

Konsentrasi BA \ Media	Media $\frac{1}{2}$ MS	Media VW	Media NP
BA 0	100 %	76.67 %	100 %
BA 0.5 ppm	100 %	100 %	100 %
BA 1 ppm	100 %	76.67 %	100 %
BA 1.5 ppm	80 %	100 %	100 %

Perlakuan VW tanpa penambahan BA dan VW yang dikombinasikan dengan BA 1 ppm mempunyai presentase hidup *explant* sebesar 76.67 %, sedangkan media VW yang dikombinasikan dengan BA 0.5 ppm dan kombinasi dengan BA 1.5 ppm mempunyai presentase hidup yang lebih tinggi yaitu 100 %. Pada perlakuan media NP yang dikombinasikan dengan semua konsentrasi BA mendapatkan presentase hidup *explant* yang seragam yaitu 100 %. Kematian pada *explant* disebabkan adanya kontaminasi (jamur atau bakteri) dan pencoklatan (*browning*). Pada perlakuan media $\frac{1}{2}$ MS yang dikombinasikan dengan BA 1.5 ppm terdapat 3 *explant* yang mengalami pencoklatan pada 6 dan 15 hss. Sedangkan pada perlakuan media VW tanpa BA dan media VW yang dikombinasikan dengan BA 1 ppm terjadi kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri. Kontaminasi bakteri muncul pada *explant* atau media antara 3 hss sampai 14 hss. Tetapi secara keseluruhan, *explant* yang digunakan bebas dari bakteri dan jamur karena telah berasal dari massa PLB yang bersih.

2. Saat inisiasi embrio

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi yang nyata antara jenis media dasar dengan konsentrasi BA pada rata – rata saat inisiasi embrio (Lampiran 5). Rata – rata saat inisiasi embrio disajikan pada tabel 4.

Tabel 4. Rerata saat inisiasi embrio

Perlakuan	Rerata saat inisiasi embrio (hss)
M1 (media ½ MS)	13.13
M2 (media VW)	17.62
M3 (media NP)	15.22
BNT 5%	tn
B1 (0 ppm)	13.00
B2 (0.5 ppm)	9.81
B3 (1 ppm)	18.72
B4 (1.5 ppm)	19.37
BNT 5%	tn

Keterangan: tn= tidak nyata; hss= hari setelah subkultur

3. Saat inisiasi tunas

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi yang nyata antara jenis media yang digunakan dengan konsentrasi BA pada rata – rata saat inisiasi tunas (Lampiran 5). Rata – rata saat inisiasi tunas disajikan pada tabel 5.

Tabel 5. Rerata saat inisiasi tunas

Perlakuan	Rerata Saat Inisiasi Tunas (hss)
M1 (media ½ MS)	23.08
M2 (media VW)	23.47
M3 (media NP)	24.50
BNT 5%	tn
B1 (0 ppm)	22.95
B2 (0.5 ppm)	21.93
B3 (1 ppm)	24.43
B4 (1.5 ppm)	25.58
BNT 5%	tn

Keterangan: tn= tidak nyata; hss= hari setelah subkultur

4. Saat inisiasi akar

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi yang nyata

antara jenis media yang digunakan dengan konsentrasi BA pada rata – rata saat inisiasi akar (Lampiran 5). Rerata saat inisiasi akar disajikan pada tabel 6.

Tabel 6. Rerata saat inisiasi akar

Perlakuan	Rerata saat Inisiasi Akar (hss)
M1 (media ½ MS)	40.91
M2 (media VW)	38.54
M3 (media NP)	32.57
BNT 5%	tn
B1 (0 ppm)	33.30
B2 (0.5 ppm)	38.39
B3 (1 ppm)	39.14
B4 (1.5 ppm)	38.45
BNT 5%	tn

Keterangan: tn= tidak nyata; hss= hari setelah subkultur

5. Jumlah *explant* yang membentuk embrio baru

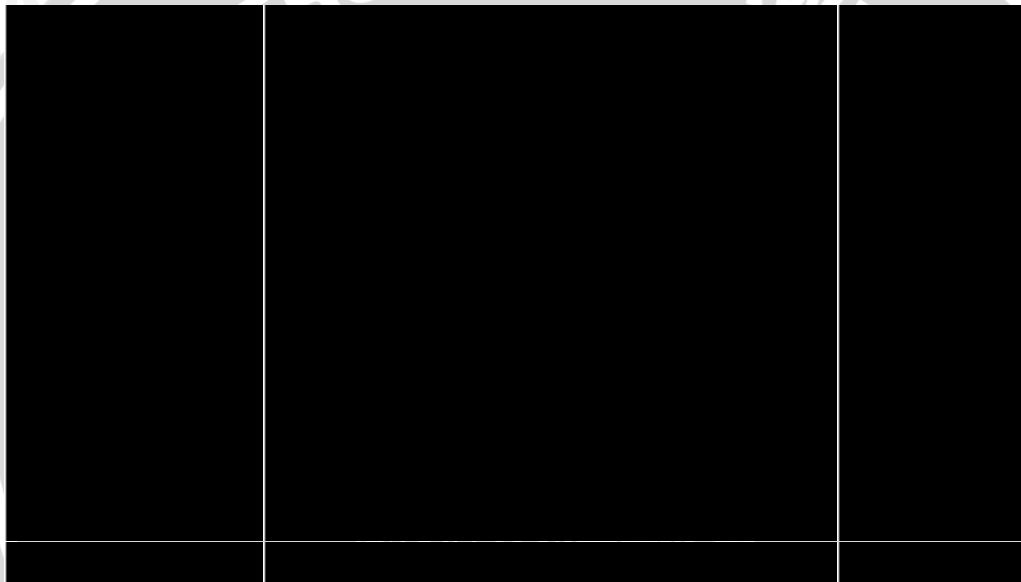
Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara perlakuan jenis media dengan konsentrasi BA yang ditambahkan, tetapi perbedaan konsentrasi BA menunjukkan pengaruh yang nyata pada rerata jumlah *explant* yang membentuk embrio pada semua umur tanaman (Lampiran 6). Rerata jumlah *explant* yang membentuk embrio disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Rerata jumlah *explant* yang membentuk embrio pada berbagai umur pengamatan

Perlakuan	Rerata jumlah eksplan yang membentuk embrio pada berbagai umur eksplan (hss)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
M1 (media ½ MS)	0.67	1.58	2.42	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75
M2 (media VW)	0.50	1.50	1.80	2.20	2.30	2.30	2.40	2.40
M3 (media NP)	0.50	1.75	2.67	3.00	3.08	3.08	3.08	3.17
BNT 5%	tn	tn	tn	tn	tn	tn	tn	tn
B1 (0 ppm)	0.78 ab	2.50 ab	3.50 b	3.75 b	3.75 b	3.75 b	3.75 b	3.75 b
B2 (0.5 ppm)	1.43 b	3.13 b	3.56 b	3.89 b	3.89 b	3.89 b	3.89 b	3.89 b
B3 (1 ppm)	0.22 ab	0.88 ab	1.63 ab	2.13 ab	2.25 ab	2.25 ab	2.38 ab	2.50 ab
B4 (1.5 ppm)	0 a	0.33 a	0.67 a	1.00 a	1.11 a	1.11 a	1.11 a	1.11 a
BNT 5%	1.35	2.3	2.06	2.3	2.26	2.26	2.28	2.33

Keterangan : Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%; hss= hari setelah subkultur; tn= tidak nyata

Berdasar Tabel 7 dapat dijelaskan bahwa pada 7 hss semua *explant* yang ditanam pada media dengan konsentrasi BA 1.5 ppm belum membentuk embrio baru. Sedangkan *explant* pada media dengan konsentrasi BA 1 ppm telah ada yang membentuk embrio baru, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan BA 1.5 ppm dan perlakuan tanpa penambahan BA. Media yang ditambah BA 0.5 ppm menghasilkan rerata jumlah *explant* yang membentuk embrio baru tertinggi tetapi tidak berbeda nyata dengan media tanpa tambahan BA dan media yang ditambah BA sebanyak 1 ppm. Pada 14 hss semua perlakuan telah menghasilkan embrio baru dengan jumlah yang bervariasi tetapi tidak ada perbedaan nyata antara perlakuan BA 1 ppm dengan BA 1.5 ppm.



Gambar 3. Jumlah *explant* yang membentuk embrio tiap pengamatan

Berdasar gambar 3, pertambahan jumlah *explant* yang membentuk embrio sangat tinggi pada perlakuan BA 0.5 ppm dan tanpa penambahan BA, walaupun jika dilihat pada tabel 7 tidak berbeda nyata antara kedua perlakuan tersebut. Jumlah *explant* yang membentuk embrio pada perlakuan BA 0.5 ppm dan tanpa BA terus bertambah sampai umur 28 hss, kemudian tidak ada lagi *explant* yang membentuk embrio sampai akhir pengamatan. Sedangkan pada perlakuan BA 1 ppm *explant* yang membentuk embrio terus bertambah kecuali pada 35 hss dan 42 hss yang jumlahnya sama, kemudian bertambah pada 49 hss dan 56 hss. Pada perlakuan BA 1.5 ppm, jumlah *explant* yang membentuk embrio terus bertambah sampai 35 hss, kemudian stabil (tidak ada pertambahan jumlah).

6. Jumlah *explant* yang menghasilkan tunas

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak ada interaksi yang nyata antara perlakuan jenis media dengan konsentrasi BA, tetapi perbedaan konsentrasi BA menunjukkan pengaruh nyata pada rerata jumlah *explant* yang membentuk tunas pada 35 hss sampai 56 hss (Lampiran 7). Rerata jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada semua umur pengamatan yang disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Rerata jumlah *explant* yang membentuk tunas pada berbagai umur pengamatan

Perlakuan	Rerata jumlah <i>explant</i> yang menghasilkan tunas pada berbagai umur pengamatan (hss)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
M1 (media ½ MS)	0.25	0.25	1.17	1.33	1.92	2.25	2.25	2.25
M2 (media VW)	0.30	0.30	0.70	1.70	2.20	2.20	2.20	2.30
M3 (media NP)	0.33	0.75	1.33	2.00	2.75	3.17	3.17	3.33
BNT 5%	tn	tn	tn	tn	tn	tn	tn	tn
B1 (0 ppm)	0.63	1.13	1.88	2.38	3.71 b	4.14 b	4.14 b	4.43 b
B2 (0.5 ppm)	0.25	0.25	1.00	2.00	2.11 ab	2.50 ab	2.50 ab	2.50 ab
B3 (1 ppm)	0	0.13	0.63	1.00	1.00 a	1.22 a	1.22 a	1.22 a
B4 (1.5 ppm)	0.33	0.33	1.00	1.56	3.00 ab	3.00 ab	3.00 ab	3.11 ab
BNT 5%	tn	tn	tn	tn	2.40	2.46	2.46	2.38

Keterangan : Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%; hss = hari setelah subkultur; tn = tidak nyata

Berdasar Tabel 8 dapat dijelaskan bahwa pada pengamatan ke 5 (35 hss) rerata jumlah *explant* yang membentuk tunas yang paling banyak adalah pada perlakuan tanpa penambahan BA (B1), walaupun tidak berbeda nyata dengan perlakuan BA 1.5 ppm (B4) dan perlakuan BA 0.5 ppm (B2). Kedua perlakuan tersebut juga tidak berbeda nyata dengan perlakuan penambahan BA 1 ppm (B3) yang paling sedikit menghasilkan tunas. Pada pengamatan 42 hss perlakuan BA 1.5 ppm (B4) tidak mengalami pertambahan jumlah *explant* yang menghasilkan tunas, sedangkan perlakuan lain menghasilkan pertambahan jumlah. Walaupun mengalami pertambahan jumlah, tetapi perlakuan penambahan BA 1 ppm (B3) tetap tidak berbeda nyata dengan perlakuan BA 0.5 ppm dan 1.5 ppm. Sedangkan perlakuan tanpa penambahan BA (B1) berbeda nyata dengan perlakuan BA 1 ppm (B3). Pada pengamatan 49 hss tidak ada penambahan jumlah *explant* yang membentuk tunas. Pada pengamatan 56 hss penambahan jumlah hanya terdapat

pada perlakuan tanpa BA (B1) dan perlakuan BA 1.5 ppm (B4). Perlakuan tanpa penambahan BA (B1) menghasilkan rerata jumlah *explant* yang menghasilkan tunas tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan penambahan BA 1 ppm (B3), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan penambahan BA 0.5 ppm (B2) serta BA 1.5 ppm (B4).

7. Jumlah *explant* yang membentuk akar

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi antara jenis media dengan konsentrasi BA yang ditambahkan dan kedua perlakuan pun tidak memberikan pengaruh yang nyata pada jumlah *explant* yang membentuk akar pada semua umur pengamatan (Lampiran 8). Rerata jumlah *explant* yang membentuk akar disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Rerata jumlah *explant* yang membentuk akar pada berbagai umur pengamatan

Perlakuan	Rerata jumlah eksplan yang menghasilkan akar pada berbagai umur eksplan (hss)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
M1 (media ½ MS)	0	0	0	0.08	0.83	1.58	2.42	2.75
M2 (media VW)	0	0.10	0.20	0.40	0.80	1.30	1.90	2.20
M3 (media NP)	0.25	0.42	0.50	0.67	1.00	1.75	3.08	3.33
BNT 5%	tn	tn	tn	tn	tn	tn	tn	tn
B1 (0 ppm)	0	0.38	0.50	0.75	1.88	2.75	3.50	3.88
B2 (0.5 ppm)	0.13	0.13	0.25	0.25	0.88	1.50	3.13	3.63
B3 (1 ppm)	0.13	0.13	0.13	0.25	0.50	1.13	1.63	1.75
B4 (1.5 ppm)	0.11	0.11	0.11	0.33	0.44	1.11	2.11	2.33
BNT 5%	tn	tn	tn	tn	tn	tn	tn	tn

Keterangan : Bilangan yang didampangi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%; hss= hari setelah subkultur; tn= tidak nyata

8. Rata – rata jumlah daun

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara jenis media yang digunakan dengan konsentrasi BA yang ditambahkan, tetapi masing–masing perlakuan berpengaruh nyata pada rata–rata jumlah daun pada pengamatan terakhir (56 hari setelah subkultur). Rata–rata jumlah daun pada pengamatan terakhir disajikan pada Tabel 10.

Berdasar Tabel 10 dapat dijelaskan bahwa perlakuan media NP (M3) menghasilkan rata – rata jumlah daun paling tinggi. Pada umur pengamatan 56 hari setelah subkultur, media NP (M3) menghasilkan daun lebih banyak daripada media VW (M2), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan $\frac{1}{2}$ MS (M1). Sedangkan untuk media yang tidak diberi tambahan BA (B1) menghasilkan daun dengan rata – rata jumlah tertinggi. Perlakuan BA 0.5 ppm (B2) tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanpa BA (B1) dan BA 1.5 ppm (B4). Perlakuan BA 1 ppm (B3) menghasilkan rata – rata jumlah daun terendah dan berbeda nyata dengan semua perlakuan konsentrasi BA.

Tabel 10. Rerata jumlah daun dan jumlah akar pada 56 hss

Perlakuan	Rerata jumlah daun pada 56 hss	Rerata jumlah akar pada 56 hss
Jenis media		
M1 (media $\frac{1}{2}$ MS)	18.00 b	8.50 a
M2 (media VW)	10.25 a	6.25 a
M3 (media NP)	22.75 b	13.50 b
BNT 5%		
	6.13	3.55
Konsentrasi BA		
B1 (0 ppm)	23.00 c	16.00 c
B2 (0.5 ppm)	20.00 bc	10.00 b
B3 (1 ppm)	8.33 a	4.67 a
B4 (1.5 ppm)	16.67 b	7.00 ab
BNT 5%		
	6.13	3.55

Keterangan : Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%; hst= hari setelah tanam; tn= tidak nyata

9. Rata – rata jumlah akar

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara jenis media yang digunakan dengan konsentrasi BA, tetapi masing – masing perlakuan berpengaruh nyata terhadap rata – rata jumlah akar yang dihasilkan pada pengamatan 56 hari setelah subkultur. Rata – rata jumlah akar yang dihasilkan pada pengamatan 56 hari setelah subkultur disajikan pada Tabel 10.

Berdasar Tabel 10 dapat dijelaskan bahwa media NP (M3) menghasilkan rata-rata akar terbanyak. Sedangkan media VW (M2) menghasilkan rata – rata jumlah akar paling sedikit tetapi tidak berbeda nyata dengan media $\frac{1}{2}$ MS (M1). Media tanpa BA (B0) menghasilkan rata – rata jumlah akar terbanyak. Pada

perlakuan penambahan BA 0.5 ppm rata – rata akar yang dihasilkan cukup tinggi, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan penambahan BA 1.5 ppm.

10. Rata – rata jumlah embrio per *explant*

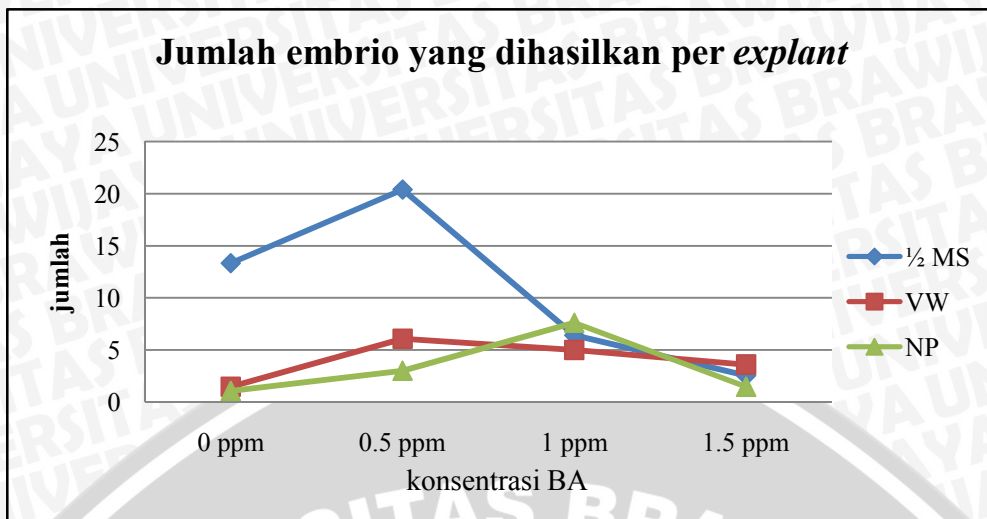
Berdasar analisis ragam menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara media yang digunakan dengan konsentrasi BA yang ditambahkan dan memberikan pengaruh nyata pada jumlah embrio yang terbentuk dari setiap *explant* pada 56 hari setelah subkultur. Rata – rata jumlah embrio disajikan pada Tabel 11, sedangkan grafik jumlah embrio yang terbentuk per *explant* disajikan pada gambar 4.

Tabel 11. Rerata jumlah embrio per *explant* pada 56 hss

	Media ½ MS	Media VW	Media NP
BA 0	13.33 c	1.47 a	1.07 a
BA 0.5 ppm	20.40 d	6.07 ab	3.00 ab
BA 1 ppm	6.40 ab	5.00 ab	7.60 bc
BA 1.5 ppm	2.53 ab	3.60 ab	1.47 a
BNT 5%	6.12		

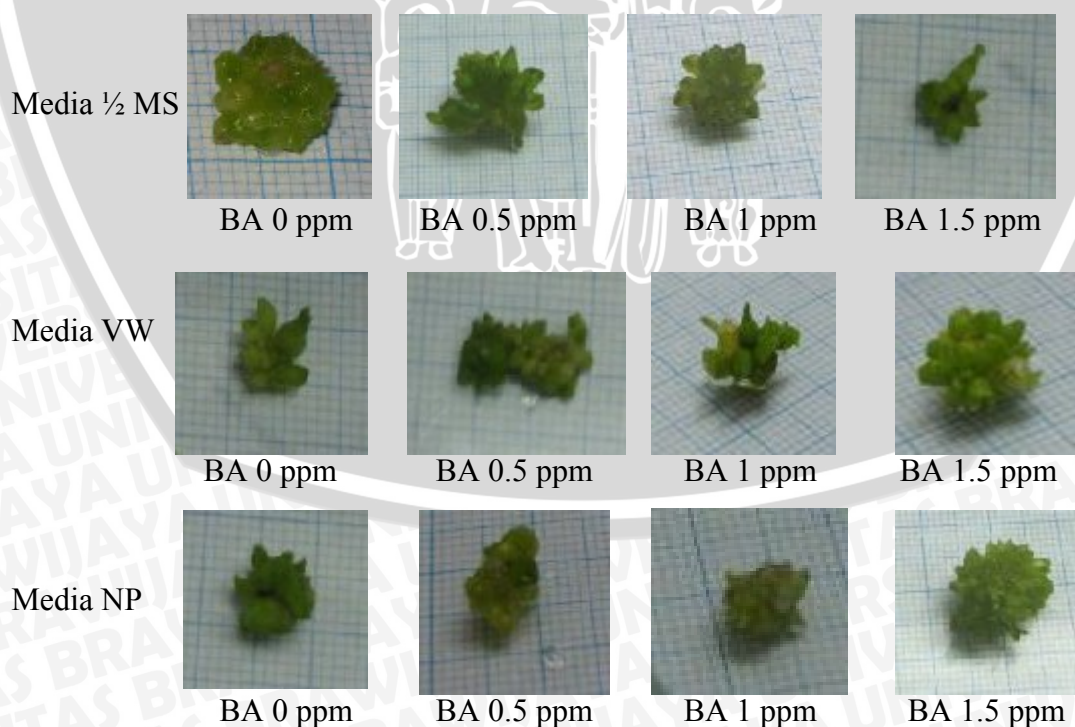
Keterangan : Bilangan yang didampingi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%; hss= hari setelah subkultur; tn= tidak nyata

Berdasar Tabel 11 dapat dijelaskan bahwa pada media ½ MS, BA dengan konsentrasi 0.5 ppm mempengaruhi jumlah embrio yang terbentuk per *explant*. Rata – rata jumlah embrio terbanyak pada perlakuan media ½ MS adalah yang dikombinasikan dengan BA 0.5 ppm yaitu 20.40. Perlakuan media ½ MS tanpa penambahan BA menghasilkan 13.33 embrio. Jika media ½ MS ditambah BA sebanyak 0.5 ppm, maka embrio yang dihasilkan bertambah 53.04 % menjadi 20.40 embrio. Penambahan BA menjadi 1 ppm dan 1.5 ppm mengakibatkan jumlah embrio yang dihasilkan semakin berkurang. Pada media ½ MS, BA mempengaruhi jumlah embrio yang dihasilkan. Sedangkan pada media VW dan NP, penambahan BA tidak mempengaruhi jumlah embrio yang dihasilkan per *explant*.



Gambar 4. Jumlah embrio yang dihasilkan per explant

Pada gambar 4 tampak bahwa media $\frac{1}{2}$ MS menghasilkan embrio dalam jumlah optimum jika dikombinasikan dengan dengan BA 0.5 ppm. Tetapi jumlah embrio yang terbentuk menurun seiring pertambahan konsentrasi BA. Sedangkan media VW dan NP akan menghasilkan jumlah embrio optimum jika dikombinasikan dengan BA berkonsentrasi 1 ppm. Kemudian mengalami penurunan jumlah embrio yang terbentuk jika konsentrasi BA ditingkatkan menjadi 1.5 ppm. Gambar embrio yang dihasilkan disajikan pada gambar 5.



Gambar 5. Embrio yang dihasilkan pada 56 hss tiap perlakuan

Berdasar Tabel 11 dan gambar 4, yang paling baik untuk pembentukan embrio adalah media $\frac{1}{2}$ MS yang dikombinasikan dengan BA 0.5 ppm.

11. Rata – rata diameter akar

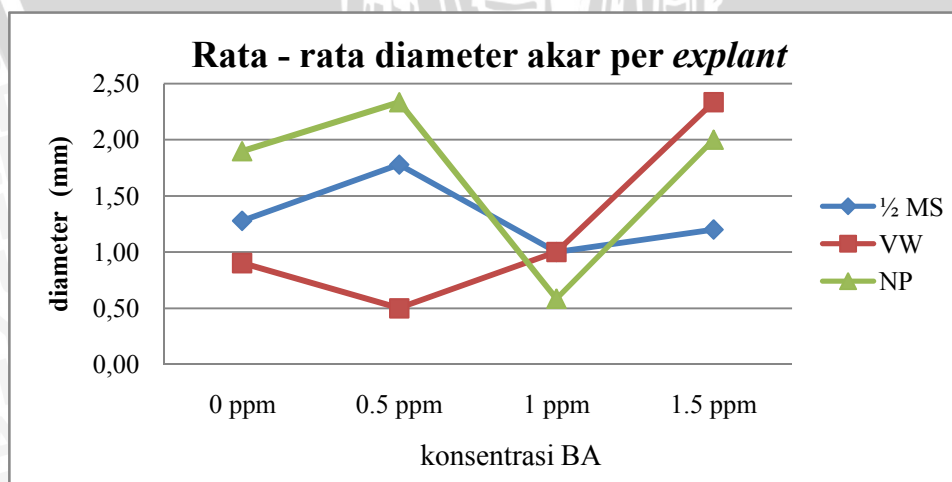
Berdasar hasil analisis ragam dapat dibuktikan bahwa terjadi interaksi antara jenis media dan konsentrasi BA yang digunakan pada rata – rata diameter akar yang dihasilkan (Lampiran 10). Rata – rata diameter akar tersaji pada Tabel 12, sedangkan grafik rata – rata diameter akar tersaji pada Gambar 6.

Tabel 12. Rerata diameter akar (mm) pada 56 hss

	Media $\frac{1}{2}$ MS	Media VW	Media NP
BA 0	1.38 abc	0.90 a	2.16 cd
BA 0.5 ppm	1.31 abc	0.83 a	2.00 bcd
BA 1 ppm	1.00 a	1.00 a	1.08 a
BA 1.5 ppm	1.20 ab	2.33 d	2.00 bcd
BNT 5%	0.91		

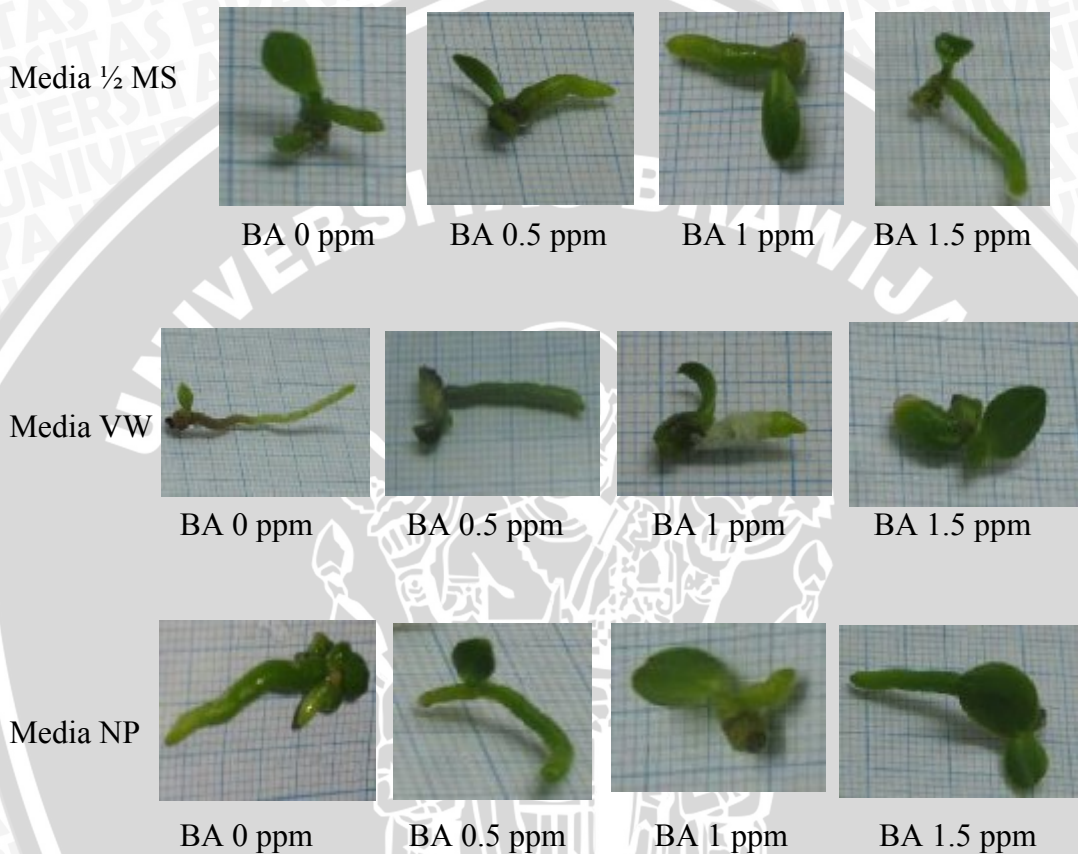
Keterangan : Bilangan yang didampingi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%; hss= hari setelah subkultur; tn= tidak nyata

Dari Tabel 12 dapat dijelaskan bahwa diameter akar yang paling tebal adalah akar dari *explant* yang ditanam pada media VW dengan konsentrasi BA 1.5 ppm. Pada media dasar $\frac{1}{2}$ MS, BA tidak berpengaruh nyata pada diameter akar yang dihasilkan. Pada media NP, BA tidak berpengaruh nyata bahkan memperkecil diameter akar ketika konsentrasi yang ditambahkan sebanyak 1 ppm.



Gambar 6. Rata – rata diameter akar yang dihasilkan per *explant*

Berdasar gambar 6 dapat dijelaskan bahwa media NP dan ½ MS mencapai diameter akar optimum pada perlakuan tanpa penambahan BA dan paling kecil pada penambahan BA 1 ppm. Sedangkan media VW mencapai diameter optimum pada penambahan BA 1.5 ppm dan yang terkecil pada BA 0.5 ppm. Gambar diameter akar berbagai perlakuan disajikan pada gambar 7.



Gambar 7. Diameter akar umur 56 hss pada berbagai perlakuan

12. Rata – rata panjang akar

Hasil analisis ragam menunjukkan tidak ada interaksi antara jenis media yang digunakan dengan konsentrasi BA yang ditambahkan pada rerata panjang akar (Lampiran 10). Masing – masing perlakuan juga tidak memberikan pengaruh yang nyata pada variabel rerata panjang akar yang diamati pada akhir pengamatan (56 hari setelah subkultur). Rerata panjang akar disajikan pada Tabel 13.

Tabel 13. Rerata panjang akar pada 56 hss

Perlakuan	Rata – rata panjang akar (mm)
Media	
M1 (media ½ MS)	5.81
M2 (media VW)	6.13
M3 (media NP)	5.07
BNT 5%	tn
konsentrasi BA	
B1 (0 ppm)	6.79
B2 (0.5 ppm)	6.61
B3 (1 ppm)	4.25
B4 (1.5 ppm)	5.70
BNT 5%	tn

Keterangan : tn= tidak berbeda nyata; hss= hari setelah subkultur

13. Ukuran embrio

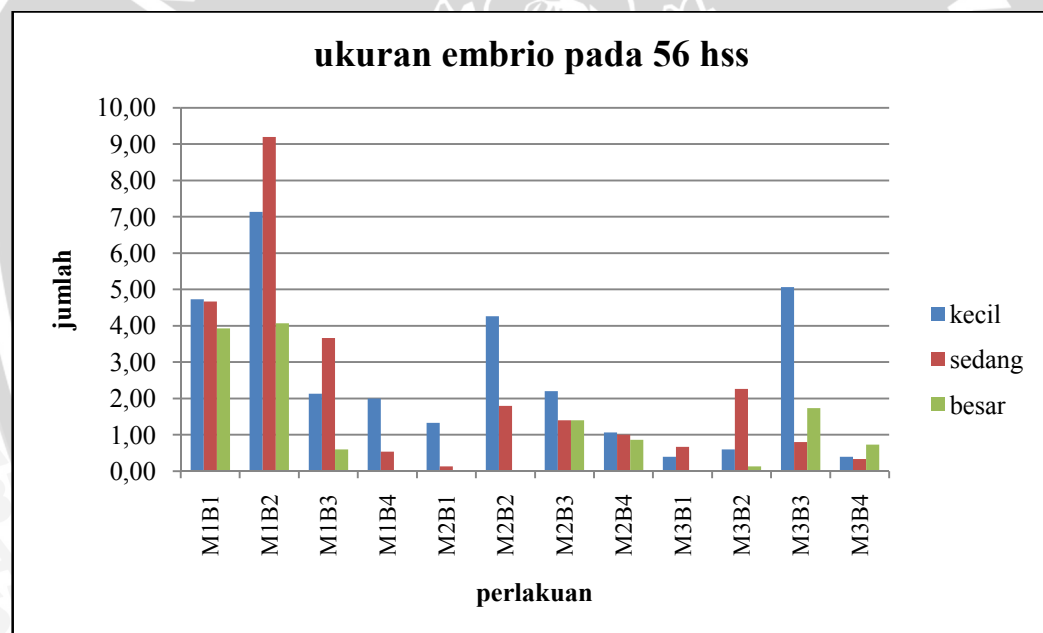
Ukuran embrio yang dihasilkan dari *explant* sangat beragam, mulai rentangan 0 – 5 mm. Embrio kecil adalah embrio yang berukuran 0 – 1 mm, embrio sedang adalah yang berukuran 2 – 3 cm, sedangkan embrio besar adalah yang berukuran 4 – 5 mm. Jumlah embrio yang berukuran kecil, sedang dan besar disajikan pada Tabel 12. Perbandingan jumlah embrio masing – masing ukuran disajikan pada Gambar 8.

Tabel 14. Jumlah embrio per *explant* dengan berbagai ukuran

Perlakuan	Jumlah embrio ukuran			Total
	Kecil	Sedang	Besar	
M1B1 (½ MS + BA 0 ppm)	4.73	4.67	3.93	13.33
M1B2 (½ MS + BA 0.5 ppm)	7.13	9.20	4.07	20.40
M1B3 (½ MS + BA 1 ppm)	2.13	3.67	0.60	6.40
M1B4 (½ MS + BA 1.5 ppm)	2.00	0.53	0	2.53
M2B1 (VW + BA 0 ppm)	1.33	0.13	0	1.47
M2B2 (VW + BA 0.5 ppm)	4.27	1.80	0	6.07
M2B3 (VW + BA 1 ppm)	2.20	1.40	1.40	5.00
M2B4 (VW + BA 1.5 ppm)	1.07	1.00	0.87	2.93
M3B1 (NP + BA 0 ppm)	0.40	0.67	0	1.07
M3B2 (NP + BA 0.5 ppm)	0.60	2.27	0.13	3.00
M3B3 (NP + BA 1 ppm)	5.07	0.80	1.73	7.60
M3B4 (NP + BA 1.5 ppm)	0.40	0.33	0.73	1.47

Keterangan : embrio kecil = ukuran 0 – 1 mm; embrio sedang = ukuran 2 – 3 mm; embrio besar = ukuran 4 – 5 mm

Berdasar tabel 14 dan gambar 8 dapat dijelaskan bahwa perlakuan yang paling banyak menghasilkan embrio besar adalah media $\frac{1}{2}$ MS yang dikombinasikan dengan BA 0.5 ppm (M1B2). Ada beberapa perlakuan yang tidak mempunyai embrio besar antara lain perlakuan $\frac{1}{2}$ MS dengan BA 1.5 ppm (M1B4), media VW tanpa BA (M2B1) dan dikombinasikan dengan BA 0.5 ppm (M2B2) serta perlakuan media NP tanpa tambahan BA (M3B1). Perlakuan yang paling banyak menghasilkan embrio berukuran sedang adalah $\frac{1}{2}$ MS yang dikombinasikan dengan BA 0.5 ppm (M1B2), sedangkan perlakuan yang paling sedikit menghasilkan embrio berukuran sedang adalah media VW tanpa tambahan BA (M2B1). Embrio berukuran kecil paling banyak dihasilkan oleh media NP dengan tambahan BA 1 ppm (M3B3) dan yang paling sedikit adalah media NP tanpa tambahan BA (M3B1).



Gambar 8. Ukuran embrio pada 56 hari setelah subkultur

4.2 Pembahasan

4.2.1 Pengaruh jenis media dan konsentrasi BA yang ditambahkan terhadap proses Embriogenesis

Explant adalah unit dasar teknik mikropropagasi. Dalam proses kultur, *explant* yang diisolasi dapat mengalami beberapa kemungkinan perkembangan yaitu proses organogenesis, embriogenesis dan pembentukan

kalus. Kalus adalah kumpulan sel yang tidak teratur dan belum jelas fungsinya (Katuuk, 1989). Untuk menuju proses embriogenesis, *explant* melewati tahapan – tahapan yang sama dengan embrio zigotik. Tahapan tersebut yaitu oktan, globular, awal hati, hati, torpedo dan embrio dewasa (Zulkarnain, 2009).

Berdasar hasil pengamatan saat inisiasi embrio baru yang ditunjukkan pada tabel 4, didapat bahwa inisiasi embrio terjadi secara langsung pada seluruh perlakuan dengan waktu yang hampir bersamaan tetapi setelah dilakukan uji F, hasil tersebut tidak berbeda nyata pada setiap perlakuan yang dicobakan. Hal ini dimungkinkan karena *explant* yang digunakan seragam dalam hal umur. Selain itu ukuran dan bentuk yang hampir sama menandakan bahwa *explant* dalam fase yang sama. Pierik (1987) mengungkapkan semakin kecil ukuran *explant* yang digunakan maka semakin rendah kemungkinan terinfeksi virus, bakteri dan jamur dari tanaman induk. Katuuk (1989) menambahkan umur sel atau jaringan yang relatif masih muda akan tetap muda dalam pengkulturan sehingga daya regenerasi tetap ada, sedangkan sel sel tua, kesanggupan untuk beregenerasi sudah berkurang.

Perbedaan jenis media dan konsentrasi BA yang ditambahkan tidak mempengaruhi saat inisiasi embrio baru (Tabel 3), tetapi konsentrasi BA yang ditambahkan dalam media mempengaruhi jumlah *explant* yang menghasilkan embrio baru pada tiap pengamatan (Tabel 4). *Explant* pada BA 0.5 ppm paling banyak menghasilkan embrio yaitu sebanyak 3.89 *explant* (77.80%) dan menurun jumlahnya seiring dengan pertambahan konsentrasi. Pada perlakuan BA 1 ppm, terjadi penurunan jumlah sebesar 35.73 %. Katuuk (1989) mengungkapkan bahwa media mempunyai 2 fungsi utama yaitu untuk memasok nutrisi dan mengarahkan pertumbuhan melalui zat pengatur tumbuh. Sehingga yang berperan penting dalam perkembangan *explant* adalah zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media. Semakin banyak jumlah *explant* yang mengalami embriogenesis maka jumlah calon planlet yang didapat juga semakin banyak.

Jenis media dan konsentrasi BA yang ditambahkan berpengaruh

nyata terhadap rerata jumlah embrio yang dihasilkan tiap *explant* pada akhir pengamatan (Tabel 9). Kombinasi media $\frac{1}{2}$ MS dengan BA 0.5 ppm sangat sesuai untuk perbanyakannya karena menghasilkan rerata embrio baru paling banyak dibanding perlakuan lain. *Explant* pada media $\frac{1}{2}$ MS yang dikombinasikan dengan BA 0.5 ppm paling banyak menghasilkan embrio yaitu sebanyak 20 embrio per *explant* dan menurun jumlahnya seiring dengan pertambahan konsentrasi. Penurunan sekitar 68,63% terjadi pada saat konsentrasi BA dinaikkan dari 0.5 ppm menjadi 1 ppm. Kemudian semakin menurun jika konsentrasi dinaikkan menjadi 1.5 ppm. Penurunan yang terjadi adalah 60,47%. Jika dibandingkan dengan media lain, jumlah embrio yang terbentuk mengalami perbedaan yang cukup signifikan. Jika dibandingkan dengan jumlah embrio tertinggi pada masing – masing media, perbedaan antara media $\frac{1}{2}$ MS dengan media VW adalah sebesar 70,25%; media $\frac{1}{2}$ MS dengan media NP adalah 62,75% dan media VW dengan media NP adalah 20,13%. Padahal media dasar yang selama ini digunakan untuk perbanyakannya adalah VW (Arditti, 2008). Dalam media dasar yang digunakan penelitian terdapat kandungan NAA 0.5 ppm. Hendaryono (2000) mengungkapkan bahwa hormon auksin dan sitokinin yang digunakan menurut aturan *Mohr* (dengan perbandingan tertentu hingga merupakan perbandingan yang optimal). Katuuk (1989) telah menggambarkan pengaruh sitokinin dan auksin dalam kultur jaringan (gambar 1). Dengan kombinasi zat pengatur tumbuh yang tepat, maka embrio akan terbentuk dengan optimal (Arditti dan Ernst, 1993). Jumlah embrio yang dihasilkan media $\frac{1}{2}$ MS optimum pada BA konsentrasi 0.5 ppm dan kemudian menurun pada penambahan konsentrasi BA (grafik 3). Media VW mencapai jumlah embrio optimum pada kombinasi dengan BA 0.5 ppm kemudian menurun 17,63% jika konsentrasi BA ditingkatkan menjadi 1 ppm. Sedangkan untuk media NP, jumlah embrio yang paling banyak didapat jika dikombinasikan dengan BA 1 ppm dan kemudian menurun 80,66% pada penambahan konsentrasi selanjutnya.

Ukuran embrio yang lebih besar dapat mempengaruhi proses perbanyakannya atau pertumbuhan selanjutnya. Dengan ukuran embrio hasil

kultur yang relatif besar atau sedang, maka daya hidup embrio akan lebih tinggi (George dan Sherington,1984). Embrio yang berukuran sedang atau besar dapat dipisahkan dari massa PLB dan disubkultur lagi sehingga menghasilkan embrio baru. Sedangkan embrio yang masih berukuran kecil harus dibiarkan dalam botol kultur hingga ukurannya antara 4-5 mm. Jika embrio yang masih relatif kecil dipisah dari kumpulannya, maka kemungkinan untuk mengalami *browning* lebih tinggi.

4.2.2 Pengaruh jenis media dan konsentrasi BA yang ditambahkan terhadap proses Organogenesis

Organogenesis ialah proses pembentukan organ dari *explant* atau kalus. Organ ini dapat berupa tunas atau akar (Katuuk, 1989). Bila dalam media jumlah auksin lebih tinggi dari sitokinin maka akar akan terbentuk lebih dulu sedang bila jumlah sitokinin lebih tinggi daripada auksin maka tunas akan terbentuk lebih dahulu (Wattimena, 1988).

Berdasar hasil pengamatan saat inisiasi tunas dan akar yang tersaji pada Tabel 2, didapat bahwa tunas dan akar terbentuk dalam waktu yang hampir bersamaan pada semua perlakuan tetapi setelah dilakukan uji F ternyata hasil tersebut tidak berbeda nyata setiap perlakuan. Berdasar tabel anova pada lampiran 5, konsentrasi BA yang ditambahkan mempengaruhi jumlah *explant* yang membentuk tunas. Hasil terbaik pada semua pengamatan didapat dari media yang tidak ditambah BA (B1) walaupun tidak berbeda nyata dengan perlakuan BA 1.5 ppm (B4). Pada pengamatan akhir (56 hss) jumlah *explant* perlakuan tanpa BA yang menghasilkan tunas adalah 88.60% dari keseluruhan *explant*. Sedangkan 62.20% *explant* pada media yang ditambah BA 1.5 ppm menghasilkan tunas. Pada media terdapat auksin jenis NAA dengan konsentrasi 0.5 ppm. Jika tingkat keaktifan NAA dan BA dianggap sama, seharusnya lebih banyak *explant* pada BA dengan konsentrasi 1 ppm yang dapat membentuk tunas. Tetapi berdasar pengamatan sampai 56 hari setelah subkultur *explant* pada media dengan BA 1 ppm paling sedikit menghasilkan tunas yaitu sebanyak 24.40 % dari keseluruhan *explant*. Hal ini dimungkinkan perbedaan tingkat keaktifan

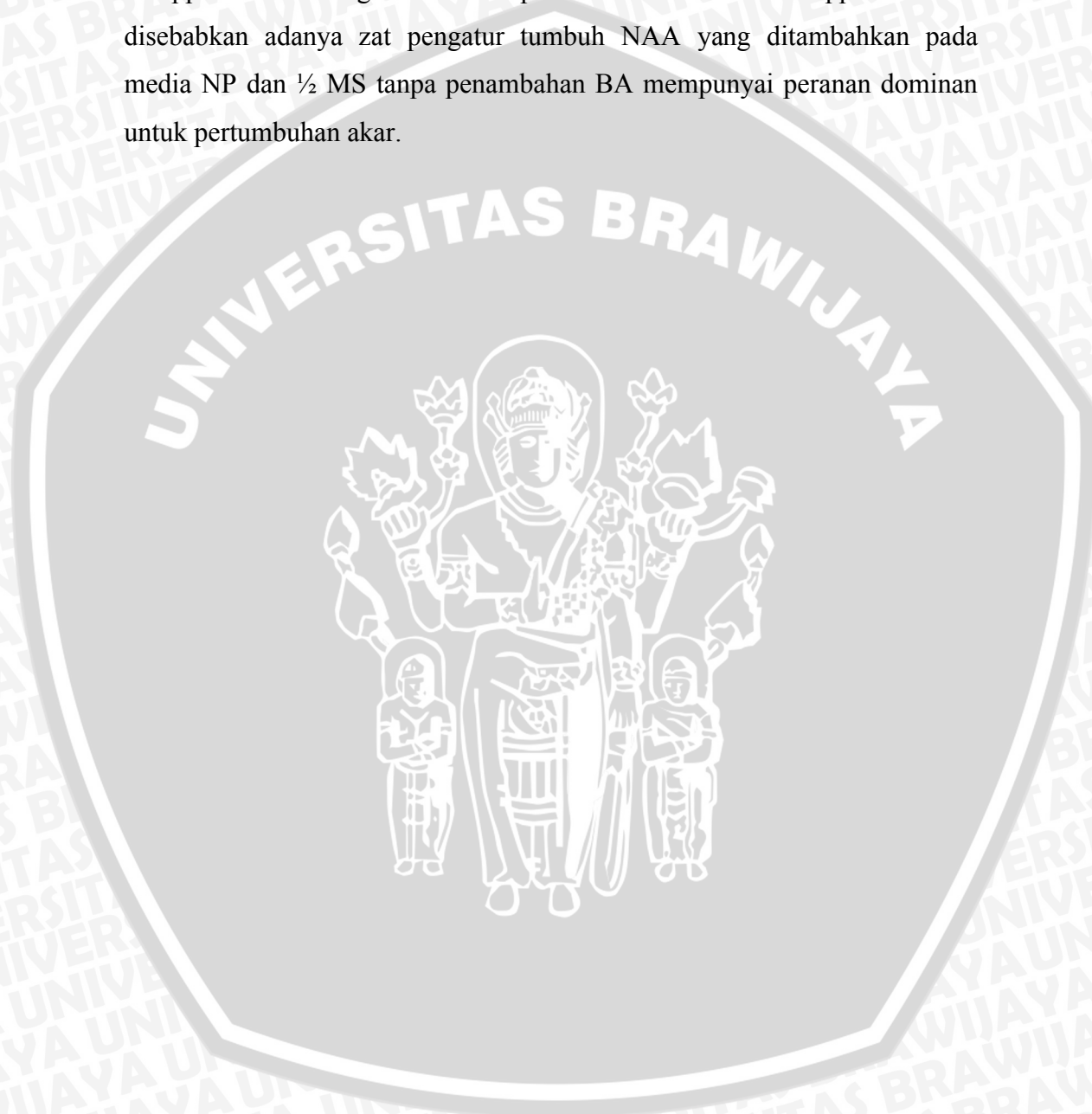
NAA dan BA sehingga BA dengan konsentrasi 1.5 ppm yang dapat melebihi konsentrasi NAA 0.5 ppm.

Tidak terjadi interaksi antara jenis media yang digunakan dengan konsentrasi BA yang ditambahkan pada rerata jumlah daun yang dihasilkan pada akhir pengamatan, tetapi masing – masing perlakuan berpengaruh pada variabel pengamatan tersebut (Lampiran 5). *Explant* yang diinokulasi pada media NP menghasilkan daun terbanyak, yaitu sejumlah 22.75 atau lebih tinggi 20,88% dari media $\frac{1}{2}$ MS. Hal ini dimungkinkan karena adanya perbedaan komposisi tambahan yaitu arang aktif dan ekstrak ragi. Gunawan (1988) menuliskan bahwa ekstrak ragi mengandung asam pepino, peptida dan vitamin untuk pertumbuhan kultur. Sedangkan media yang tidak ditambah BA menghasilkan daun terbanyak yaitu 23.00 atau lebih banyak 13.04 % dibanding perlakuan media yang ditambah BA 0.5 ppm.

Jumlah akar yang terbentuk dipengaruhi oleh jenis media dan konsentrasi BA tetapi kedua faktor tersebut tidak berinteraksi. Jumlah akar terbanyak didapat dari *explant* yang diinokulasi pada media NP yaitu sejumlah 13.50 atau lebih banyak 34.62% dari media $\frac{1}{2}$ MS. Perbedaan komposisi tambahan dalam media sangat mempengaruhi pertumbuhan akar. Adanya tambahan arang aktif sangat bermanfaat dalam perakaran. Hendaryono (2000) mengungkapkan zat arang aktif bukan merupakan zat pengatur tumbuh, tetapi merupakan karbon yang berfungsi mencegah *browning*. Gunawan (1988) menambahkan salah satu peranan arang aktif adalah merangsang perakaran dengan mengurangi tingkat cahaya yang sampai ke bagian *explant* yang terdapat dalam media. Sedangkan pada media tanpa penambahan BA, jumlah akar yang terbentuk adalah 16.00 atau lebih banyak 37.5% dari perlakuan media dengan kombinasi BA 0.5 ppm. Hal ini disebabkan zat pengatur tumbuh BA tidak berperan penting dalam pengakaran, melainkan dalam pembentukan tunas (Katuuk, 1989). Pada media tanpa penambahan BA, zat pengatur tumbuh NAA berperan penting dalam mengatur arah pertumbuhan *explant*. NAA berperan untuk pengakaran baik pada stek, maupun kalus dan PLB (Arditti, 2008)

Jenis media dan BA yang ditambahkan mempengaruhi diameter

akar yang terbentuk. Diameter akar tertinggi didapat dari media VW yang dikombinasikan dengan BA 1.5 ppm. Media NP dan Media $\frac{1}{2}$ MS mencapai diameter akar optimum pada perlakuan tanpa penambahan BA. Kemudian menurun ketebalannya 7.41 % dan 5.07 % pada penambahan konsentrasi BA 0.5 ppm dan meningkat kembali pada konsentrasi BA 1.5 ppm. Hal ini disebabkan adanya zat pengatur tumbuh NAA yang ditambahkan pada media NP dan $\frac{1}{2}$ MS tanpa penambahan BA mempunyai peranan dominan untuk pertumbuhan akar.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Terjadi interaksi antara media dasar dengan konsentrasi BA yang ditambahkan terhadap jumlah embrio yang dihasilkan tiap *explant* dan diameter akar yang terbentuk. Jumlah embrio terbanyak dihasilkan dari kombinasi media $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) dengan konsentrasi *Benzyl Adenin* 0.5 ppm. Sedangkan diameter akar tertinggi dihasilkan dari kombinasi media VW dengan *Benzyl Adenin* 1.5 ppm
2. Jenis media yang digunakan mempengaruhi jumlah akar dan daun yang terbentuk. Media yang menghasilkan jumlah akar dan daun terbanyak adalah media New Phalaenopsis (NP)
3. Semakin tinggi konsentrasi BA yang ditambahkan, maka jumlah embrio yang dihasilkan semakin berkurang. BA optimum adalah 0.5 ppm. Peningkatan BA menjadi 1 ppm menurunkan jumlah embrio sebanyak 68.63%.

5.2 Saran

1. Untuk tujuan perbanyakkan sebaiknya menggunakan media $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) yang dikombinasikan dengan *Benzyl Adenin* 0.5 ppm.
2. Untuk tujuan pembentukan organ, sebaiknya menggunakan media New Palaenopsis (NP)

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1985. Dasar – dasar pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh. Angkasa. Bandung. pp. 85
- Anggraeny, Novy. 2004. Mikrostek anggrek langka *Grammatophyllum scriptum* var. papuanum secara in vitro pada media VW dengan penambahan madu dan ekstrak taugae available at <http://digilib.umm.ac.id/go.php?id=jiptummpg-gdl-s1-2004-novianggra-85> (verified at 10 November 2009)
- Anonymous. 2002. A Comprehensive Guide to Orchids Culture. Venamy Orchids. New York.
- Anonymous. 2011. The Physiology of Tropical Orchids in Relation to The Industry 2nd edition. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. p. 1-10 Available at <http://www.worldscibooks.com/lifesci/5505.html> (verified at 1 April 2011)
- Arditti, J. and R. Ernst. 1993. Micropropagation of orchids. John Wiley and Sons Inc. New York p. 36-57 dan p.467-521
- Arditti, J. 2008. Micropropagation of orchids 2nd edition volume 1. Blackwell Publishing Ltd. USA p.46-49 dan p.63-103
- David, S. 2009. Anggrek Bulan Sulawesi (*Phalaenopsis celebensis*) available at <http://anggrekalam.blogspot.com/2009/08/anggrek-bulan-sulawesi-phalaenopsis.html> verified at 1 Desember 2009
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Springer Verlag. The Netherlands. p. 219-220
- Gunawan, L.V. 1988. Teknik kultur jaringan tumbuhan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor. pp. 1 dan p. 67-107
- Hendaryono, D.P.S. 2000. Pembibitan anggrek dalam botol. Kanisius. Yogyakarta. p.22-55
- Hendaryono, D.P.S. dan A. Wijayani. 1994. Teknik kultur jaringan pengenalan dan petunjuk perbanyak tanaman secara vegetatif modern. Kanisius. Yogyakarta. pp.139
- Kalimuthu K., R. Senthilkumar dan S. Vijayakumar. 2006. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp.(Dancing Dolls) African Journal of Biotechnology Vol. 6 (10), p 1171-1174. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB> verified at 20 Juli 2010

- Katuuk, J.R.P. 1989. Teknik kultur jaringan dalam mikropropagasi tanaman. Depdikbud. Jakarta. pp. 62, 188
- Lestari, S.S. 2003. Mengenal dan bertanam anggrek. CV. Aneka Ilmu. Semarang. pp. 25
- Mineo, L. 1990. Plant tissue culture techniques dalam Tested studies for laboratory teaching. Volume 11. Proceedings of the Eleventh Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). p.151-174
- Pierik, R.L.M. 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands. P.139-167
- Santoso, U. dan F. Nursandi. 2001. Kultur jaringan tanaman. UMM Press. Malang. p. 185-192
- Sivaprasad, P dan K.K.Soluchana. 2011. Integration of arbuscular mycorrhizal technology with micro-propagation. Government of Kerala Department of Agriculture. Farm Information Bureau Thiruvananthapuram. p.5-10
- Suarez, M. F. dan Peter V. Bozhkov. 2008. Plant Embryogenesis. Humana Press. USA. p 51-101
- Tokuhara, K. dan Masahiro Mii. 2003. Highly efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. In Vitro Cell Biology – Plant Volume 39 November – Desember 2003 p.635-639
- Utami, E.S.W., Issirep S., Taryono, Endang S. 2007. Pengaruh α -Naphthaleneacetic Acid (NAA) Terhadap Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Biodiversitas Volume 8 No 4. p 295 – 299
- Wardiyati, T. 1998. Kultur jaringan tanaman hortikultura. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang. p. 95 – 105
- Wattimena, G.A. 1988. Zat pengatur tumbuh tanaman. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor bekerja sama dengan Lembaga Sumberdaya Informasi-IPB. Bogor. p. 140-145
- Widiastoety, D., R.W. Prasetio dan Purbadi. Pengaruh bubuk buah pisang terhadap pertumbuhan planlet anggrek phalaenopsis dalam media kultur available at <http://balithi.litbang.deptan.go.id/modul/pdf/pdf2.php?upt=Balai%20Penelitian%20Tanaman%20Hias&sqlpdf=SELECT%20JudulPen,Penulis,Institusi,Abstrak1,Abstrak2%20FROM%20isibuku&id=41&proses=2> (verified at 10 November 2009)

Yusnita. 2003. Kultur jaringan: cara memperbanyak tanaman secara efisien.
Agromedia Pustaka. Jakarta. pp. 105

Zulkarnain, H. 2009. Kultur jaringan tanaman: Solusi perbanyak tanaman budi
daya. Bumi Aksara. Jakarta. p.78-87 dan p.150-158



Lampiran 1. Perhitungan Pembuatan Media ½ MS

Volume media: 400 ml

$$\text{Kebutuhan larutan stok makro MS} = \frac{80 \text{ mg}}{4 \text{ mg/ml}} = 20 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan larutan stok mikro MS} = \frac{16 \text{ mg}}{4 \text{ mg/ml}} = 4 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan larutan stok Fe-EDTA} = \frac{8 \text{ mg}}{4 \text{ mg/ml}} = 2 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan larutan stok vitamin} = \frac{160 \text{ mg}}{40 \text{ mg/ml}} = 0,4 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan larutan stok Myo-inositol} = \frac{16 \text{ mg}}{4 \text{ mg/ml}} = 4 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan Sukrosa} = \frac{12 \text{ g}}{1 \text{ ml}} \times 400 \text{ ml} = 12.000 \text{ mg} = 12 \text{ g}$$

$$\text{Kebutuhan larutan stok ZPT NAA } 0,5 \text{ ppm} = \frac{800 \text{ mg}}{400 \text{ ml}} = 2 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan agar – agar} = \frac{2.600 \text{ mg}}{1 \text{ mg/ml}} = 2.600 \text{ mg}$$

$$\text{Kebutuhan agar – agar per perlakuan} = \frac{2.600 \text{ mg}}{4 \text{ ml}} = 650 \text{ mg} = 0,650 \text{ mg}$$

Perlakuan B1 yaitu tanpa BA

Perlakuan BA :

$$\text{Kebutuhan larutan stok ZPT BA } 0,5 \text{ ppm} = \frac{200 \text{ mg}}{400 \text{ ml}} = 0,5 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan larutan stok ZPT BA } 1 \text{ ppm} = \frac{400 \text{ mg}}{400 \text{ ml}} = 1 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan larutan stok ZPT BA } 1,5 \text{ ppm} = \frac{600 \text{ mg}}{400 \text{ ml}} = 1,5 \text{ ml}$$

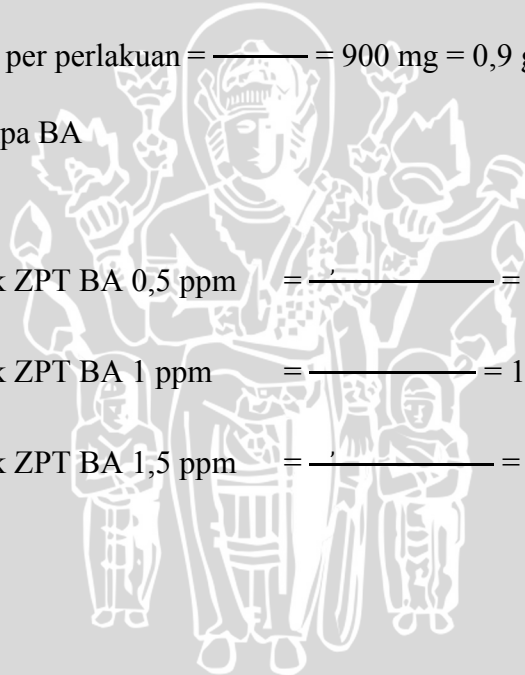
Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan Media VW

Volume media : 400 ml

Kebutuhan larutan stok makro VW = $\frac{400 \text{ ml}}{100} = 4 \text{ ml}$ Kebutuhan larutan stok mikro VW = $\frac{400 \text{ ml}}{100} = 4 \text{ ml}$ Kebutuhan larutan stok Fe-EDTA = $\frac{400 \text{ ml}}{100} = 4 \text{ ml}$ Kebutuhan Sukrosa = $\frac{400 \text{ ml}}{50} = 8000 \text{ mg} = 8 \text{ g}$ Kebutuhan larutan ZPT NAA 0,5 ppm = $\frac{400 \text{ ml}}{200} = 2 \text{ ml}$ Kebutuhan agar – agar = $\frac{400 \text{ ml}}{111,1} = 3600 \text{ mg} = 3,6 \text{ g}$ Kebutuhan agar – agar per perlakuan = $\frac{3600 \text{ mg}}{4} = 900 \text{ mg} = 0,9 \text{ g}$

Perlakuan B1 yaitu tanpa BA

Perlakuan BA :

Kebutuhan larutan stok ZPT BA 0,5 ppm = $\frac{400 \text{ ml}}{800} = 0,5 \text{ ml}$ Kebutuhan larutan stok ZPT BA 1 ppm = $\frac{400 \text{ ml}}{400} = 1 \text{ ml}$ Kebutuhan larutan stok ZPT BA 1,5 ppm = $\frac{400 \text{ ml}}{266,7} = 1,5 \text{ ml}$ 

Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Media NP

Volume media : 400 ml (tiap perlakuan 100 ml)

Kebutuhan larutan stok makro NP = _____ = 4 ml

Kebutuhan larutan stok mikro NP = _____ = 4 ml

Kebutuhan larutan stok Fe-EDTA = _____ = 4 ml

Kebutuhan larutan stok Vitamin = _____ = 4 ml

Kebutuhan larutan stok Myo-inositol = _____ = 4 ml

Kebutuhan Sukrosa = _____ = 8000 mg = 8 g

Kebutuhan larutan stok ZPT NAA 0,5 ppm = _____ = 2 ml

Kebutuhan agar – agar = _____ = 2400 mg

Kebutuhan agar – agar per perlakuan = _____ = 600 mg

Kebutuhan yeast per perlakuan = _____ = 200 mg = 0,2 g

Kebutuhan charcoal per perlakuan = _____ = 100 mg = 0,1 g

Perlakuan B1 yaitu tanpa BA

Perlakuan BA :

Kebutuhan larutan stok ZPT BA 0,5 ppm = _____ = 0,5 ml

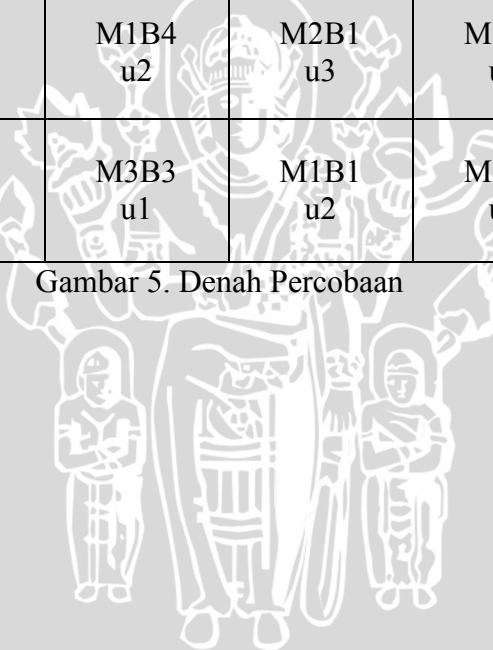
Kebutuhan larutan stok ZPT BA 1 ppm = _____ = 1 ml

Kebutuhan larutan stok ZPT BA 1,5 ppm = _____ = 1,5 ml

Lampiran 4. Gambar Denah Percobaan

M3B2 u2	M1B4 u1	M2B3 u1	M3B1 u3	M1B2 u3	M2B1 u2
M2B4 u1	M3B3 u2	M1B3 u3	M2B2 u1	M3B4 u2	M1B1 u3
M1B4 u3	M2B1 u1	M3B1 u1	M1B2 u1	M2B3 u2	M3B2 u1
M3B3 u3	M1B3 u1	M2B4 u3	M3B4 u3	M1B1 u1	M2B2 u2
M2B3 u3	M3B2 u3	M1B4 u2	M2B1 u3	M3B1 u2	M1B2 u2
M1B3 u2	M2B4 u2	M3B3 u1	M1B1 u2	M2B2 u3	M3B4 u1

Gambar 5. Denah Percobaan



Lampiran 5. Hasil Perhitungan analisis ragam saat inisiasi embrio, tunas dan akar

Tabel 15. Analisis ragam saat inisiasi embrio

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	880.9269	80.08426	1.229531			
M	2	28.28389	14.14194	0.217121	tn	3.402826	5.613591
B	3	529.4717	176.4906	2.709653	tn	3.008787	4.718051
M.B	6	323.1713	53.86188	0.82694	tn	2.508189	3.666717
Galat	24	1563.216	65.134				
Total	35	2444.143					

Tabel 16. Analisis ragam saat inisiasi tunas

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	556.4773	50.58885	0.395842			
M	2	151.6336	75.81679	0.593243	tn	3.402826	5.613591
B	3	74.31218	24.77073	0.193823	tn	3.008787	4.718051
M.B	6	330.5315	55.08859	0.431051	tn	2.508189	3.666717
Galat	24	3067.212	127.8005				
Total	35	3623.69					

Tabel 17. Analisis ragam saat inisiasi akar

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	1918.998	174.4544	0.799701			
M	2	532.8815	266.4408	1.221368	tn	3.402826	5.613591
B	3	156.4006	52.13354	0.238981	tn	3.008787	4.718051
M.B	6	1229.716	204.9527	0.939506	tn	2.508189	3.666717
Galat	24	5235.589	218.1495				
Total	35	7154.587					

Lampiran 6. Hasil analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada berbagai umur pengamatan (hss)

Tabel 18. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada 7 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	11.639	1.058				
M	2	0.389	0.194	0.304	tn	3.40	5.61
B	3	6.972	2.324	3.638	*	3.01	4.72
M.B	6	4.278	0.713	1.116	tn	2.51	3.67
Galat	24	15.333	0.639				
Total	35	26.972					

Tabel 19. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada 14 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	42.306	3.846				
M	2	1.556	0.778	0.418	tn	3.40	5.61
B	3	36.306	12.102	6.502	**	3.01	4.72
M.B	6	4.444	0.741	0.398	tn	2.51	3.67
Galat	24	44.667	1.861				
Total	35	86.972					

Tabel 20. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada 21 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	67.639	6.149				
M	2	9.056	4.528	3.019	tn	3.40	5.61
B	3	50.306	16.769	11.179	**	3.01	4.72
M.B	6	8.278	1.380	0.920	tn	2.51	3.67
Galat	24	36.000	1.500				
Total	35	103.639					

Tabel 21. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada 28 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	68.306	6.210				
M	2	9.056	4.528	2.433	tn	3.40	5.61
B	3	47.194	15.731	8.453	**	3.01	4.72
M.B	6	12.056	2.009	1.080	tn	2.51	3.67
Galat	24	44.667	1.861				
Total	35	112.972					

Tabel 22. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada 35 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	67.417	6.129				
M	2	8.667	4.333	2.400	tn	3.40	5.61
B	3	42.972	14.324	7.933	**	3.01	4.72
M.B	6	15.778	2.630	1.456	tn	2.51	3.67
Galat	24	43.333	1.806				
Total	35	110.750					

Tabel 23. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada 42 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	67.417	6.129				
M	2	8.667	4.333	2.400	tn	3.40	5.61
B	3	42.972	14.324	7.933	**	3.01	4.72
M.B	6	15.778	2.630	1.456	tn	2.51	3.67
Galat	24	43.333	1.806				
Total	35	110.750					

Tabel 24. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada 49 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	64.556	5.869				
M	2	7.389	3.694	2.015	tn	3.40	5.61
B	3	41.889	13.963	7.616	**	3.01	4.72
M.B	6	15.278	2.546	1.389	tn	2.51	3.67
Galat	24	44.000	1.833				
Total	35	108.556					

Tabel 25. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan embrio pada 56 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	66.306	6.028				
M	2	8.389	4.194	2.188	tn	3.40	5.61
B	3	40.972	13.657	7.126	**	3.01	4.72
M.B	6	16.944	2.824	1.473	tn	2.51	3.67
Galat	24	46.000	1.917				
Total	35	112.306					

Lampiran 7. Hasil analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada berbagai umur pengamatan (hss)

Tabel 26. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada 7 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	3.889	0.354				
M	2	0.056	0.028	0.050	tn	3.40	5.61
B	3	1.444	0.481	0.867	tn	3.01	4.72
M.B	6	2.389	0.398	0.717	tn	2.51	3.67
Galat	24	13.333	0.556				
Total	35	17.222					

Tabel 27. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada 14 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	8.75	0.80	1.36			
M	2	2.00	1.00	1.71	tn	3.40	5.61
B	3	4.31	1.44	2.46	tn	3.01	4.72
M.B	6	2.44	0.41	0.70	tn	2.51	3.67
Galat	24	14.00	0.58				
Total	35	22.75					

Tabel 28. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada 21 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	12.972	1.179	1.769			
M	2	3.722	1.861	2.792	tn	3.40	5.61
B	3	5.861	1.954	2.931	tn	3.01	4.72
M.B	6	3.389	0.565	0.847	tn	2.51	3.67
Galat	24	16.000	0.667				
Total	35	28.972					

Tabel 29. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada 28 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	14.083	1.280	0.941			
M	2	3.167	1.583	1.163	tn	3.40	5.61
B	3	7.194	2.398	1.762	tn	3.01	4.72
M.B	6	3.722	0.620	0.456	tn	2.51	3.67
Galat	24	32.667	1.361				
Total	35	46.750					

Tabel 30. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada 35 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	30.333	2.758	1.360			
M	2	6.167	3.083	1.521	tn	3.40	5.61
B	3	19.222	6.407	3.160	*	3.01	4.72
M.B	6	4.944	0.824	0.406	tn	2.51	3.67
Galat	24	48.667	2.028				
Total	35	79.000					

Tabel 31. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada 42 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	37.417	3.402	1.590			
M	2	11.167	5.583	2.610	tn	3.40	5.61
B	3	22.083	7.361	3.442	*	3.01	4.72
M.B	6	4.167	0.694	0.325	tn	2.51	3.67
Galat	24	51.333	2.139				
Total	35	88.750					

Tabel 32. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada 49 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	37.417	3.402	1.590			
M	2	11.167	5.583	2.610	tn	3.40	5.61
B	3	22.083	7.361	3.442	*	3.01	4.72
M.B	6	4.167	0.694	0.325	tn	2.51	3.67
Galat	24	51.333	2.139				
Total	35	88.750					

Tabel 33. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan tunas pada 56 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	45.000	4.091	2.045			
M	2	13.167	6.583	3.292	tn	3.40	5.61
B	3	26.778	8.926	4.463	*	3.01	4.72
M.B	6	5.056	0.843	0.421	tn	2.51	3.67
Galat	24	48.000	2.000				
Total	35	93.000					

Lampiran 8. Hasil analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada berbagai umur pengamatan (hss)

Tabel 34. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada 7 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	0.750	0.068	0.818			
M	2	0.500	0.250	3.000	tn	3.40	5.61
B	3	0.083	0.028	0.333	tn	3.01	4.72
M.B	6	0.167	0.028	0.333	tn	2.51	3.67
Galat	24	2.000	0.083				
Total	35	2.750					

Tabel 35. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada 14 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	1.667	0.152	0.682			
M	2	1.167	0.583	2.625	tn	3.40	5.61
B	3	0.333	0.111	0.500	tn	3.01	4.72
M.B	6	0.167	0.028	0.125	tn	2.51	3.67
Galat	24	5.333	0.222				
Total	35	7.000					

Tabel 36. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada 21 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	2.889	0.263	0.860			
M	2	1.556	0.778	2.545	tn	3.40	5.61
B	3	0.667	0.222	0.727	tn	3.01	4.72
M.B	6	0.667	0.111	0.364	tn	2.51	3.67
Galat	24	7.333	0.306				
Total	35	10.222					

Tabel 37. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada 28 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	4.972	0.452	1.162			
M	2	2.056	1.028	2.643	tn	3.40	5.61
B	3	1.194	0.398	1.024	tn	3.01	4.72
M.B	6	1.722	0.287	0.738	tn	2.51	3.67
Galat	24	9.333	0.389				
Total	35	14.306					

Tabel 38. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada 35 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	12.333	1.121	1.009			
M	2	0.667	0.333	0.300	tn	3.40	5.61
B	3	9.000	3.000	2.700	tn	3.01	4.72
M.B	6	2.667	0.444	0.400	tn	2.51	3.67
Galat	24	26.667	1.111				
Total	35	39.000					

Tabel 39. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada 42 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	20.972	1.907	1.430			
M	2	2.889	1.444	1.083	tn	3.40	5.61
B	3	11.861	3.954	2.965	tn	3.01	4.72
M.B	6	6.222	1.037	0.778	tn	2.51	3.67
Galat	24	32.000	1.333				
Total	35	52.972					

Tabel 40. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada 49 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	32.972	2.997	1.458			
M	2	13.556	6.778	3.297	tn	3.40	5.61
B	3	14.750	4.917	2.392	tn	3.01	4.72
M.B	6	4.667	0.778	0.378	tn	2.51	3.67
Galat	24	49.333	2.056				
Total	35	82.306					

Tabel 41. Analisis ragam jumlah *explant* yang menghasilkan akar pada 56 hss

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	42.306	3.846	1.442			
M	2	13.722	6.861	2.573	tn	3.40	5.61
B	3	20.306	6.769	2.538	tn	3.01	4.72
M.B	6	8.278	1.380	0.517	tn	2.51	3.67
Galat	24	64.000	2.667				
Total	35	106.306					

Lampiran 9. Hasil analisis ragam jumlah daun, akar dan embrio pada akhir pengamatan (56 hss)

Tabel 42. Analisis ragam jumlah daun pada akhir pengamatan (56 hss)

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	294.667	26.788	2.026			
M	2	106.167	53.083	4.015	*	3.40	5.61
B	3	120.222	40.074	3.031	*	3.01	4.72
M.B	6	68.278	11.380	0.861	tn	2.51	3.67
Galat	24	317.333	13.222				
Total	35	612.000					

Tabel 43. Analisis ragam jumlah akar pada akhir pengamatan (56 hss)

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	167.639	15.240	3.429			
M	2	36.722	18.361	4.131	*	3.40	5.61
B	3	72.083	24.028	5.406	**	3.01	4.72
M.B	6	58.833	9.806	2.206	tn	2.51	3.67
Galat	24	106.667	4.444				
Total	35	274.306					

Tabel 44. Analisis ragam jumlah embrio pada akhir pengamatan (56 hss)

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	1071.239	97.385	7.389			
M	2	396.309	198.154	15.034	**	3.40	5.61
B	3	245.194	81.731	6.201	**	3.01	4.72
M.B	6	429.736	71.623	5.434	**	2.51	3.67
Galat	24	316.320	13.180				
Total	35	1387.559					

Lampiran 10. Hasil analisis ragam rerata diameter dan panjang akar pada akhir pengamatan (56 hss)

Tabel 43. Analisis ragam rerata diameter akar pada akhir pengamatan (56 hss)

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	11.689	1.063	3.618			
M	2	3.485	1.743	5.934	**	3.40	5.61
B	3	3.011	1.004	3.417	*	3.01	4.72
M.B	6	5.192	0.865	2.947	*	2.51	3.67
Galat	24	7.048	0.294				
Total	35	18.737					

Tabel 44. Analisis ragam rerata panjang akar pada akhir pengamatan (56 hss)

SK	Db	JK	KT	Fhit		Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	11	306.010	27.819	1.498			
M	2	24.670	12.335	0.664	tn	3.40	5.61
B	3	142.295	47.432	2.553	tn	3.01	4.72
M.B	6	139.046	23.174	1.248	tn	2.51	3.67
Galat	24	445.837	18.577				
Total	35	751.847					

