

**RESPON ANGGREK *Dendrobium* sp. PADA KULTUR
IN VITRO**

Oleh
NURIKA AINI YUNIASARI



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

2011

**RESPON ANGGREK *Dendrobium* sp. PADA KULTUR
IN VITRO**

Oleh
NURIKA AINI YUNIASARI



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

2011

**RESPON ANGGREK *Dendrobium* sp. PADA KULTUR
IN VITRO**

Oleh
NURIKA AINI YUNIASARI
0610470026-47

SKRIPSI

**Disampaikan sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)**

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

2011

LEMBAR PERSETUJUAN

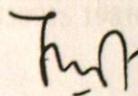
Judul : RESPON ANGGREK *Dendrobium* sp. PADA KULTUR IN VITRO
Nama : Nurika Aini Yuniasari
NIM : 0610470026-47
Jurusan : Budidaya Pertanian
Program Studi : Pemuliaan Tanaman
Menyetujui : Dosen Pembimbing

Pertama



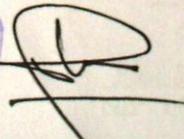
Dr. Ir. Lita Soetopo
NIP. 19510408 197903 2 001

Kedua



Ir. Respatijarti, MS
NIP. 19550915 198103 2 002

Ketua Jurusan



Dr. Ir. Agus Suryanto, MS
NIP. 19550818 198103 1 008

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan

MAJELIS PENGUJI

Penguji I

Ir. Sri Lestari Purnamaningsih, MS
NIP. 19570512 198503 2 001

Penguji II

Ir. Respatijarti, MS
NIP. 19550915 198103 2 002

Penguji III

Dr. Ir. Lita Soetopo
NIP. 19510408 197903 2 001

Penguji IV

Prof. Dr. Ir. Kuswanto, MS
NIP. 19630711 198803 1 002

Tanggal Lulus : 10 FEB 2011



RINGKASAN

Nurika Aini Yuniasari. 0610470026-47. Respon anggrek *Dendrobium* sp. pada kultur in vitro. Di bawah bimbingan Ir. Lita Soetopo, Ph.D sebagai Pembimbing Utama, Ir. Respatijarti, MS sebagai Pembimbing Pendamping.

Sebagai salah satu pusat gen dunia, Indonesia termasuk salah satu tempat asal tanaman anggrek, diantaranya ialah anggrek *Dendrobium* sp. *Dendrobium* sp. termasuk dalam genus anggrek terbesar di dunia. Eksploitasi besar-besaran yang marak dilakukan dapat mengancam keberadaan spesies anggrek asli Indonesia. Untuk itu, perlu dilakukan konservasi ex situ untuk melestarikan plasma nutfah anggrek tersebut. Salah satu tekniknya ialah dengan menggunakan kultur in vitro.

Keberhasilan kultur in vitro dipengaruhi oleh faktor genotip eksplan dan lingkungan kultur. Perbanyakkan secara in vitro menunjukkan bahwa spesies yang berbeda membutuhkan media yang berbeda dan bahkan spesifik untuk perkecambahan dan pertumbuhan yang optimum. Untuk itu diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui kombinasi terbaik antara media tumbuh dengan beberapa anggrek *Dendrobium* sp.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi terbaik antara *Dendrobium* sp. dengan media tumbuh pada kultur in vitro. Hipotesis yang diajukan ialah terdapat kombinasi terbaik antara *Dendrobium* sp. dengan media tumbuh pada kultur in vitro.

Penelitian dibagi menjadi dua percobaan. Pada percobaan pertama digunakan eksplan tunas aksilar dan pada percobaan kedua digunakan eksplan PLB (Protocorm like body). Kedua percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Perlakuan terdiri dari kombinasi *Dendrobium* sp. dengan media tumbuh. Pada percobaan 1 digunakan empat spesies dan empat media, sehingga terdapat enam belas kombinasi perlakuan. Percobaan 1 menggunakan spesies *D. lineale*, *D. pseudoconantum*, *D. strebloceras*, dan *D. veratrifolium*. Percobaan 1 tahap I menggunakan media VW, VW + BA 0,5 mg.L⁻¹, ½ MS, dan ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹. Percobaan 1 tahap II menggunakan media VW, VW + BA 1mg.L⁻¹ + NAA 0,1mg.L⁻¹, ½ MS, dan ½ MS + BA 1mg.L⁻¹ + NAA 0,1mg.L⁻¹. Pada percobaan 2 digunakan dua spesies dan empat media, sehingga terdapat delapan kombinasi perlakuan. Percobaan 2 menggunakan spesies *D. spectabile* dan *D. ascipilanense*. Percobaan 2 tahap I menggunakan media VW, VW + BA 0,5 mg.L⁻¹, ½ MS, dan ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹. Percobaan 2 tahap II menggunakan media VW, VW + BA 2 mg.L⁻¹, ½ MS, dan ½ MS + BA 2 mg.L⁻¹.

Peubah yang diamati pada percobaan 1 meliputi warna eksplan, saat inisiasi kalus, warna kalus, dan persentase eksplan yang membentuk kalus. Peubah yang diamati pada percobaan 2 meliputi saat inisiasi kalus, saat inisiasi PLB, saat inisiasi tunas, warna kalus, persentase eksplan yang membentuk kalus, persentase eksplan yang membentuk PLB, persentase eksplan yang membentuk tunas, jumlah PLB per eksplan, dan jumlah tunas per eksplan. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan analisis ragam (uji F) pada taraf 5%. Apabila terdapat perbedaan antar perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji BNT pada taraf 5%.

Hasil percobaan 1 tidak dapat dianalisis ragam karena tidak semua perlakuan merespon perlakuan yang diberikan. Percobaan 2 menunjukkan bahwa kombinasi terbaik antara eksplan PLB anggrek *Dendrobium* sp. dengan media pada persentase pembentukan PLB tahap I dan persentase pembentukan kalus tahap II ialah *D. spectabile* dengan media VW, sedangkan kombinasi pada persentase pembentukan kalus tahap I dan persentase pembentukan kombinasi kalus dan PLB tahap II ialah *D. spectabile* dengan media $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 mg.L⁻¹.



RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Probolinggo pada tanggal 24 Juni 1988. Penulis adalah anak tunggal dari pasangan Bapak Achmad Massution (Alm.) dan Ibu Rustiyah.

Penulis menamatkan Sekolah Dasar di SDN Sukabumi IV Probolinggo pada tahun 2000, dan pada tahun yang sama penulis diterima di SLTP Negeri 1 Probolinggo. Setelah lulus SLTP tahun 2003, penulis melanjutkan studi di SMA Negeri 1 Malang.

Pada tahun 2006 penulis diterima di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang dan mengambil Jurusan Budidaya Pertanian Program Studi Pemuliaan Tanaman melalui jalur Seleksi Penerimaan Mahasiswa Baru (SPMB). Selama melakukan studi di Universitas Brawijaya, penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Dasar Genetika dan Dasar Pemuliaan Tanaman.



KATA PENGANTAR

Puji syukur senantiasa penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya sehingga laporan skripsi ini dapat terselesaikan.

Dendrobium sp. termasuk dalam genus anggrek yang terbesar di dunia dan berasal dari Indonesia. Eksploitasi besar-besaran yang marak dilakukan dapat mengancam keberadaan spesies asli Indonesia. Untuk itu, perlu dilakukan konservasi ex situ untuk melestarikan plasma nutfah anggrek di Indonesia. Salah satu tekniknya ialah dengan menggunakan kultur in vitro melalui embriogenesis somatik. Namun adanya interaksi genotip lingkungan menuntut pemulia tanaman untuk mengetahui kombinasi terbaik antara anggrek *Dendrobium* sp. dengan media tumbuh pada kultur in vitro. Diharapkan penelitian ini nantinya akan mendukung program konservasi menjadi lebih efektif dan efisien, mengingat kurangnya informasi tentang hal ini. Skripsi yang berjudul “RESPON ANGGREK *Dendrobium* sp. PADA KULTUR IN VITRO” ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi terbaik antara anggrek *Dendrobium* sp. dengan media tumbuh pada kultur in vitro.

Penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada Dr. Ir. Lita Soetopo dan Ir. Respatijarti, MS atas bimbingan yang telah diberikan selama pelaksanaan skripsi, serta kepada Ir. Sri Lestari Purnamaningsih, MS dan Prof. Dr. Ir. Kuswanto, MS atas saran dan masukan yang telah diberikan sehingga penyusunan laporan skripsi ini menjadi lebih baik.

Semoga laporan ini dapat berguna bagi pembaca secara khusus dan dunia pertanian secara umum.

Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

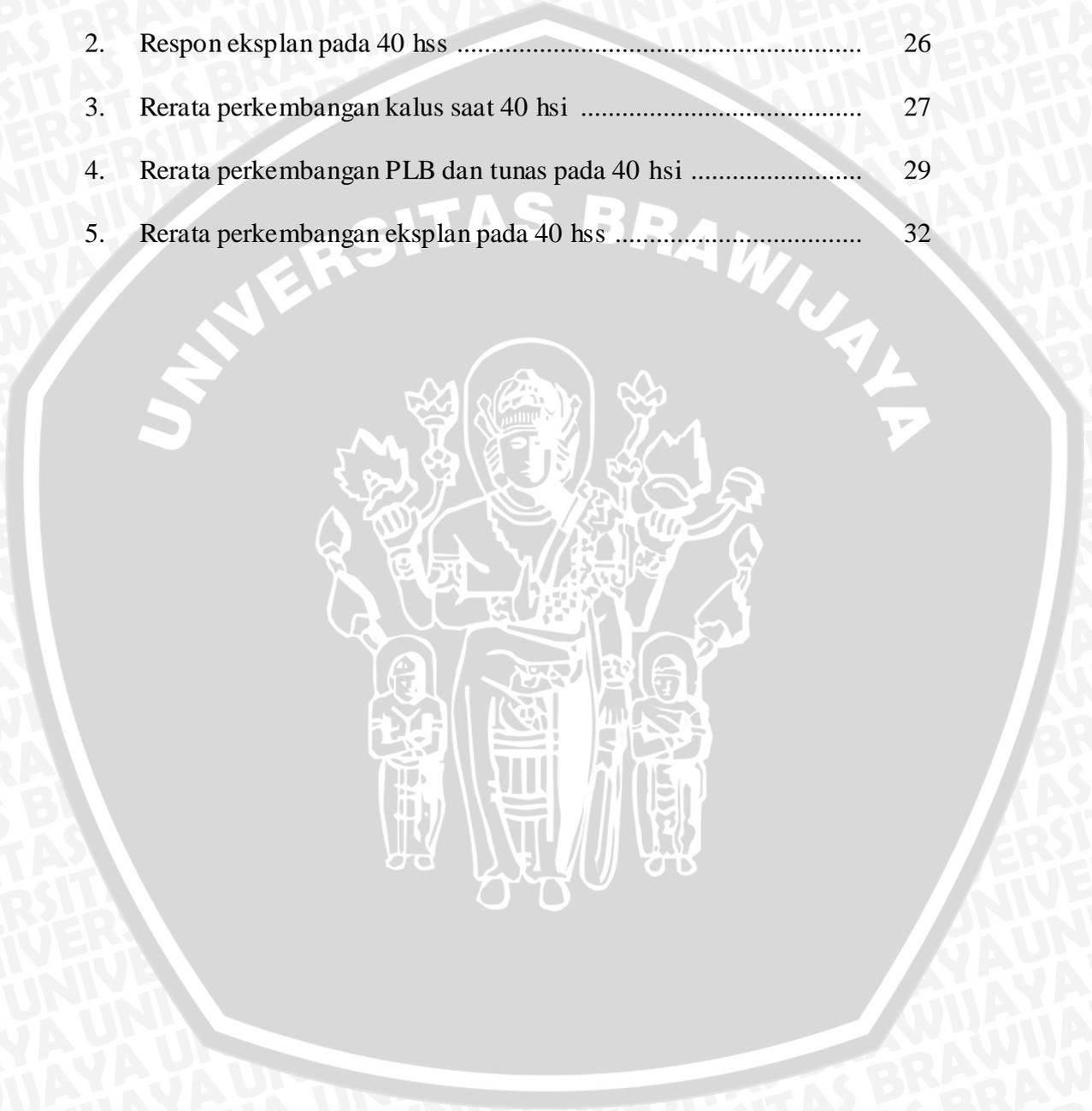
	Halaman
LEMBAR PERSETUJUAN	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
RIWAYAT HIDUP	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan	2
1.3 Hipotesis	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Klasifikasi anggrek Dendrobium	3
2.2 Morfologi anggrek Dendrobium	3
2.3 Perbanyakan anggrek Dendrobium	5
2.4 Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan	5
2.4.1 Bahan tanam	6
2.4.2 Media tumbuh	6
2.4.3 Lingkungan tumbuh	8
2.4.4 Sterilisasi peralatan, media dan bahan tanam.....	10
2.5 Embriogenesis somatik	10
2.6 Interaksi genotip dengan lingkungan	13
3. BAHAN DAN METODE	
3.1 Tempat dan waktu	15
3.2 Alat dan bahan	15
3.3 Metode Penelitian	15



3.4 Pelaksanaan Percobaan	17
3.4.1 Pembuatan larutan stok media	17
3.4.2 Pembuatan media tanam	18
3.4.3 Inisiasi dan inokulasi eksplan.....	19
3.5 Pengamatan	20
3.6 Analisa data	22
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil	23
4.1.1 Percobaan 1 tahap I : Induksi mata tunas dari eksplan tunas	23
4.1.2 Percobaan 1 tahap II: Induksi kalus dari eksplan tunas	24
4.1.3 Percobaan 2 tahap I: Induksi kalus dari eksplan PLB	27
4.1.4 Percobaan 2 tahap II : Induksi PLB dan tunas dari eksplan PLB ..	30
4.2 Pembahasan	34
4.2.1 Percobaan 1 tahap I : Induksi mata tunas dari eksplan tunas	34
4.2.2 Percobaan 1 tahap II: Induksi kalus dari eksplan tunas	37
4.2.3 Percobaan 2 tahap I: Induksi kalus dari eksplan PLB	39
4.2.4 Percobaan 2 tahap II : Induksi PLB dan tunas dari eksplan PLB ..	42
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	52

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Analisis ragam pada RAL	22
2.	Respon eksplan pada 40 hss	26
3.	Rerata perkembangan kalus saat 40 hsi	27
4.	Rerata perkembangan PLB dan tunas pada 40 hsi	29
5.	Rerata perkembangan eksplan pada 40 hss	32

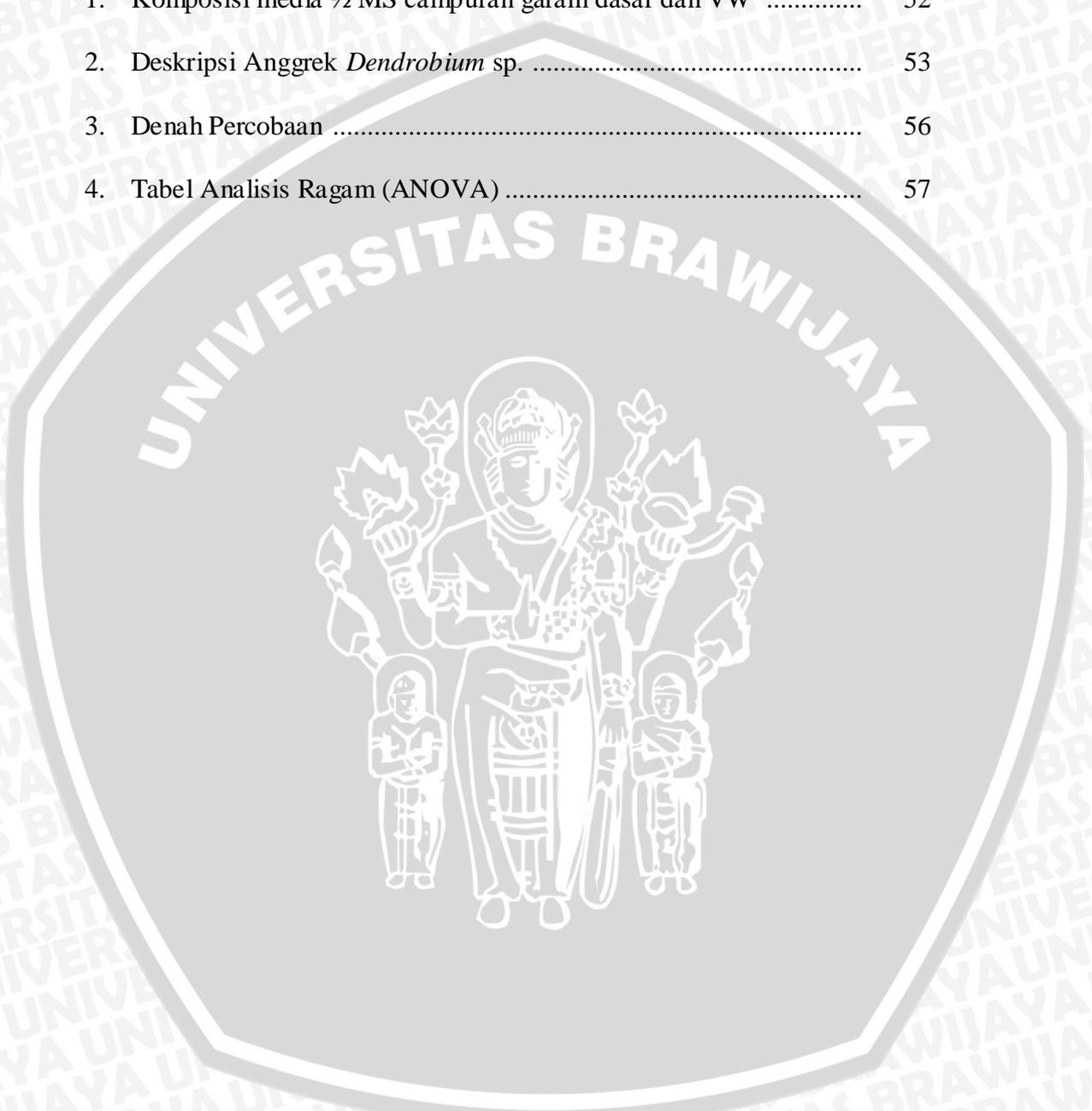


DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Tahap-tahap embriogenesis somatik pada tanaman monokotil	11
2.	Warna eksplan pada 40 hsi	23
3.	Pertumbuhan eksplan tunas	24
4.	Kombinasi kalus dan PLB <i>D. strebloceras</i>	26
5.	Tunas <i>D. strebloceras</i>	26
6.	Kombinasi kalus dan PLB <i>D. strebloceras</i>	26
7.	Kalus <i>D. spectabile</i> saat 40 hsi pada media VW dan ½ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹	28
8.	PLB <i>D. spectabile</i> saat 40 hsi pada media VW dan ½ MS	30
9.	Tunas <i>D. spectabile</i> pada media VW + BA 0,5 mg.L ⁻¹ , ½ MS dan ½ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹	30
10.	Kalus <i>D. spectabile</i> saat 40 hss pada media VW, ½ MS dan ½ MS + BA 2 mg.L ⁻¹	31
11.	PLB <i>D. spectabile</i> saat 40 hss pada media VW, ½ MS dan ½ MS + BA 2 mg.L ⁻¹	31
12.	Tunas <i>D. spectabile</i> saat 40 hss pada media VW, VW + BA 2 mg.L ⁻¹ , ½ MS dan ½ MS + BA 2 mg.L ⁻¹	33
13.	Kombinasi PLB dan tunas <i>D. spectabile</i> saat 40 hss pada media VW, VW + BA 2 mg.L ⁻¹ , ½ MS dan ½ MS + BA 2 mg.L ⁻¹	33
14.	Kombinasi kalus dan PLB <i>D. spectabile</i> pada media VW dan ½ MS + BA 2 mg.L ⁻¹ saat 40 hss	33

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1.	Komposisi media $\frac{1}{2}$ MS campuran garam dasar dan VW	52
2.	Deskripsi Anggrek <i>Dendrobium</i> sp.	53
3.	Denah Percobaan	56
4.	Tabel Analisis Ragam (ANOVA)	57



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagai salah satu pusat gen dunia, Indonesia merupakan salah satu tempat asal tanaman anggrek, diantaranya ialah anggrek *Dendrobium* sp. *Dendrobium* sp. termasuk dalam genus anggrek yang terbesar di dunia. Diperkirakan anggrek ini terdiri dari 1600 spesies yang dibagi dalam beberapa seksi. *Dendrobium* sp. banyak tersebar di Sri Lanka, India, Cina Selatan, Jepang, Malaysia, Indonesia sampai ke Australia dan Selandia Baru (Lestari, 1990).

Di Indonesia, *Dendrobium* sp. banyak dijumpai di hutan sekitar Jawa, Kalimantan, Sumatera, Irian Jaya, Maluku dan Nusa Tenggara. Beberapa spesies menyebar sangat luas. Di antaranya *Dendrobium anosmum*, tersebar dari India sampai Papua; *Dendrobium erosum* tumbuh di Thailand, Malaysia, Indonesia, Papua hingga Vanuatu; *Dendrobium crumenatum* ditemukan di Myanmar sampai Papua.

Konservasi ex situ merupakan salah satu cara untuk melestarikan plasma nutfah anggrek di Indonesia. Hal ini perlu dilakukan terutama untuk spesies asli Indonesia dan spesies-spesies yang komersial. Dengan melakukan konservasi ex situ, maka spesies-spesies tersebut akan tetap terjaga dan bahkan bertambah jumlahnya. Salah satu teknik nya ialah dengan menggunakan kultur in vitro. Potensi terbesar panggunaan klonal dalam kultur in vitro ialah melalui embriogenesis somatik.

Embriogenesis somatik ialah proses perkembangan embrio dari sel-sel somatik dari berbagai sumber eksplan yang ditumbuhkan pada sistem kultur jaringan. Embrio-embrio tersebut terbentuk tanpa melalui fusi gamet tetapi tetap melalui tahap-tahap morfologi embrio yang khas. Rice, dikutip dari Zulkarnain (2009), menyatakan bahwa embriogenesis somatik merupakan teknik yang paling menjanjikan untuk perbanyakan tanaman pertanian dalam waktu cepat. Kultur-kultur yang bersifat embriogenik dapat menghasilkan embrio dalam jumlah besar dalam satu wadah kultur. Selain itu, embriogenesis somatik menghasilkan embrio-embrio somatik yang bipolar, yakni memiliki ujung-ujung akar dan pucuk yang diperlukan bagi pertumbuhan tanaman lengkap.

Keberhasilan embriogenesis somatik melalui kultur in vitro dipengaruhi oleh faktor genotip eksplan dan lingkungan kultur. Lingkungan dapat didefinisikan sebagai gabungan semua peubah bukan genetik (termasuk pengelolaan tanaman) yang mempengaruhi ekspresi fenotipik (Kasno *et al.*, 2007). Semua variabel yang terlibat dalam produksi tanaman dapat dijelaskan secara kolektif sebagai lingkungan. Setiap faktor yang merupakan bagian dari lingkungan mempunyai potensi yang menyebabkan perbedaan penampilan tanaman. Pada penelitian ini digunakan faktor lingkungan yang dapat diprediksi, yaitu beberapa jenis media kultur. Perbanyakan secara in vitro menunjukkan bahwa spesies yang berbeda membutuhkan media yang berbeda dan bahkan spesifik untuk perkecambahan dan pertumbuhan yang optimum (Gahan dan George, 2008). Untuk itu diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui kombinasi terbaik antara beberapa anggrek *Dendrobium* sp. dengan media tumbuh pada kultur in vitro.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi terbaik antara beberapa anggrek *Dendrobium* sp. dengan media tumbuh pada kultur in vitro.

1.3 Hipotesis

Terdapat kombinasi terbaik antara anggrek *Dendrobium* sp. dengan media tumbuh.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Anggrek *Dendrobium* sp.

Dendrobium sp. termasuk dalam Famili Orchidaceae, Subfamili Epidendroideae, Suku Epidendreae; Dendrobiae dan Genus *Dendrobium* (Anonim, 2005; Sutiyoso dan Sarwono, 2007). R.E. Holttum, seorang ahli botani, membagi genus *Dendrobium* menjadi 20 seksi, yaitu *Diplocaulobium*, *Desmotrichum*, *Sacopodium*, *Bolbidium*, *Euphlebiium*, *Latourea*, *Callista*, *Eugenanthe*, *Nigrohirsutea*, *Phalaenanthe*, *Ceratobium*, *Stachyobium*, *Pedilonum*, *Disticphyllum*, *Rhopalanthe*, *Aporum*, *Oxytophyllum*, *Stongyle*, *Grastidium*, dan *Conostalix* (Anonim, 2005).

2.2 Morfologi Anggrek *Dendrobium* sp.

Bunga anggrek berbentuk khas dan menjadi penciri yang membedakannya dari anggota suku lain. Bunga-bunga anggrek tersusun dalam bentuk rangkaian yang muncul dari tangkai bunga yang panjang. Tangkai bunga muncul dari ketiak daun atau dari ujung tanaman (Iswanto, 2002).

Dendrobium sp. memiliki tiga helai sepal (kelopak bunga) berwarna cerah, berbentuk lanset, meruncing atau bulat dengan ukuran bervariasi. Satu buah sepal yang terletak di punggung atau tengah disebut dengan sepallum dorsalis atau kelopak punggung, sementara dua sepal samping disebut sepal lateralis atau kelopak samping (Iswanto, 2002). Letak sepal terlihat membentuk segi tiga (Gunawan, 1990; Lestari, 1990; Anonim, 2005). Dasarnya bersatu dengan kaki tugu untuk membentuk taji (Lestari, 1990).

Petal (mahkota bunga) berjumlah tiga helai yang juga terletak dalam bentuk segitiga. Petal di bagian tengah membentuk bibir bunga (labellum) yang membentuk semacam platform sebagai tempat serangga penyerbuk hinggap (Gunawan, 1990). Umumnya petal berbentuk lebih bulat dan lebih besar serta bertekstur halus dibanding sepal. Warna petal hampir sama dengan sepal, kecuali petal yang membentuk labellum. Pada beberapa spesies, ukuran labellum lebih besar dan berwarna lebih cerah. Umumnya bibir terbelah menjadi tiga dan bagian dasar menyatu dengan taji bunga (Anonim, 2005).

Benang sari dan tangkai kepala putik menjadi satu membentuk suatu struktur yang disebut column dan terletak di tengah atau pusat bunga. Column memiliki tepung sari yang berbentuk gumpalan bulat yang disebut polinia. Polinia *Dendrobium* sp. biasanya berjumlah empat, tersusun menjadi dua pasang dalam dua rostellum kecil (Anonim, 2005). Polinia melekat pada ujung column melalui suatu struktur yang disebut plasenta dan tertutup dengan sebuah cap (Gunawan, 1990).

Kepala putik (stigma) terletak di bawah cap dan polinia, menghadap ke labelum. Stigma terlihat seperti lubang dangkal yang bulat dan agak lengket. Ovari (bakal buah) terletak di bawah struktur mahkota dan biasanya bersatu dengan tangkai bunga (Gunawan, 1990).

Buah *Dendrobium* sp. berwarna hijau, berukuran besar dan menggelembung di bagian tengah. Bentuknya seperti kapsul yang berbelah enam. Setelah matang, buah akan pecah di bagian tengah. Biji di dalam buah sangat banyak. Biji-biji angrek ini tidak mempunyai endosperm atau cadangan makanan seperti biji tanaman lainnya. Oleh karena itu untuk perkecambahan dan pertumbuhan awal biji dibutuhkan gula dan senyawa-senyawa lain dari luar atau dari lingkungan sekelilingnya (Gunawan, 1990; Anonim, 2005).

Dendrobium sp. mempunyai daun berbentuk lanset ramping dan lanset membulat. Ukuran serta ketebalannya bervariasi. Daun keluar dari setiap ruas batang berjumlah 1- 2 helai. Posisi daun berhadap-hadapan atau berpasangan. Namun, beberapa *Dendrobium* sp. mempunyai letak daun yang duduk berpasangan dalam satu ruas. Selama satu siklus hidupnya, *Dendrobium* sp. mengalami 2-3 periode pertumbuhan, yaitu periode vegetatif, periode generatif dan beberapa spesies mengalami dormansi. Lama setiap periode tergantung pada spesies dan habitatnya (Anonim, 2005).

Dendrobium sp. memiliki batang vertikal yang disebut umbi semu (pseudobulb). Pola pertumbuhan batangnya termasuk tipe simpodial, di mana pertumbuhan batang terbatas dan akan terhenti setelah mencapai maksimal. Selanjutnya, tunas atau anakan baru keluar dari dasar batang induk sebelumnya (Anonim, 2005; Sutiyoso dan Sarwono, 2007).

2.3 Perbanyak Anggrek *Dendrobium* sp.

Perbanyak tanaman anggrek pada umumnya dilakukan melalui dua cara yaitu, perbanyak generatif dan vegetatif. Secara generatif, benih tanaman diperoleh melalui biji hasil persilangan yang secara genetis biji-biji tersebut bersifat heterozigot. Sehingga benih-benih yang dihasilkan mempunyai sifat tidak mantap dan beragam. Dengan cara ini untuk mendapatkan tanaman yang sama dengan induknya sangatlah sulit, karena persilangan anggrek telah berkembang demikian luasnya. Namun dengan cara ini akan diperoleh varietas baru (Lestari, 1990). Biji anggrek sangat kecil dan tidak mempunyai endosperm (cadangan makanan), sehingga perkecambahan di alam sangat sulit tanpa bantuan jamur yang bersimbiosis dengan biji tersebut. Perbanyak generatif banyak dilakukan dengan metode *in vitro* yaitu dengan menyebarkan dan mengecambahkan biji pada media agar di dalam botol (Hendaryono, 2000).

Perbanyak vegetatif dengan menggunakan bagian somatik dari tubuh tanaman dapat dilakukan dengan cara konvensional maupun modern. Secara konvensional, *Dendrobium* sp. dapat diperbanyak melalui pemisahan rumpun dan pemotongan anak tanaman yang keluar dari batang (keiki) yang selanjutnya ditanam ke media yang sama seperti pakis, moss, serabut kelapa, arang, serutan kayu, disertai campuran pecahan genteng atau batu bata. Perbanyak secara vegetatif ini akan menghasilkan anak tanaman yang mempunyai sifat genetik sama dengan induknya. Namun perbanyak konvensional secara vegetatif ini tidak praktis dan tidak menguntungkan untuk tanaman bunga potong, karena jumlah anakan yang diperoleh dengan cara-cara ini sangat terbatas. Metode kultur *in vitro* yaitu dengan kultur jaringan, merupakan suatu cara perbanyak tanaman secara vegetatif secara modern. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan ialah perbanyak tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril (Rahardja, 1994).

2.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur Jaringan

Kultur jaringan tanaman adalah suatu metode atau teknik mengisolasi bagian tanaman (protoplasma, sel, jaringan dan organ) dan menumbuhkannya pada media buatan dalam kondisi aseptik di dalam ruang yang terkontrol sehingga

bagian-bagian tanaman tersebut dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman lengkap. Teknik kultur jaringan didasarkan pada teori totipotensi (total genetic potential) yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann yang menyatakan bahwa sel tanaman sebagai unit terkecil dapat tumbuh dan berkembang apabila dipelihara dalam kondisi yang sesuai (Muslim, 2009). Berikut ialah faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan.

2.4.1 Bahan Tanam

Salah satu faktor yang sangat mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis eksplan dalam kultur in-vitro ialah genotip tanaman asal eksplan diisolasi. Pengaruh genotip ini umumnya berhubungan erat dengan faktor-faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan eksplan, seperti kebutuhan nutrisi, zat pengatur tumbuh dan lingkungan kultur. Gahan dan George (2008) yang menyatakan bahwa setiap genotipe tanaman akan memberikan tanggapan pertumbuhan in vitro yang berbeda. Perbedaan respon genotip tanaman tersebut dapat diamati pada perbedaan eksplan masing-masing varietas untuk tumbuh dan beregenerasi (Anonim, 2008).

Umur dan kondisi fisiologis bahan juga harus diperhatikan. Semakin tua organ tanaman eksplan yang diambil, proses pembelahan dan regenerasi sel cenderung untuk turun. Umumnya eksplan yang berasal dari jaringan tanaman yang masih muda atau juvenil lebih mudah tumbuh dan beregenerasi dibandingkan dengan jaringan yang telah terdiferensiasi lanjut (Zulkarnain, 2009). Ukuran eksplan juga mempengaruhi laju keberhasilan kultur jaringan. Eksplan dengan ukuran kecil lebih mudah disterilisasi dan kemungkinan terjadinya kontaminasi kecil, namun kemampuannya untuk beregenerasi juga lebih kecil sehingga dibutuhkan media yang lebih kompleks untuk pertumbuhan dan regenerasinya (Zulkarnain, 2009).

2.4.2 Media Tumbuh

Menurut Gunawan (1990), perbedaan komposisi media, komposisi zat pengatur tumbuh dan jenis media yang digunakan akan sangat mempengaruhi pertumbuhan dan regenerasi eksplan yang dikulturkan.

1. Komposisi media

Media tanam harus berisi semua zat yang diperlukan untuk menjamin pertumbuhan eksplan (Hendaryono dan Wijayani, 2002). Perbedaan komposisi media, seperti jenis dan komposisi garam-garam anorganik, senyawa organik sangat mempengaruhi respon eksplan saat dikulturkan. Nitrogen, fosfor, kalium, kalsium, magnesium dan sulfur merupakan komponen makro garam mineral yang dibutuhkan dalam media kultur jaringan. Di samping unsur-unsur makro, sel-sel tanaman juga membutuhkan unsur-unsur mikro tertentu. Unsur hara mikro yang biasa ditambahkan antara lain iodium, asam borat, mangan, seng, molibdenum, tembaga, kobalt dan besi (Zulkarnain, 2009).

Media juga mengandung sumber karbon dan energi yang umumnya bersumber dari sukrosa atau glukosa sebanyak 2-3% atau 20-30 g/l media (Nayak *et al.*, 1997; Meesawat dan Kanchanapoom, 2002; Puchooa, 2004, Utami, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Suplemen organik biasa ditambahkan ke dalam media untuk memacu pertumbuhan eksplan, seperti air kelapa, bubur pisang, jus tomat, madu, ekstrak daging (Aktar *et al.*, 2008).

Media yang sering digunakan pada kultur *in vitro* *Dendrobium* antara lain media Vacin and Went (Aktar *et al.*, 2008; Meesawat dan Kanchanapoom, 2002; Sheela *et al.*, 2006; Widiastoety *et al.*, 1997; Widiastoety *et al.*, 1998), Murashige and Skoog (Khosravi *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007), ½ Murashige and Skoog (Aktar *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2007; Sheela *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008) dan Knudson C (Aktar *et al.*, 2008; Puchooa, 2004).

2. Komposisi hormon pertumbuhan

Hormon pertumbuhan atau zat pengatur tumbuh (ZPT) berperan merangsang dan meningkatkan pertumbuhan serta perkembangan sel, jaringan dan organ tanaman menuju arah diferensiasi tertentu. ZPT yang sering digunakan dalam kultur *in-vitro* ialah golongan auksin dan sitokinin. Peranan auksin dan sitokinin sangat nyata dalam pengaturan pembelahan sel, pemanjangan sel, diferensiasi sel dan pembentukan organ (Zulkarnain, 2009).

Auksin ialah sekelompok senyawa yang fungsinya merangsang pemanjangan sel-sel pucuk yang spektrum aktifitasnya menyerupai IAA (indole-

3-acetic acid) (Zulkarnain, 2009). Auksin yang umum dipakai ialah IAA (Indole Acetic Acid), IBA (Indole Butyric Acid), NAA (Naphtalena Acetic Acid) dan 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy Acetic Acid). Sitokinin yang paling banyak digunakan ialah kinetin BA (Benzil Adenin), BAP (Benzil Adenin Phosphat) dan zeatin (Zulkarnain, 2009). Hasil penelitian pada *Dendrobium candidum* menunjukkan bahwa BA paling efektif dalam menginduksi kalus dari eksplan dibandingkan NAA, kinetin dan 2,4-D. Induksi kalus mengalami kenaikan pada konsentrasi 0 - 8,8 μM dan menurun pada konsentrasi di atas 8,8 - 22,2 μM (Zhao *et al.*, 2008).

Auksin dan sitokinin terkadang ditambahkan secara bersamaan pada media kultur. Akan tetapi konsentrasi yang dibutuhkan dari tiap jenis ZPT sangat beragam tergantung dari jenis tanaman, kondisi kultur, dan senyawa yang digunakan. Meesawat dan Kanchanapoom, (2002) menggunakan kombinasi 1 mg.L^{-1} BA dan 0,1 mg.L^{-1} NAA untuk menginduksi kalus *D. crumenatum*. Penambahan 4,4 μM BA dan 0,54 μM NAA pada media $\frac{1}{2}$ MS menghasilkan lebih dari 50 % eksplan berkalus (Zhao *et al.*, 2008).

3. Keadaan fisik media

Dalam kultur jaringan, media yang digunakan dapat berupa media padat, media semi padat dan media cair. Media yang umum digunakan ialah media padat dan media cair. Pada angrek, media cair biasa digunakan untuk induksi PLB, di mana botol-botol berisi media cair dan eksplan digojog dengan shaker atau penggojog dengan putaran 60-120 rpm (Soeryowinoto dan Soeryowinoto, 1984). Media padat, selain untuk induksi akar dan tunas (Soeryowinoto dan Soeryowinoto, 1984), juga dapat digunakan untuk induksi kalus dan PLB pada angrek (Aktar *et al.*, 2008; Meesawat dan Kanchanapoom, 2002; Nayak *et al.*, 1997; Utami, 2007; Zhao *et al.*, 2008).

2.4.3 Lingkungan Tumbuh

Lingkungan kultur merupakan hasil interaksi antara bahan tanaman, wadah kultur dan lingkungan eksternal ruang kultur yang memiliki pengaruh besar terhadap suatu sistem kultur jaringan.

1. Suhu

Peranan suhu pada kultur *in vitro* lebih kritis dibandingkan kultur *in vivo*. Hal itu dikarenakan sifat jaringan yang peka dan kurangnya mekanisme

perlindungan terhadap jaringan tersebut (Zulkarnain, 2009). Pada sebagian besar laboratorium, suhu yang digunakan ialah konstan, yaitu 25°C (kisaran suhu 17 - 32°C). Tanaman tropis umumnya dikulturkan pada suhu yang sedikit lebih tinggi dari tanaman empat musim, yaitu 27°C (kisaran suhu 24 - 32°C). Meskipun hampir semua tanaman dapat tumbuh pada kisaran suhu tersebut, namun kebutuhan suhu untuk masing-masing jenis tanaman umumnya berbeda-beda. Tanaman dapat tumbuh dengan baik pada suhu optimumnya. Pada suhu ruang kultur dibawah optimum, pertumbuhan eksplan lebih lambat, namun pada suhu diatas optimum pertumbuhan tanaman juga terhambat akibat tingginya laju respirasi eksplan.

Untuk anggrek suhu optimum yang biasa digunakan pada kultur in vitro ialah 25 (Untari *et al.*, 2006; Ishii *et al.*, 1998), 25±1°C (Aktar *et al.*, 2008; Nayak *et al.*, 1997), 25±2°C (Meesawat dan Kanchanapoom, 2002; Zhao *et al.*, 2008), dan 26±2°C (Puchooa, 2004).

2. Kelembaban relatif

Kelembaban merupakan faktor penting yang sangat menentukan keberhasilan kultur in vitro. Kelembaban relatif dalam ruang kultur sekitar 70% (Anonim, 2008; Zulkarnain, 2009), namun kebutuhan kelembaban di dalam wadah kultur mendekati 90%. George dan Sherrington (1984), dikutip dalam Zulkarnain (2009), menyatakan bahwa embrioid *Daucus carota* tumbuh sangat baik pada kelembaban 80-90% dan akan mati bila kelembaban di bawah 60%. Kelembaban relatif yang biasa digunakan pada kultur in vitro anggrek ialah 55-60% (Nayak *et al.*, 1997), 70% (Untari *et al.*, 2006).

3. Cahaya

Pada perbanyakan tanaman secara in-vitro, kultur umumnya diinkubasikan pada ruang penyimpanan dengan penyinaran. Tunas-tunas umumnya dirangsang pertumbuhannya dengan penyinaran, kecuali pada teknik perbanyakan yang diawali dengan pertumbuhan kalus. Sumber cahaya pada ruang kultur ini umumnya ialah lampu fluorescent (TL). Hal ini disebabkan karena lampu TL menghasilkan cahaya warna putih, selain itu sinar lampu TL tidak meningkatkan suhu ruang kultur secara drastis (hanya meningkat sedikit). Lama penyinaran umumnya diatur sesuai dengan kebutuhan tanaman sesuai dengan kondisi

alamiahnya. Periode terang dan gelap umumnya diatur pada kisaran 8 - 16 jam terang dan 16 - 8 jam gelap tergantung varietas tanaman dan eksplan yang dikulturkan (Rahardja, 1994).

Kultur *in vitro* anggrek umumnya menggunakan iluminasi sebesar 2000-3000 lux (Aktar *et al.*, 2008), 3000 lux (Utami, 2007), $20\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Meesawat dan Kanchanapoom, 2002), $30\text{-}34\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Zhao *et al.*, 2008), Nayak *et al.*, 1997) dan $50\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Puchooa, 2004) dengan periode terang 16 jam (Aktar *et al.*, 2008; Nayak *et al.*, 1997; Meesawat dan Kanchanapoom, 2002; Puchooa, 2004).

2.4.4 Sterilisasi Peralatan, Media dan Bahan Tanam

Media kultur jaringan umumnya membutuhkan media dan nutrisi yang cocok bagi pertumbuhan sel tanaman, juga bebas dari bakteri dan jamur. Peralatan yang digunakan selama kultur pun harus steril. Karena itu, peralatan dan media yang akan digunakan harus disterilkan terlebih dahulu dalam autoclave bersuhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15-20 menit (Aktar *et al.*, 2008; Meesawat dan Kanchanapoom, 2002; Zhao *et al.*, 2008; Nayak *et al.*, 1997; Puchooa, 2004).

Untuk menghilangkan sumber kontaminasi, bahan tanam harus disterilkan terlebih dahulu. Sterilisasi bahan tanam dilakukan melalui pencucian dengan deterjen dan perendaman dalam bahan sterilisasi seperti natrium hipoklorit, kalsium hipoklorit, alkohol, betadine dan benlate. Kepekatan bahan sterilan dan lamanya perendaman menentukan keberhasilan sterilisasi. Bahan sterilan pun dapat meracuni jaringan, karena itu tingkat konsentrasi dan lama perendaman harus benar-benar diperhatikan (Zulkarnain, 2009).

2.5 Embriogenesis Somatik

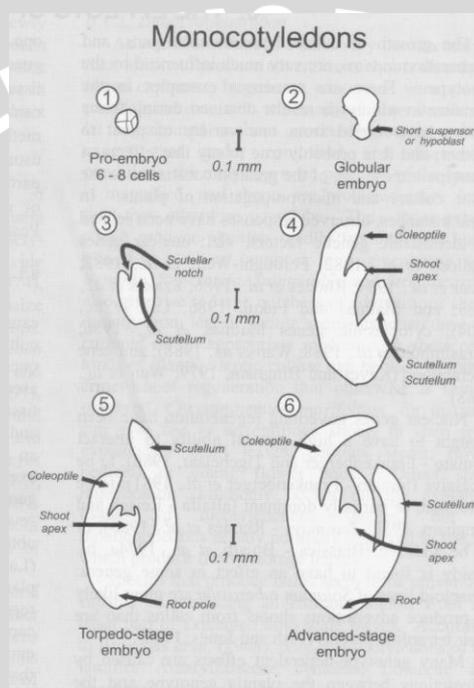
Embriogenesis somatik merupakan suatu proses di mana sel somatik (baik haploid maupun diploid) berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet. Istilah embrio somatik pertama kali digunakan oleh Tolkin pada tahun 1964 yang menggambarkan pembentukan organisme dari suatu sel atau kumpulan sel somatik. Embrio somatik dapat dicirikan dari strukturnya yang bipolar, yaitu

mempunyai dua calon meristem, yaitu meristem akar dan meristem tunas. Dengan memiliki struktur tersebut maka perbanyakannya melalui embrio somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif yang unipolar. Di samping strukturnya, tahap perkembangan embrio somatik menyerupai embrio zigotik. Secara spesifik tahap perkembangan tersebut dimulai dari fase globular, fase hati, fase torpedo, dan planlet (Zulkarnain, 2009).

Embrio somatik dapat terbentuk melalui dua jalur, yaitu secara langsung maupun tidak langsung. Pada embriogenesis langsung, sel-sel embriogenik diinduksi secara langsung dari sel-sel eksplan. Sedangkan pada embriogenesis tidak langsung tidak didahului oleh terbentuknya kalus (Sutanto dan Aziz, 2006). Dalam perkembangannya, kalus yang terbentuk pada embriogenesis tidak langsung dapat mengalami perubahan, baik perubahan warna maupun bentuk. Kalus Phalaenopsis yang jernih dapat berubah warna menjadi kekuningan dan hijau kekuningan (Utami, 2007). Kalus dari eksplan *D. candidum* yang telah disubkultur tampak mengalami tiga perubahan, yaitu kuning muda, putih dan coklat. Kalus berwarna kuning muda memiliki potensi tumbuh awal yang baik, tumbuh cepat, dan secara relatif terdiri dari massa kompak dari butiran-butiran isodiametrik pada permukaannya. Kalus ini kemudian terus melakukan proliferasi dan perlahan menjadi hijau dan banyak membentuk PLB pada media $\frac{1}{2}$ MS. Kalus berwarna putih secara perlahan berubah menjadi basah. Sedangkan kalus berwarna coklat mula-mula mengalami proliferasi jaringan yang berwarna lebih terang dan kemudian kembali berwarna coklat. Setelah kalus ini dipindahkan pada media $\frac{1}{2}$ MS + NAA (1,08; 2,7; 5,4 μ M) + IBA (2,5; 5,0 μ M) beberapa butiran berwarna hijau muda muncul dari permukaan kalus yang berwarna coklat. Butiran-butiran tersebut menjadi hijau dan kemudian berkembang menjadi PLB. menunjukkan (Zhao *et al.*, 2008). Jumlah PLB per eksplan *Dendrobium* semakin bertambah setiap saat. Dalam waktu 20 hari, jumlah PLB per eksplan *Dendrobium* pada media VW dan $\frac{1}{2}$ MS bertambah 1,2-2 kali lipat (Aktar *et al.*, 2008).

Keberhasilan regenerasi melalui embriogenesis somatik dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain formulasi media yang berbeda pada setiap tahap perkembangan embrio somatik serta jenis eksplan yang digunakan. Pada tahap

pembentukan struktur globular dan hati sering digunakan zat pengatur tumbuh sitokinin seperti benzyladenin (BA) atau yang mempunyai peran fisiologis yang sama yaitu thidiazuron (Husni *et al.*, 1997) atau 2,4-D, dan NAA apabila embrio somatik melalui fase kalus (Hutami *et al.*, 2002). Untuk tahap pendewasaan, konsentrasi sitokinin diturunkan dan untuk tahap perkecambahan sering ditambahkan GA3 (Mariska *et al.*, 2001). Sebagai eksplan umumnya digunakan jaringan atau organ yang bersifat embriogenik seperti embrio zigotik, kotiledon, mata tunas, dan kecambah muda (hipokotil dan epikotil).



Gambar 1. Tahap-tahap embriogenesis somatik pada tanaman monokotil (Gahan dan George, 2008)

Teknik embriogenesis somatik banyak mendapat perhatian karena jumlah propagula yang dihasilkan tidak terbatas dan dapat diperoleh dalam waktu yang lebih singkat. Di samping itu, untuk mendukung program pemuliaan tanaman melalui rekayasa genetika, penggunaan embrio somatik dapat mempercepat keberhasilan dengan peluang transformasi yang lebih tinggi karena embrio somatik dapat berasal dari satu sel somatik. Untuk penyimpanan jangka pendek maupun jangka panjang, embrio somatik dianggap merupakan bahan tanaman yang ideal untuk disimpan karena apabila diregenerasikan dapat membentuk bibit

somatik (Purnamaningsih, 2002). Selain itu, regenerasi melalui embriogenesis somatik lebih efisien (Bakti *et al.*, 2007).

Di samping keuntungan, terdapat beberapa kendala dalam penerapan embriogenesis, yaitu peluang terjadi mutasi lebih tinggi, metode lebih sulit, ada penurunan daya morfogenesis dari kalus embriogenik karena subkultur berulang serta memerlukan penanganan yang lebih intensif karena kultur lebih rapuh. Namun demikian, variasi yang dihasilkan sering dianggap menguntungkan karena dapat digunakan sebagai sumber keragaman genetik (Purnamaningsih, 2002).

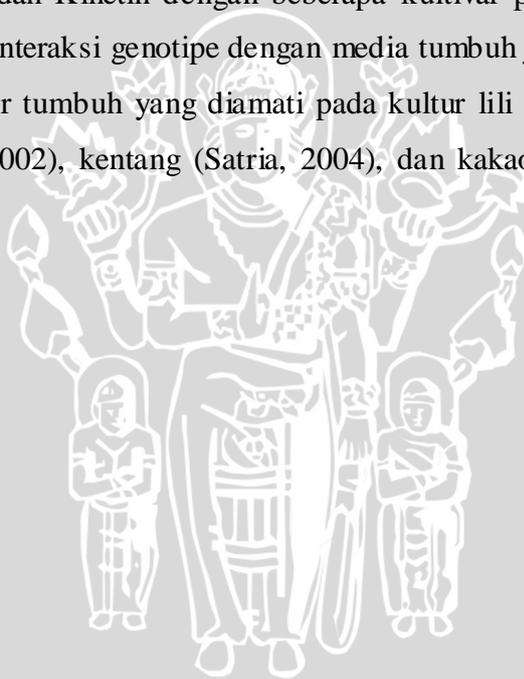
2.6 Interaksi Genotip dengan Lingkungan

Tanaman tumbuh pada rentang kondisi yang luas. Lingkungan dapat didefinisikan sebagai gabungan semua peubah (termasuk pengelolaan tanaman) bukan genetik yang mempengaruhi ekspresi fenotipik (Kasno *et al.*, 2007). Semua variabel yang terlibat dalam produksi tanaman dapat dijelaskan secara kolektif sebagai lingkungan. Jika kultivar dibandingkan pada lingkungan yang berbeda, penampilan relatif kultivar tersebut tidak akan sama. Setiap faktor yang merupakan bagian dari lingkungan mempunyai potensi yang menyebabkan perbedaan penampilan tanaman. Faktor lingkungan dibagi menjadi dua macam, yaitu faktor yang dapat diprediksi dan aktor yang tidak dapat diprediksi. Faktor yang dapat diprediksi terjadi dengan pola yang sistematis atau dapat dikendalikan oleh manusia, misal jenis tanah atau media tanam, waktu tanam, jarak tanam, populasi tanaman, jenis dan dosis pupuk. Faktor yang tidak dapat diprediksi memiliki fluktuasi yang tidak konsisten, misal curah hujan, temperatur, dan kelembaban relatif.

Interaksi antara genotipe dan lingkungan merupakan masalah utama bagi pemulia tanaman dalam usaha mengembangkan kultivar hasil seleksinya (Harsanti *et al.*, 2003). Perubahan penampilan relatif genotip pada lingkungan yang berbeda disebut interaksi genotip x lingkungan ($G \times L / G \times E$). Interaksi genotip lingkungan juga didefinisikan sebagai kegagalan genotip yang diuji untuk berpenampilan relatif sama pada berbagai lingkungan percobaan (Basir, 1998). Hal ini menguatkan para pemulia untuk menguji adaptasi genotip.

Pada penelitian ini digunakan lingkungan tumbuh yang dapat dikontrol, yaitu media kultur. Setiap genotipe tanaman memiliki respon pertumbuhan yang berbeda terhadap media kultur yang berbeda (Winarsih *et al.*, 2003). Hasil penelitian Damayanti *et al.* (2007) menunjukkan adanya interaksi pada beberapa kultivar lili terhadap medium MS dengan beberapa kombinasi 2,4-D dan 1 ppm BA. Pengamatan terhadap jumlah buku, tinggi planlet dan jumlah tunas beberapa klon tanaman kentang yang ditanam pada media kultur *in vitro* dengan pemberian konsentrasi BAP yang berbeda memperlihatkan interaksi yang berbeda nyata (Satria, 2004).

Interaksi genotipe dengan media tumbuh tidak selalu terjadi. Hasil penelitian Nisa dan Rodinah (2005) menunjukkan tidak terjadi interaksi antara media MS yang ditambah NAA dan Kinetin dengan beberapa kultivar pisang pada semua peubah pengamatan. Interaksi genotipe dengan media tumbuh juga tidak terdapat pada beberapa karakter tumbuh yang diamati pada kultur lili (Damayanti *et al.*, 2007; Kenyo *et al.*, 2002), kentang (Satria, 2004), dan kakao (Winarsih *et al.*, 2003).



3. METODE PELAKSANAAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di laboratorium Soerjanto Orchid Batu. Penelitian dilaksanakan selama bulan September 2009 sampai Januari 2010.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan antara lain entkas, autoklaf, timbangan analitik, sendok, erlenmeyer, gelas ukur, pipet, pengaduk, pH universal, botol kultur, corong, saringan, penyumbat karet, pinset, scalpel, lampu bunsen, sprayer, petridish, kardus, ruang kultur yang berisi rak, lampu fluorescence, timer, AC.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain senyawa kimia untuk pembuatan media $\frac{1}{2}$ MS dan VW seperti pada lampiran 1, BA (Benzyl Adenin), NAA (Naphtalena Acetic Acid), NaOH, HCl, aquades, alkohol 70%, clorox (NaOCl) 12%, Teepol (detergen cair), Bayclin®, sukrosa, air kelapa, agar, dan bahan tanam. Bahan tanam terdiri dari tunas aksilar *D. lineale*, *D. pseudoconantum*, *D. strebloceras* dan *D. veratrifolium* serta PLB *D. spectabile* dan *D. aschipilanense*.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dibagi menjadi dua percobaan, di mana tiap percobaan terdiri dari dua tahap.

1. Percobaan 1 Tahap I

Pada percobaan ini digunakan eksplan yang berasal dari tunas aksilar. Percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Perlakuan terdiri dari kombinasi empat spesies dan empat media, sehingga terdapat enam belas perlakuan, yaitu :

G1M1 = *D. lineale* pada media VW

G1M2 = *D. lineale* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹

G1M3 = *D. lineale* pada media $\frac{1}{2}$ MS

G1M4 = *D. lineale* pada media $\frac{1}{2}$ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹

G2M1 = *D. pseudoconantum* pada media VW

G2M2 = *D. pseudoconantum* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹

G2M3 = *D. pseudoconantum* pada media ½ MS

G2M4 = *D. pseudoconantum* pada media ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹

G3M1 = *D. strebloceras* pada media VW

G3M2 = *D. strebloceras* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹

G3M3 = *D. strebloceras* pada media ½ MS

G3M4 = *D. strebloceras* pada media ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹

G4M1 = *D. veratrifolium* pada media VW

G4M2 = *D. veratrifolium* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹

G4M3 = *D. veratrifolium* pada media ½ MS

G4M4 = *D. veratrifolium* pada media ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹

2. Percobaan 1 Tahap II

Pada tahap II digunakan eksplan yang berasal dari eksplan tahap I. Percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Perlakuan terdiri dari kombinasi empat spesies dan empat media, sehingga terdapat enam belas perlakuan, yaitu :

G1M1 = *D. lineale* pada media VW

G1M2 = *D. lineale* pada media VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

G1M3 = *D. lineale* pada media ½ MS

G1M4 = *D. lineale* pada media ½ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

G2M1 = *D. pseudoconantum* pada media VW

G2M2 = *D. pseudoconantum* pada media VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

G2M3 = *D. pseudoconantum* pada media ½ MS

G2M4 = *D. pseudoconantum* pada media ½ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

G3M1 = *D. strebloceras* pada media VW

G3M2 = *D. strebloceras* pada media VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

G3M3 = *D. strebloceras* pada media ½ MS

G3M4 = *D. strebloceras* pada media ½ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

G4M1 = *D. veratrifolium* pada media VW

G4M2 = *D. veratrifolium* pada media VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

G4M3 = *D. veratrifolium* pada media ½ MS

G4M4 = *D. veratrifolium* pada media ½ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

3. Percobaan 2 Tahap I

Pada percobaan 2, digunakan eksplan PLB (Protocorm like body). Percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Tiap ulangan terdiri dari 3 botol yang masing-masing botol berisi 10 eksplan. Perlakuan terdiri dari kombinasi dua spesies dan empat media, sehingga terdapat delapan perlakuan, yaitu :

D1M1 = *D. spectabile* pada media VW

D1M2 = *D. spectabile* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹

D1M3 = *D. spectabile* pada media ½ MS

D1M4 = *D. spectabile* pada media ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹

D2M1 = *D. aschipilanense* pada media VW

D2M2 = *D. aschipilanense* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹

D2M3 = *D. aschipilanense* pada media ½ MS

D2M4 = *D. aschipilanense* pada media ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹

4. Percobaan 2 Tahap II

Tahap II menggunakan eksplan yang berasal dari eksplan tahap I. Percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Perlakuan terdiri dari kombinasi dua spesies dan empat media, sehingga terdapat delapan perlakuan, yaitu :

D1M1 = *D. spectabile* pada media VW

D1M2 = *D. spectabile* pada media VW + BA 2 mg.L⁻¹

D1M3 = *D. spectabile* pada media ½ MS

D1M4 = *D. spectabile* pada media ½ MS + BA 2 mg.L⁻¹

D2M1 = *D. aschipilanense* pada media VW

D2M2 = *D. aschipilanense* pada media VW + BA 2 mg.L⁻¹

D2M3 = *D. aschipilanense* pada media ½ MS

D2M4 = *D. aschipilanense* pada media ½ MS + BA 2 mg.L⁻¹

3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1 Pembuatan Larutan Stok Media

Masing-masing senyawa untuk tiap media serta BA dan NAA dibuat larutan stoknya. Pembuatan larutan stok bertujuan untuk menghemat waktu dan

memudahkan pekerjaan menimbang berulang-ulang untuk setiap kali pembuatan media. Larutan stok untuk senyawa makro, BA, dan NAA, dibuat dengan kepekatan 10 kali, sedangkan untuk senyawa mikro dan stok Fe-EDTA, masing-masing dibuat dengan kepekatan 100 kali.

$$\text{Jumlah senyawa yang diperlukan dihitung menggunakan rumus} = \frac{\text{kepekatan larutan stok} \times \text{berat senyawa per liter media}}{1000 \text{ ml} / \text{volume larutan stok (ml)}}$$

Senyawa yang telah ditimbang, dilarutkan dengan aquades sampai volume yang diinginkan. Kemudian larutan stok diberi label, ditutup rapat dan disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.2 Pembuatan Media Tanam

Langkah pertama dalam pembuatan media ialah mempersiapkan peralatan yang akan digunakan, larutan stok senyawa makro, stok senyawa mikro, stok Fe-EDTA, stok BA, dan stok NAA, air kelapa, agar-agar, sukrosa dan aquades. Larutan stok memiliki kepekatan yang lebih besar dari kepekatan media, jadi untuk mendapatkan media dengan konsentrasi yang sesuai harus dilakukan pengenceran larutan stok. Volume larutan stok (ml) yang harus diambil untuk dilarutkan dihitung menggunakan rumus =

$$\frac{\text{konsentrasi senyawa} \times \text{volume media (ml)}}{\text{kepekatan larutan stok}}$$

Masing-masing larutan stok yang sudah diukur, dicampur menjadi satu dengan sukrosa, ditambahkan aquades sampai volume yang diinginkan. Untuk media VW, ditambah 150 ml air kelapa muda sebelum ditambah aquades. Kemudian larutan tersebut diaduk dan diukur pH-nya. pH untuk media ½ MS sebesar 5,8 dan untuk VW sebesar 5,3. Jika pH terlalu rendah maka ditambah larutan NaOH dan jika pH terlalu tinggi ditambah HCl. Kemudian ditambahkan agar dan dipanaskan sampai mendidih. Larutan media dimasukkan ke dalam botol yang telah disterilisasi sebanyak 25 ml per botol dan ditutup dengan penyumbat karet. Media dan alat-alat untuk penanaman eksplan disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C pada tekanan 1,5 atm selama 20 menit.

Media yang telah steril dimasukkan ke dalam ruang kultur, dan harus disemprot alkohol 70% sebelum dimasukkan ke dalam entkas.

3.4.3 Inisiasi dan Inokulasi Eksplan

Untuk bahan tanam berupa tunas aksilar, dipilih tunas yang masih muda dan sehat dengan panjang ± 10 cm. Tunas dipisahkan dari induknya kemudian dicuci dengan perlahan dengan air mengalir, kemudian digojog dalam larutan deterjen cair (Teepol). Setelah tunas bersih, dilakukan sterilisasi permukaan. Sterilisasi dilakukan dua kali, sterilisasi di luar dan sterilisasi di dalam entkas. Sterilisasi pertama, dengan menggojog tunas dalam cairan clorox 12% + 1 tetes Teepol selama 15 menit. Kemudian bagian pucuk dan pangkal tunas dipotong sedikit, disemprot dengan alkohol 70% dan dimasukkan ke dalam entkas. Sterilisasi kedua (di dalam entkas) dengan menggojog eksplan pada larutan clorox 6% + 1 tetes Teepol selama 10 menit kemudian dibilas dengan aquades sebanyak tiga kali. Untuk eksplan PLB, botol yang berisi PLB harus dibersihkan dan disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke dalam entkas. Pada eksplan PLB tidak dilakukan sterilisasi, PLB cukup dibilas dengan aquades untuk menghilangkan sisa-sisa agar yang menempel.

Inokulasi eksplan dilakukan dalam entkas yang steril. Cara inokulasi sebagai berikut :

1. Percobaan 1 Tahap I

Setelah alat-alat disterilkan dengan membakar diatas api bunsen, seludang yang menutup tunas dibuka satu per satu mulai dari bagian bawah sampai terlihat mata tunas. Seludang harus dibuka dengan hati-hati tanpa melukai mata tunas. Tunas kemudian dipotong-potong, ditanam pada botol kultur dan dimasukkan ke dalam ruang kultur. Kebutuhan cahaya dipenuhi dengan menggunakan lampu TL 40 watt dengan periode terang selama 16 jam dan periode gelap selama 8 jam dan suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2. Percobaan 1 Tahap II

Setelah 40 hari, mata tunas dipotong-potong dan disubkultur pada media VW, VW + BA 1 mg.L^{-1} + NAA $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{2}$ MS + BA 1 mg.L^{-1} + NAA $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ untuk induksi kalus. Eksplan ditanam pada botol kultur dan

dimasukkan ke dalam ruang kultur. Kebutuhan cahaya dipenuhi dengan menggunakan lampu TL 40 watt dengan periode terang selama 16 jam dan periode gelap selama 8 jam dan suhu $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3. Percobaan 2 Tahap I

Untuk bahan tanam berupa PLB tidak diperlukan sterilisasi eksplan, akan tetapi botol yang berisi PLB harus dibersihkan dan disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke dalam entkas. PLB diambil dari dalam botol, dicuci dengan aquades untuk menghilangkan sisa-sisa agar. Eksplan dipotong menjadi dua secara membujur kemudian ditanam dalam botol kultur. Masing-masing botol berisi sepuluh eksplan. Botol-botol kultur kemudian dikulturkan dalam keadaan gelap selama 40 hari. Keadaan gelap dilakukan dengan memasukkan botol kultur ke dalam kardus yang sudah disterilkan terlebih dahulu.

4. Percobaan 2 Tahap II

Setelah 40 hari, eksplan yang berasal dari percobaan 2 tahap 1 dikeluarkan dari botol sebelumnya menggunakan pipet panjang, kemudian disubkultur pada media VW, VW + BA $8,8 \mu\text{M.L}^{-1}$, $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{2}$ MS + BA $8,8 \mu\text{M.L}^{-1}$ selama 40 hari. Eksplan dikulturkan pada media yang berkesesuaian dengan media pada tahap 1. Eksplan yang sebelumnya ditanam pada media tanpa tambahan BA dikulturkan kembali pada media tanpa BA dan eksplan yang sebelumnya ditanam pada media dengan tambahan BA dikulturkan kembali pada media dengan BA. Konsentrasi BA lebih tinggi, yaitu sebesar 2 mg.L^{-1} BA.

3.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan secara deskriptif tanpa merusak eksplan.

1. Percobaan 1 Tahap I

Parameter yang diamati meliputi :

- Perkembangan mata tunas pada eksplan.
- Warna eksplan pada umur 40 hsi (hari setelah inokulasi), dibandingkan dengan colour chart RHS (Royal Horticultural Society) London.

2. Percobaan 1 Tahap II

Parameter yang diamati meliputi :

- a. Saat inisiasi kalus, dihitung jumlah hari sejak inokulasi hingga muncul kalus.
- b. Persentase eksplan yang membentuk kalus, dihitung pada umur 40 hss (hari setelah subkultur) dengan rumus

$$= \frac{\text{jumlah eksplan yang membentuk kalus}}{\text{jumlah eksplan yang disubkultur}} \times 100\%$$
- c. Warna kalus, dibandingkan dengan colour chart RHS (Royal Horticultural Society) London.

3. Percobaan 2 Tahap I

Parameter yang diamati meliputi :

- a. Saat inisiasi kalus, dihitung sejak inokulasi, dengan indikasi terjadi pembesaran dari ukuran semula.
- b. Persentase eksplan yang berhasil membentuk kalus, dihitung pada umur 40 hsi dengan rumus = $\frac{\text{jumlah eksplan yang membentuk kalus}}{\text{jumlah eksplan yang diinokulasi}} \times 100\%$
- c. Warna kalus, diamati pada umur 40 hsi, dibandingkan dengan colour chart RHS (Royal Horticultural Society) London.

4. Percobaan 2 Tahap II

Parameter yang diamati meliputi :

- a. Persentase eksplan yang membentuk kalus, dihitung pada umur 40 hss dengan rumus = $\frac{\text{jumlah eksplan yang membentuk kalus}}{\text{jumlah eksplan yang disubkultur}} \times 100\%$
- b. Saat inisiasi PLB, dihitung hari sejak subkultur, dengan indikasi terbentuk PLB dari eksplan yang diinokulasi.
- c. Persentase eksplan yang berhasil membentuk PLB, dihitung pada umur 40 hss dengan rumus = $\frac{\text{jumlah eksplan yang membentuk plb}}{\text{jumlah eksplan yang disubkultur}} \times 100\%$
- d. Saat inisiasi tunas, dihitung sejak subkultur, dengan indikasi terbentuk tunas dari eksplan yang ditanam.
- e. Persentase eksplan yang berhasil membentuk tunas, dihitung pada umur 40 hss dengan rumus = $\frac{\text{jumlah eksplan yang membentuk tunas}}{\text{jumlah eksplan yang disubkultur}} \times 100\%$

- f. Jumlah PLB per eksplan, dihitung jumlah PLB yang terbentuk pada setiap eksplan yang membentuk PLB pada umur 40 hss.
- g. Jumlah tunas per eksplan, dihitung jumlah tunas yang terbentuk pada setiap eksplan yang membentuk tunas pada umur 40 hss.
- h. Warna kalus, diamati pada umur 40 hss, dibandingkan dengan colour chart RHS (Royal Horticultural Society) London.

3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Data kualitatif diuraikan secara deskriptif. Data kuantitatif yang diperoleh dianalisa menggunakan analisis ragam (uji F) pada taraf 5%. Apabila terdapat perbedaan antar perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji BNT pada taraf 5%.

Tabel 1. Analisis ragam pada RAL

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	F hitung
Perlakuan	p-1	JK _p	KT _p	KT _p / KT _g
Galat	p(r-1)	JK _g	KT _g	
Total	pr-1	JK _t		

(Gomez dan Gomez, 1995)

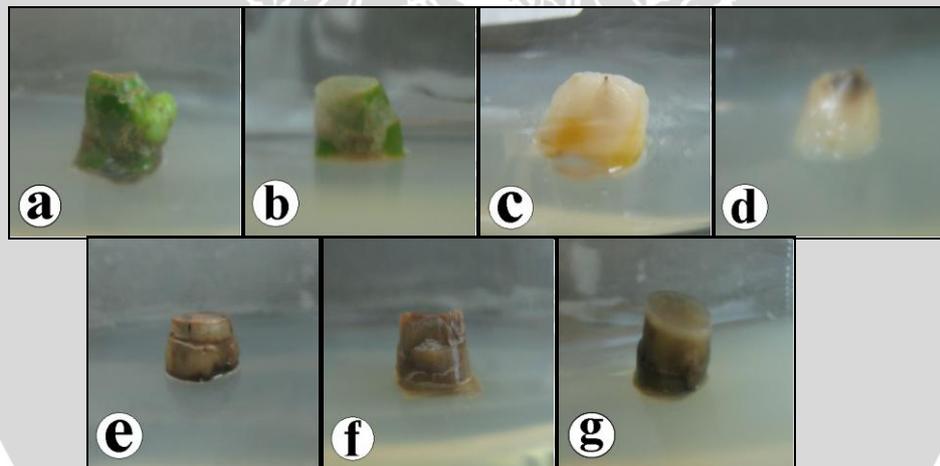
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Percobaan 1 tahap I : Induksi mata tunas dari eksplan tunas

Percobaan satu menggunakan eksplan tunas yang masih muda. Pengamatan pada tahap satu dilakukan terhadap warna serta pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

Semua eksplan tunas yang diinokulasi awalnya berwarna hijau, namun dalam jangka waktu beberapa hari mulai terlihat adanya perubahan warna pada beberapa eksplan. Perubahan warna tersebut bermacam-macam (gambar 2), akan tetapi, secara umum dapat dikatakan bahwa perubahan warna mengarah pada warna putih (156C dan 193D) dan coklat kehitaman (187B). Warna hijau eksplan termasuk hijau kekuningan (139B, 140A, 140B dan 142A), sedangkan warna kuning eksplan berkode 11D dan 12A.

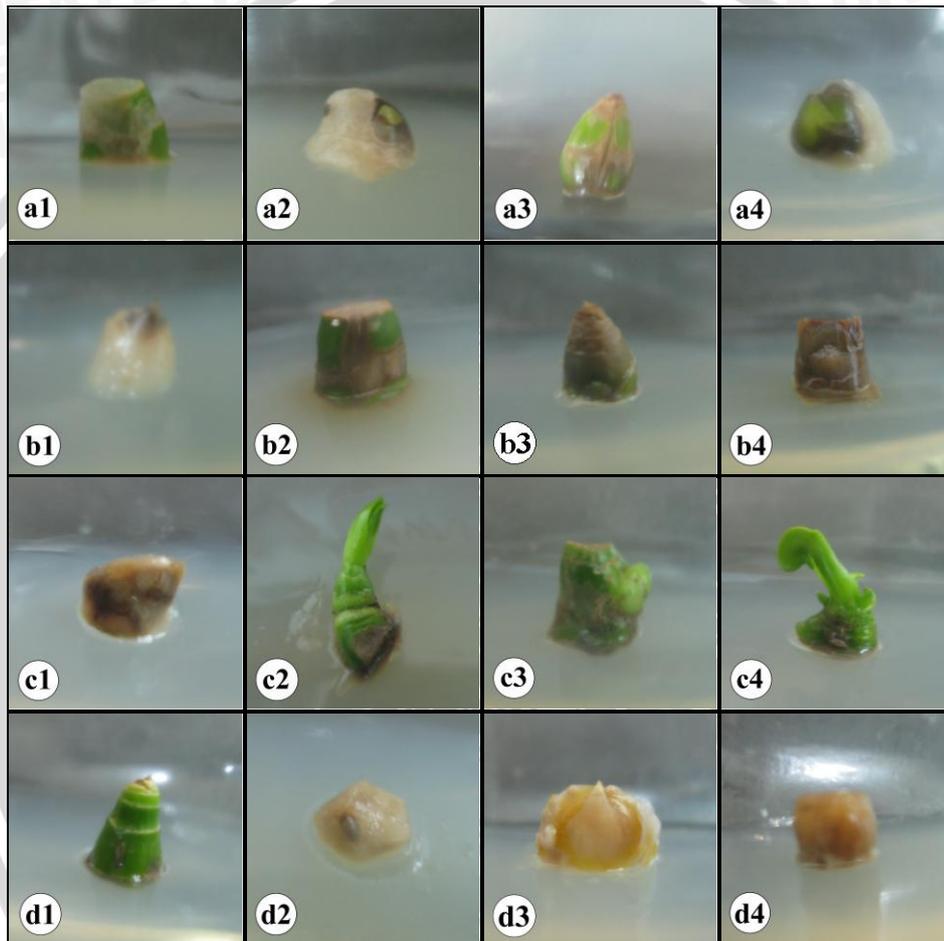


Gambar 2. Warna eksplan pada 40 hsi. (a) hijau, (b) hijau keputihan, (c) putih kekuningan, (d) putih kehitaman, (e) coklat keputihan, (f) coklat, (g) coklat kehitaman

Perubahan warna ini terjadi secara acak pada semua jenis media dan spesies. Eksplan yang mengalami perubahan warna tidak dapat lagi tumbuh dan berkembang. Sedangkan pada eksplan yang masih hijau, mata tunasnya masih dapat tumbuh dan berkembang. Namun tidak semua eksplan yang masih hijau dapat menumbuhkan mata tunas. Eksplan yang dapat merespon perlakuan dengan baik hanya *D. pseudoconanthum* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹ serta *D.*

strebloceras pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹, media ½ MS, dan media ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹.

Indikasi pertumbuhan awal mata tunas dapat dilihat melalui pembengkakan yang terjadi pada mata tunas. Pembengkakan mulai terlihat dua minggu sampai tiga minggu setelah inokulasi. Mata tunas tersebut kemudian tumbuh semakin besar dan ada yang sampai berkembang membentuk tunas daun.



Gambar 3. Pertumbuhan eksplan tunas (a) *D. lineale*, (b) *D. pseudoconanthum*, (c) *D. strebloceras*, (d) *D. veratrifolium*, pada media (1)VW, (2) VW + BA 0,5 mg.L⁻¹, (3) ½ MS, (4) ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹

4.1.2 Percobaan 1 tahap II: Induksi kalus dari eksplan tunas

Tahap ini bertujuan untuk menginduksi kalus. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan pada tahap ini ialah kombinasi BA 1 mg.L⁻¹ dengan NAA 0,1 mg.L⁻¹. Eksplan yang digunakan ialah eksplan dari tahap I yang menunjukkan respon dan perkembangan yang baik yaitu *D. pseudoconanthum* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹ serta *D. strebloceras* pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹, media

$\frac{1}{2}$ MS, dan media $\frac{1}{2}$ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹. Eksplan tersebut kemudian di potong-potong dan dikulturkan pada media untuk tahap dua. Karena eksplan yang dapat kulturkan untuk tahap kedua sangat sedikit, maka tidak semua perlakuan dapat dilakukan dan jumlah eksplan untuk tiap perlakuan hanya satu sampai tiga eksplan saja.

Pada tahap ini sebagian eksplan tidak dapat berkembang dan mengalami perubahan warna menjadi coklat dan sebagian lagi tetap berwarna hijau tanpa mengalami suatu perkembangan. Respon eksplan pada 40 hss dapat dilihat pada tabel 2. Pada tiap perlakuan yang menampakkan respon, eksplan yang dapat merespon hanya satu eksplan saja. Eksplan yang dapat membentuk kalus hanya *D. pseudoconanthum* yang berasal dari media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹ dan ditanam pada media $\frac{1}{2}$ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ (gambar 4a) dengan kalus berwarna hijau kekuningan muda atau light yellowish green (145C). Kalus muncul dimulai dengan munculnya bentukan bulat yang terlihat menutupi salah satu ujung eksplan pada 16 hss, enam hari kemudian (22 hss) mulai muncul kalus dari dalam bentukan bulat tersebut.

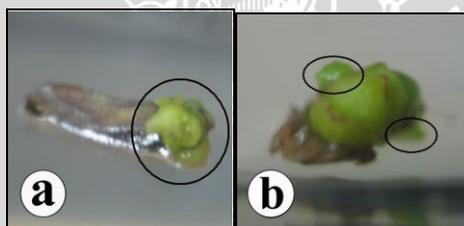
Selain membentuk kalus, terdapat eksplan yang membentuk PLB serta kombinasi kalus dan PLB. Eksplan yang dapat membentuk PLB ialah *D. strebloceras* yang berasal dari media $\frac{1}{2}$ MS dan ditanam pada media VW (gambar 4b), dimana PLB muncul pada 27 hss. Kombinasi kalus dan PLB terdapat pada *D. strebloceras* di media VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ dari eksplan yang berasal dari media $\frac{1}{2}$ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹ (gambar 5). Kalus yang terbentuk berwarna hijau kekuningan muda atau light yellowish green (145C). Kalus mulai terlihat pada 25 hss sedangkan PLB muncul pada 29 hss.

Terdapat juga eksplan yang dapat membentuk tunas, yaitu *D. strebloceras* yang berasal dari media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹ dan disubkultur ke media VW dan $\frac{1}{2}$ MS serta eksplan yang berasal dari media $\frac{1}{2}$ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹ dan disubkultur ke media VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ dan $\frac{1}{2}$ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ seperti yang tampak gambar 6. Calon tunas pada media VW mulai muncul pada 27 hss, pada media $\frac{1}{2}$ MS muncul pada 21 hss, pada media VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ muncul pada 9 hss dan pada media $\frac{1}{2}$ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ mulai muncul pada 12 hss.

Tabel 2. Respon eksplan pada 40 hss

Perlakuan	Media asal		
	VW + BA 0,5 mg.L ⁻¹	½ MS	½ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹
G2M1	-	x	x
G2M2	-	x	x
G2M3	-	x	x
G2M4	Kalus	x	x
G3M1	Tunas	PLB	x
G3M2	-	Kalus+PLB	Tunas
G3M3	Tunas	-	x
G3M4	-	-	Tunas

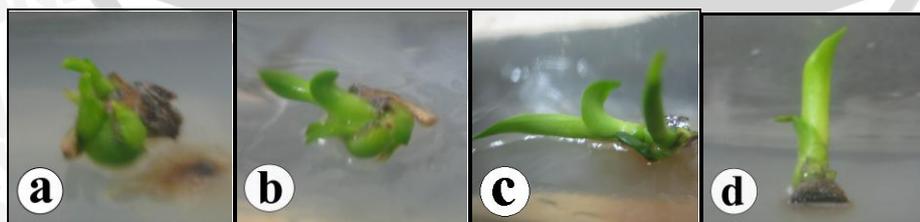
Keterangan : G2M4 = *D. pseudoconanthum* + VW;
 G2M4 = *D. pseudoconanthum* + VW + BA 1mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹;
 G2M4 = *D. pseudoconanthum* + ½ MS;
 G2M4 = *D. pseudoconanthum* + ½ MS + BA 1mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹;
 G3M1 = *D. strebloceras* + VW;
 G3M2 = *D. strebloceras* + VW + BA 1mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹;
 G3M3 = *D. strebloceras* + ½ MS;
 G3M4 = *D. strebloceras* + ½ MS + BA 1mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹;
 - = tidak muncul kalus, PLB, atau tunas;
 x = tidak ada eksplan;



Gambar 4. Kalus dan PLB saat 40 hss; (a) kalus *D. pseudoconanthum* + ½ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹; dan (b) PLB *D. strebloceras* + VW



Gambar 5. Kombinasi kalus (tanda lingkaran merah) dan PLB (tanda lingkaran hitam) *D. strebloceras* + VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹; (a) kalus dan (b) PLB dilihat dari sisi yang berbeda



Gambar 6. Tunas pada kombinasi *D. strebloceras* dengan media (a) VW; (b) ½ MS; (c) VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹; (d) ½ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹

4.1.3 Percobaan 2 tahap I: Induksi kalus dari eksplan PLB

Percobaan 2 tahap I ini bertujuan untuk menginduksi kalus dari eksplan PLB yang dikulturkan pada kondisi gelap selama 40 hari. Parameter yang diamati ialah waktu inisiasi kalus, persentase eksplan yang membentuk kalus dan warna kalus yang terbentuk. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa eksplan yang dapat membentuk kalus hanya *D. spectabile* yang ditanam pada media VW dan media $\frac{1}{2}$ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹.

Tabel 3. Rerata perkembangan kalus pada 40 hsi

Perlakuan	Saat Inisiasi Kalus (hsi)	Persentase Eksplan Membentuk Kalus (%)
<i>D. spectabile</i> + VW	0,90	2,22 a
<i>D. spectabile</i> + VW + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	0,00 a
<i>D. spectabile</i> + $\frac{1}{2}$ MS	-	0,00 a
<i>D. spectabile</i> + $\frac{1}{2}$ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹	2,10	10,00 b
<i>D. ascipilanense</i> + VW	-	0,00 a
<i>D. ascipilanense</i> + VW + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	0,00 a
<i>D. ascipilanense</i> + $\frac{1}{2}$ MS	-	0,00 a
<i>D. ascipilanense</i> + $\frac{1}{2}$ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	0,00 a

**

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji BNT 5%;

Data yang dianalisis merupakan data hasil transformasi $\sqrt{x+0,5}$;

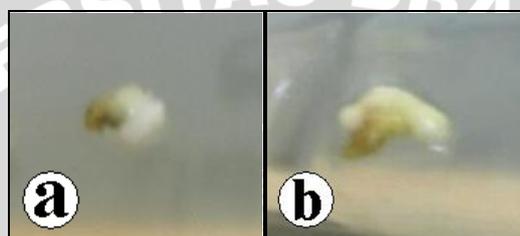
** = sangat nyata

Rerata saat inisiasi kalus yang rendah mengindikasikan bahwa eksplan dapat membentuk kalus dengan sangat cepat. Akan tetapi, kenyataannya kalus mulai muncul sekitar tiga minggu setelah inokulasi. Sebelum muncul kalus, eksplan mengalami pembengkakan atau penambahan ukuran dari ukuran semula mulai 6 hsi sampai 15 hsi. Kemudian muncul kalus berupa tonjolan-tonjolan kecil di permukaan eksplan pada 18 hsi sampai 23 hsi.

Rendahnya rerata saat inisiasi kalus disebabkan oleh persentase eksplan yang rendah dalam membentuk kalus. Eksplan yang dapat membentuk kalus sangat sedikit, tidak lebih dari 10%. Berdasarkan hasil analisis ragam diketahui bahwa terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan. Kombinasi *D. spectabile*

dengan media $\frac{1}{2}$ MS + BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ menunjukkan persentase pembentukan kalus yang paling tinggi.

Pada awalnya, eksplan PLB yang diinokulasi berwarna hijau muda, namun saat 3 hsi warnanya mulai berubah menjadi lebih pucat, bahkan pada 4 hsi terdapat eksplan yang berubah warna menjadi putih. Kalus yang terbentuk pada tahap ini juga berwarna pucat, yaitu putih kekuningan atau yellowish white, seperti tampak pada gambar 7. Kalus *D. spectabile* yang terbentuk pada media VW berwarna putih kekuningan dengan kode 155D sedangkan kalus pada media $\frac{1}{2}$ MS + BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ berwarna putih kekuningan dengan kode 158C.



Gambar 7. Kalus *D. spectabile* saat 40 hsi yang terbentuk pada media (a) VW dan (b) $\frac{1}{2}$ MS + BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$

Tujuan percobaan 1 tahap I ini ialah untuk menginduksi kalus dari eksplan PLB. Akan tetapi, eksplan ternyata tidak hanya membentuk kalus tetapi juga membentuk PLB dan tunas. Data rerata perkembangan eksplan membentuk PLB dan tunas disajikan dalam tabel 5.

PLB terbentuk pada eksplan *D. spectabile* yang diinokulasikan di media VW dan $\frac{1}{2}$ MS. Inisiasi PLB mulai terlihat pada 12 hsi sampai 35 hsi. PLB yang terbentuk berwarna putih dan putih kekuningan seperti tampak pada gambar 8. Analisis ragam menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan pada persentase eksplan membentuk PLB, dimana kombinasi perlakuan *D. spectabile* dengan media VW memiliki persentase tertinggi dibandingkan dengan kombinasi perlakuan yang lain. Kombinasi ini juga menghasilkan jumlah PLB per eksplan paling banyak, walaupun jumlah PLB per eksplan tidak dipengaruhi oleh perlakuan.

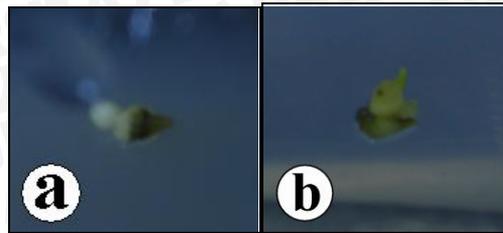
Tabel 4. Rerata perkembangan PLB dan tunas pada 40 hsi

Perlakuan	Saat Inisiasi (hsi)		Persentase Pembentukan (%)		Jumlah per Eksplan	
	PLB	Tunas	PLB	Tunas	PLB	Tunas
<i>D. spectabile</i> + VW	1,61	-	10,00 c	0,00	0,26	0,00
<i>D. spectabile</i> + VW + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	1,02	0,00 a	4,44	0,00	0,04
<i>D. spectabile</i> + ½ MS	1,30	0,90	4,44 b	4,44	0,07	0,07
<i>D. spectabile</i> + ½ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	0,26	0,00 a	1,11	0,00	0,01
<i>D. ascipilanense</i> + VW	-	-	0,00 a	0,00	0,00	0,00
<i>D. ascipilanense</i> + VW + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	-	0,00 a	0,00	0,00	0,00
<i>D. ascipilanense</i> + ½ MS	-	-	0,00 a	0,00	0,00	0,00
<i>D. ascipilanense</i> + ½ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	-	0,00 a	0,00	0,00	0,00
			**	tn	tn	tn

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji BNT 5%;

Data yang dianalisis merupakan data hasil transformasi $\sqrt{x+0,5}$;

** = sangat nyata; tn = tidak berpengaruh nyata



Gambar 8. PLB *D. spectabile* saat 40 hsi pada media (a) VW dan (b) $\frac{1}{2}$ MS

Tunas terbentuk pada kombinasi *D. spectabile* dengan media VW + BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, media $\frac{1}{2}$ MS dan media $\frac{1}{2}$ MS + BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Tunas yang terbentuk berwarna putih (gambar 9). Pembentukan tunas sangat rendah, tidak sampai 5%. Dari hasil analisis ragam, diketahui bahwa perlakuan kombinasi spesies dengan media tidak berbeda nyata pada jumlah tunas per eksplan dan persentase eksplan membentuk tunas.



Gambar 9. Tunas *D. spectabile* pada media (a) VW + BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, (b) $\frac{1}{2}$ MS dan (c) $\frac{1}{2}$ MS + BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$

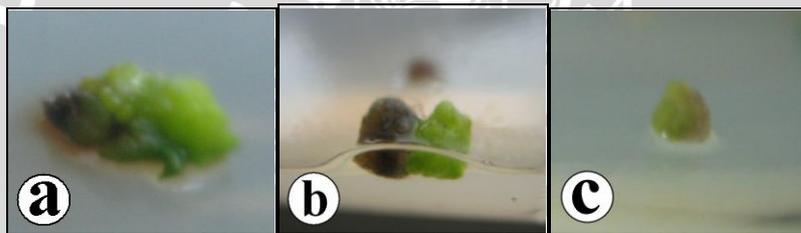
4.1.4 Percobaan 2 tahap II : Induksi PLB dan tunas dari eksplan PLB

Tahap kedua ini merupakan kelanjutan dari tahap pertama. Pada tahap II, digunakan eksplan yang berasal dari tahap I. Eksplan dikulturkan pada media yang berkesesuaian dengan media pada tahap I. Eksplan yang sebelumnya ditanam pada media tanpa tambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) dikulturkan kembali pada media tanpa ZPT dan eksplan yang sebelumnya ditanam pada media dengan tambahan ZPT dikulturkan kembali pada media dengan ZPT. Jenis ZPT yang digunakan sama, yaitu BA, hanya saja konsentrasinya lebih tinggi, yaitu sebesar 2 mg.L^{-1} BA. Eksplan dikulturkan pada kondisi terang selama 40 hari.

Pada tahap II ini diharapkan dapat menginduksi pembentukan PLB dan tunas. Parameter yang diamati ialah saat inisiasi PLB dan tunas, persentase pembentukan PLB dan tunas, serta jumlah PLB dan tunas per eksplan. Dari hasil pengamatan, eksplan tidak hanya membentuk PLB dan tunas saja, tetapi juga

kalus, kombinasi kalus dan PLB, serta kombinasi PLB dan tunas. Perkembangan eksplan pada tahap II dapat dilihat pada tabel 7.

Dari hasil pengamatan masih ditemukan adanya kalus dalam jumlah yang sangat sedikit. Kalus terdapat pada eksplan *D. spectabile* yang ditanam pada media VW, $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 mg.L^{-1} . Pada persentase eksplan yang membentuk kalus pada 40 hss terdapat perbedaan yang nyata antar kombinasi spesies dengan media, di mana kombinasi *D. spectabile* pada media VW mempunyai presentase pembentukan kalus paling tinggi walaupun tidak berbeda nyata dengan media $\frac{1}{2}$ MS. Kalus yang muncul pada tahap ini berwarna hijau kekuningan. Kalus *D. spectabile* pada media VW berwarna hijau kekuningan muda atau light yellowish green (145B), pada media $\frac{1}{2}$ MS berwarna hijau kekuningan tua atau strong yellowish green (145A) dan pada media $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 mg.L^{-1} berwarna hijau kekuningan cerah atau vivid yellowish green (154A).



Gambar 10. Kalus *D. spectabile* saat 40 hss pada media (a) VW, (b) $\frac{1}{2}$ MS dan (c) $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 mg.L^{-1}

Perlakuan kombinasi spesies dengan media tidak berbeda nyata pada persentase eksplan membentuk PLB dan jumlah PLB per eksplan. Pembentukan PLB dapat dikatakan lebih baik dibanding tahap pertama, selain jumlah PLB per eksplan bertambah, PLB yang terbentuk pun memiliki warna yang lebih cerah dibanding pada tahap sebelumnya (gambar 11). PLB terbentuk pada kombinasi *D. spectabile* dengan media VW, $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 mg.L^{-1} .



Gambar 11. PLB *D. spectabile* saat 40 hss pada media (a) VW, (b) $\frac{1}{2}$ MS dan (c) $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 mg.L^{-1}

Tabel 5. Rerata perkembangan eksplan pada 40 hss

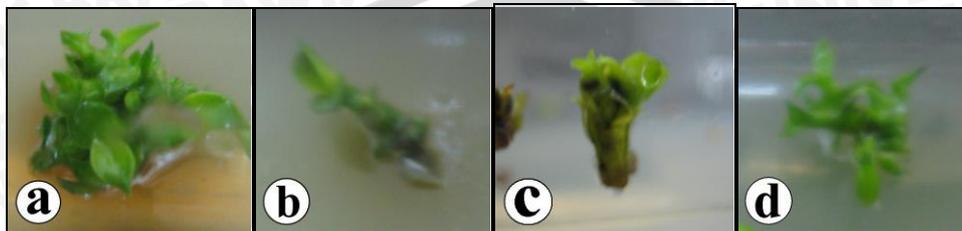
Perlakuan	Saat Inisiasi (hsi)		Persentase Pembentukan (%)				Jumlah per Eksplan		
	PLB	Tunas	Kalus	PLB	Tunas	Kalus&PLB	PLB&Tunas	PLB	Tunas
<i>D. spectabile</i> + VW	1,61	-	4,44 c	3,33	3,33	2,22 b	3,33	0,26	0,38
<i>D. spectabile</i> + VW + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	1,02	0,00 a	0,00	3,33	0,00 a	1,11	0,03	0,07
<i>D. spectabile</i> + ½ MS	1,30	0,90	2,22 bc	5,56	1,11	0,00 a	4,44	0,40	0,11
<i>D. spectabile</i> + ½ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	0,26	1,11 ab	4,44	3,33	7,78 c	2,22	0,47	0,47
<i>D. ascipilanense</i> + VW	-	-	0,00 a	0,00	0,00	0,00 a	0,00	0,00	0,00
<i>D. ascipilanense</i> + VW + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	-	0,00 a	0,00	0,00	0,00 a	0,00	0,00	0,00
<i>D. ascipilanense</i> + ½ MS	-	-	0,00 a	0,00	0,00	0,00 a	0,00	0,00	0,00
<i>D. ascipilanense</i> + ½ MS + BA 0,5 mg.L ⁻¹	-	-	0,00 a	0,00	0,00	0,00 a	0,00	0,00	0,00
			**	tn	tn	**	tn	tn	tn

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji BNT 5%;

Data yang dianalisis merupakan data hasil transformasi $\sqrt{x+0,5}$;

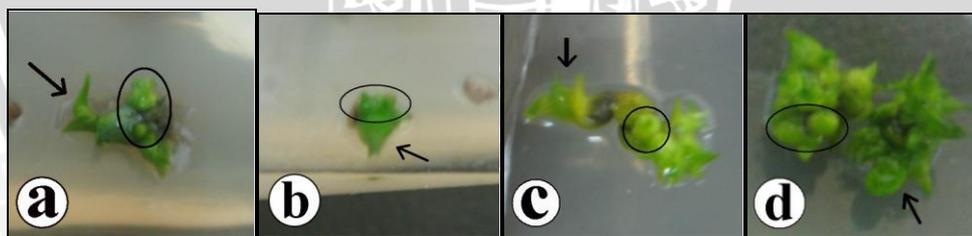
** = sangat nyata; tn = tidak berpengaruh nyata

Pembentukan tunas terjadi pada kombinasi *D. spectabile* dengan semua media. Tunas yang terbentuk pada tahap ini semakin banyak, jumlah tunas per eksplan jauh lebih banyak dibanding dengan tahap pertama, yaitu mencapai tujuh kali lipat. Tunas yang terbentuk terlihat segar dan warna tunas yang tadinya putih berubah menjadi hijau (gambar 12).

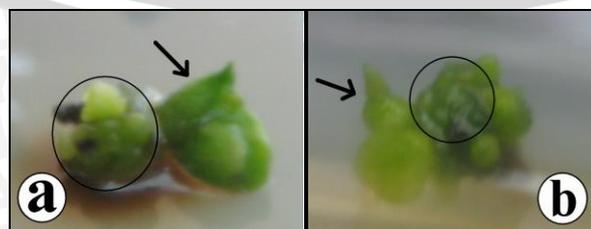


Gambar 12. Tunas *D. spectabile* saat 40 hss pada media (a) VW, (b) VW + BA 2 mg.L⁻¹, (c) ½ MS dan (d) ½ MS + BA 2 mg.L⁻¹

Selain membentuk kalus, PLB dan tunas, eksplan juga membentuk kombinasi PLB dan tunas (gambar 13) serta kombinasi kalus dan PLB (gambar 14). Kombinasi PLB dan tunas terbentuk pada kombinasi *D. spectabile* dengan semua media. Persentase pembentukan kombinasi ini tidak dipengaruhi oleh perlakuan. Kombinasi kalus dan PLB terbentuk pada kombinasi *D. spectabile* dengan media VW dan ½ MS + BA 2 mg.L⁻¹. Persentase pembentukannya dipengaruhi oleh perlakuan kombinasi spesies dengan media, dimana persentase tertinggi terdapat pada *D. spectabile* pada media ½ MS + BA 2 mg.L⁻¹.



Gambar 13. Kombinasi PLB (tanda lingkaran) dan tunas (tanda panah) *D. spectabile* pada media (a) VW, (b) VW + BA 2 mg.L⁻¹, (c) ½ MS dan (d) ½ MS + BA 2 mg.L⁻¹



Gambar 14. Kombinasi kalus (tanda lingkaran) dan PLB (tanda panah) *D. spectabile* pada media (a) VW dan (b) ½ MS + BA 2 mg.L⁻¹

4.2 Pembahasan

4.2.1 Percobaan 1 tahap I : Induksi mata tunas dari eksplan tunas

Pada percobaan 1, digunakan eksplan tunas untuk menginduksi mata tunas. Kemudian mata tunas ini dipotong-potong dan dikulturkan kembali untuk menginduksi kalus. Pada tahap awal, tidak semua mata tunas dapat tumbuh dan berkembang. Sebagian eksplan mengalami perubahan warna dari hijau pada awal inokulasi, menjadi berwarna kuning atau coklat dan akhirnya menjadi putih atau coklat kehitaman. Eksplan yang demikian dapat dikatakan mengalami mati fisiologis (Rosita *et al.*, 2008). Eksplan yang mengalami mati fisiologis menjadi salah satu permasalahan yang menghambat keberhasilan kultur jaringan. Eksplan yang mati fisiologis diawali dengan perubahan warna menjadi coklat (*browning*). *Browning* merupakan suatu karakter munculnya warna coklat atau hitam yang seringkali membuat pertumbuhan dan perkembangan eksplan terhambat dan mengakibatkan kematian pada jaringan.

Perubahan warna juga terjadi pada eksplan batang dan tunas mawar yang ditanam pada media MS, yang berubah dari hijau menjadi coklat (Marlina, 2004). Menurut Rosita *et al.* (2008), perubahan warna menjadi coklat disebabkan oleh dua faktor, yaitu eksplan yang mengeluarkan senyawa fenol atau faktor teknis saat penanaman, yaitu scalpel dan pinset yang masih panas. Sedangkan menurut Santoso dan Nursandi (2004), mati fisiologis dapat disebabkan oleh bahan tanaman yang tidak meristematik atau jaringan dewasa, tindakan sterilisasi yang berlebihan, media yang tidak cocok atau lingkungan yang tidak mendukung.

Peran zat pengatur tumbuh eksogen juga menentukan terjadinya perubahan warna menjadi coklat pada eksplan. Auksin diketahui dapat menghambat sintesis polifenol sehingga dapat mengurangi pencoklatan eksplan, sedangkan sitokinin dapat memacu pencoklatan eksplan (Mayerni, 2005). Pada tahap pertama hanya diberikan sitokinin tanpa adanya masukan auksin, sehingga diduga pencoklatan terjadi karena tidak seimbang zat pengatur tumbuh di dalam tanaman dan rangsangan yang disebabkan oleh sitokinin.

Selain itu, sebagian eksplan tidak tumbuh tunas karena terkontaminasi. Teknik sterilisasi yang digunakan belum mampu menghindari kontaminasi sampai 100%. Pada percobaan 1 tahap I ini persentase eksplan yang mati karena

kontaminasi mencapai 36,8%. Kontaminasi disebabkan oleh jamur dan bakteri yang berasal dari eksplan. Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri diawali dengan munculnya lendir bening kekuningan dari pinggiran eksplan dan kemudian menyebar ke seluruh media. Kontaminasi oleh jamur juga muncul dari eksplan dan akhirnya miselium jamur yang berwarna putih memenuhi media kultur. Jamur dan bakteri ini diduga berasal dari dalam jaringan tanaman karena tanaman induk yang digunakan sebagai eksplan ialah anggrek spesies yang kemungkinan besar berasal dari alam liar sehingga kontaminan tidak mati walaupun sudah dilakukan sterilisasi permukaan menggunakan Clorox dan Teepol. Menurut Zulkarnain (2009), dari semua sumber kontaminasi, yang paling sulit diatasi ialah yang berasal dari eksplan. Metode sterilisasi yang paling tepat hanya dapat diperoleh dari berbagai uji coba.

Pada percobaan 1 tahap I ini, spesies yang mampu memberikan respon yang baik hanya *D. pseudoconanthum* dan *D. strebloceras*. Dimana pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang paling baik ialah *D. strebloceras*, baik pada tahap pertama maupun tahap kedua. Perbedaan tersebut memberikan gambaran bahwa masing-masing spesies yang diuji memiliki variasi karakter genotipe. Variasi genotipe tersebut akan mempengaruhi kandungan hormon endogen sehingga respon terhadap perlakuan media akan bervariasi pula. Hal ini sesuai dengan pendapat Gahan dan George (2008) yang menyatakan bahwa setiap genotipe tanaman akan memberikan tanggapan pertumbuhan in vitro yang berbeda. Perbedaan pengaruh genetik ini disebabkan karena perbedaan kontrol genetik dari masing-masing spesies (Anonim, 2008). Selain itu spesies-spesies yang digunakan diprediksi memiliki kecepatan tumbuh yang berbeda. Berbagai jenis *Dendrobium*, baik spesies maupun hibrida, memiliki kecepatan tumbuh yang berbeda-beda pada kultur in vitro (Arditti dan Ernst, 1992). *Dendrobium* sp. dengan pertumbuhan yang cepat misalnya *D. superbiens* 'Superba' dan *D. aduncum*, sedangkan *Dendrobium* sp. yang memiliki pertumbuhan yang lambat misalnya *D. antennatum* dan *D. lacinosum* (Arditti dan Ernst, 1992).

Pada akhir pengamatan tahap I, hanya eksplan pada media VW + BA 0,5 mg.L⁻¹, media ½ MS, dan media ½ MS + BA 0,5 mg.L⁻¹ yang menunjukkan respon yang cukup baik. Kandungan BA (sitokinin) yang ditambahkan dalam

media berfungsi untuk menginduksi tunas. Hasil penelitian Susanto *et al.* (1995) menunjukkan bahwa media $\frac{1}{2}$ MS + BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ dapat menginisiasi tunas paling cepat dan menghasilkan jumlah tunas terbanyak. Pada Phalaenopsis digunakan tambahan BA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ pada media VW untuk menginduksi mata tunas dari tangkai bunga (Piluek dan Bunchai, 2006). Penambahan BAP $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ pada media WMP dapat memacu terbentuknya tunas pada nodus dari eksplan batang belimbing (Supriati *et al.*, 2006). Akan tetapi konsentrasi BA yang digunakan belum mampu menginduksi mata tunas pada spesies yang lain. Seringkali spesies yang berbeda membutuhkan konsentrasi ZPT yang berbeda, jenis ZPT yang berbeda atau bahkan media yang berbeda dan khusus (Gahan dan George, 2008). Selain itu, beberapa ZPT umumnya ditambahkan secara bersamaan (kombinasi beberapa jenis ZPT) karena morfogenesis dari eksplan selalu tergantung dari interaksi antara auksin dan sitokinin yang seimbang seperti yang dikemukakan oleh Wattimena (1988). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pucuk anggrek *Dendrobium* cv. Samarai dapat terinduksi dan mengalami multiplikasi pada medium MS yang diberi penambahan NAA dan BAP (Supriyatna, 2009). Sedangkan *D. microbulbon* membutuhkan tambahan IAA $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ + BAP 20 mg.L^{-1} untuk menginduksi mata tunas (Sharma *et al.*, 2007).

Media $\frac{1}{2}$ MS tanpa tambahan BA dapat menginduksi mata tunas dikarenakan kandungan sitokinin endogen dalam eksplan tersebut kemungkinan sudah cukup untuk menginduksi mata tunas. Hal ini juga ditunjang dengan adanya kandungan amonium dan nitrat yang tinggi pada media $\frac{1}{2}$ MS jika dibandingkan dengan media VW (Aktor *et al.*, 2008; Fauzi, 2010; Supriati *et al.*, 2006). Hasil penelitian Hyndman *et al.* (1982) menunjukkan bahwa amonium dapat meningkatkan biosintesis sitokinin alami yang berperan dalam menstimulasi pertunasan (Supriati *et al.*, 2006). Sedangkan hasil penelitian Gaffney *et al.* (1982) menunjukkan bahwa nitrat merupakan sumber nitrogen yang baik bagi pertumbuhan (Widiastoety *et al.*, 1997). Nitrogen mempengaruhi proses pematangan dormansi tunas (Anonim, 1998). Nitrogen juga merupakan komponen protein, asam nukleat dan substansi lainnya yang diperlukan untuk pembentukan protoplasma dan berfungsi memperbaiki pertumbuhan vegetatif (Widiastoety dan Kartikaningrum, 2003). Hal ini sesuai dengan penelitian Fauzi (2010) yang

menunjukkan bahwa media MS dan ½ MS tanpa tambahan sitokinin (BAP) sudah mampu menginduksi munculnya tunas dari mata tunas batang buku singkong.

4.2.2 Percobaan 1 tahap II: Induksi kalus dari eksplan tunas

Pada tahap kedua juga terdapat eksplan yang mengalami perubahan warna menjadi kecokelatan sehingga pertumbuhan dan perkembangan eksplan terhambat. Sitokinin diketahui dapat memacu pencoklatan eksplan, sedangkan auksin dapat menghambat sintesis polifenol sehingga dapat mengurangi pencoklatan eksplan (Mayerni, 2005). Senyawa auksin (NAA) sebesar 0,1 mg.L⁻¹ yang ditambahkan pada tahap ini sepertinya belum mampu mencegah perubahan warna menjadi coklat pada eksplan.

Kultur tahap kedua awalnya bertujuan untuk menginduksi kalus. Penelitian Meesawat dan Kanchanapoom (2002) menunjukkan bahwa induksi kalus *Dendrobium crumenatum* sangat baik dengan adanya penambahan BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ pada media VW. Akan tetapi, hasil tahap kedua ini menunjukkan respon eksplan yang berbeda-beda. Selain membentuk kalus, terdapat eksplan yang membentuk PLB, tunas serta kombinasi kalus dan PLB.

Kalus terbentuk pada ½ MS + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹, sedangkan kombinasi kalus dan PLB terbentuk pada VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, dimana kalus dapat diinduksi dengan penambahan BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ pada media VW (Meesawat dan Kanchanapoom, 2002) dan juga pada media ½ MS (Zhao *et al.*, 2008). Media VW + BA 1 mg.L⁻¹ + NAA 0,1 mg.L⁻¹ juga diketahui dapat menginduksi PLB (Meesawat dan Kanchanapoom, 2002). Kalus muncul pada 22 dan 25 hss. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Setiti *et al.* (1996) dimana kalus mulai nampak pada minggu III.

PLB terbentuk pada media VW tanpa tambahan BA dan NAA. Hal ini mungkin dikarenakan adanya kandungan auksin dan juga sitokinin di dalam air kelapa yang ditambahkan pada media VW (Arditti dan Ernst, 1992; Widiastoety *et al.*, 1997). Beberapa hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa media tanpa tambahan ZPT juga dapat menginduksi PLB (Begum *et al.*, 1994; Meesawat dan Kanchanapoom, 2002; Zhao *et al.*, 2008). PLB muncul pada 27 dan 29 hsi.

Hasil ini sedikit lebih lambat dibanding pembentukan PLB pada *Cymbidium*, dimana PLB sudah terbentuk pada 21 hsi (Begum *et al.*, 1994), akan tetapi jauh lebih cepat dibandingkan saat inisiasi PLB tercepat pada *Phalaenopsis amabilis* (L.)Bl., yaitu 94,67 hari (Handoyo, 2008).

Tunas dapat diinduksi pada semua jenis media. Pada media dengan tambahan ZPT, konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi dibanding dengan auksin mendorong terbentuknya tunas (Abidin, 1993; Widiastoety *et al.*, 1997). Peran fisiologis dari sitokinin adalah mendorong pembelahan sel, pembentukan morfogenesis tanaman, pembentukan tunas serta menghambat senescence dan absisi (Wattimena, 1988; Gunawan, 1988). Sedangkan auksin berperan dalam menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein serta meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel sehingga membantu dalam proses penyerapan nutrisi yang berada dalam media kultur *in vitro* (Abidin, 1993).

Pada media tanpa tambahan ZPT, tunas dapat tumbuh dikarenakan adanya kandungan air kelapa pada media VW. Air kelapa mengandung berbagai unsur hara, asam amino, enzim, asam organik, vitamin, gula dan juga hormon tumbuhan (Arditti dan Ernst, 1992). Menurut Hendaryono (2000), dalam air kelapa terkandung dhipenil urea yang mempunyai aktivitas menyerupai sitokinin. Wardiyati *et al.*, (1993) menambahkan bahwa air kelapa mengandung sitokinin, yaitu zeatin, zeatin glikosida dan zeatin ribosid, di mana zeatin sangat berperan dalam pertumbuhan tunas. Selain itu, penggunaan media VW dengan tambahan sitokinin (BA) pada tahap sebelumnya mungkin memberikan pengaruh lanjutan (Sharma *et al.*, 2007). Hasil beberapa penelitian anggrek menunjukkan bahwa media tanpa ZPT dapat menginduksi tunas (Begum *et.al.*, 1994; Khosravi *et al.*, 2008; Meesawat dan Kanchanapoom, 2002; Zhao *et al.*, 2008).

Tunas pada media dengan ZPT muncul lebih awal dibanding dengan tunas pada media tanpa ZPT. Hal ini diduga karena media dengan ZPT mendapat tambahan sitokinin (BA) yang cukup tinggi. Menurut Hoesen (1998), inisiasi tunas terjadi lebih awal terutama pada kultur yang diberi tambahan sitokinin.

Selain itu, semakin tinggi konsentrasi sitokinin yang diberikan akan mempercepat terbentuknya tunas (Marlin, 2005).

Adanya perbedaan respon eksplan pada tiap media kemungkinan juga disebabkan oleh interaksi genotip dengan kedua media (media tahap I dan II) dan juga interaksi antara media tahap I dan II. Hasil penelitian Khanna dan Raina (1998) menunjukkan bahwa persentase regenerasi dan frekuensi induksi tunas dipengaruhi secara nyata oleh genotip, media induksi kalus, media regenerasi, interaksi genotip dan dua media (media tahap pertama dan media tahap kedua) dan juga interaksi antara media tahap pertama dan media tahap kedua. Menurut Gunawan (1988), interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen akan menentukan arah perkembangan suatu kultur. Penambahan auksin atau sitokinin dari luar (eksogen) akan mengubah kadar auksin dan sitokinin di dalam sel (endogen).

4.2.3 Percobaan 2 tahap I: Induksi kalus dari eksplan PLB

Tujuan percobaan 2 tahap pertama ialah untuk menginduksi kalus di ruang kultur yang gelap (tanpa cahaya). Kalus ialah sekelompok sel yang berproliferasi dan tidak terorganisir, berkembang dan memperbanyak diri secara terus-menerus. Kalus yang terbentuk ditandai dengan pembesaran eksplan dari ukuran semula. Hal ini terjadi akibat proses penyerapan air dan hara ke dalam sel. Menurut Santoso dan Nursandi (2004), terjadinya kalus disebabkan karena sel-sel yang kontak dengan media terdorong menjadi meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka.

Metode induksi kalus pada ruang gelap telah banyak digunakan, seperti pada eksplan asparagus (Simatupang, 1995; Simatupang, 1996), kentang (Zulkarnain *et al.*, 2005), ubi kayu (Priyadi dan Sudarmonowati, 2006), padi (Lestari dan Yunita, 2008; Mariani *et al.*, 2002), kakao (Winarsih *et al.*, 2003), Phalaenopsis (Ishii *et al.*, 1998; Rianawati, 2009), Epidendrum (Hossain, 2008), beberapa spesies *Ophrys* (Kitsaki *et al.*, 2004) dan *Dendrobium candidum* (Zhao *et al.*, 2008). Menurut George dan Sherrington (1984), inisiasi pembelahan sel pada eksplan dan pertumbuhan jaringan kalus kadang-kadang mengalami

hambatan dengan adanya cahaya. Ditambahkan pula oleh Hendaryono dan Wijayani (1994) bahwa pembentukan kalus maksimum sering terjadi di tempat yang lebih gelap. Pentingnya periode gelap pada masa inisiasi kultur diperkirakan sebagai manifestasi dari cara kerja zat pengatur tumbuh, terutama auksin, yang aktif dalam keadaan tanpa cahaya (Salisbury dan Ross, 1992).

Selain itu, dalam keadaan tanpa cahaya, aktivitas senyawa fenol yang dikeluarkan oleh permukaan jaringan yang luka mengalami hambatan, sehingga mengurangi atau bahkan mengeliminir pengaruh meracuni. Dengan demikian, inkubasi kultur dalam keadaan gelap pada tahap inisiasi akan memberikan kesempatan kepada jaringan untuk tumbuh dan berkembang secara lebih baik (Zulkarnain *et al.*, 2005). Pencegahan browning dengan metode penggelapan juga dilakukan oleh Bustamam *et al.* (2004).

Hasil pengamatan tahap I menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi spesies dengan media berpengaruh nyata pada persentase pembentukan kalus. Kalus hanya terbentuk pada *D. spectabile*, sedangkan pada *D. ascipilanense* tidak terbentuk kalus. Menurut Damayanti *et al.* (2007), setiap genotipe tanaman memiliki respon pertumbuhan yang berbeda meskipun ditumbuhkan pada media kultur yang sama. Genotipe diketahui berpengaruh nyata pada persentase pembentukan kalus dan bobot basah kalus dari eksplan batang muda tanaman lili (Damayanti *et al.*, 2005) dan dari eksplan daun nilam (Kurniawan, 2007).

Analisis ragam tidak dapat dilakukan pada saat inisiasi kalus karena kalus tidak muncul di semua perlakuan sampai akhir pengamatan tahap I. Kalus muncul paling cepat pada kombinasi perlakuan *D. spectabile* yang dikulturkan pada media VW. Rerata saat inisiasi kalus yang rendah seharusnya mengindikasikan bahwa eksplan dapat membentuk kalus dengan sangat cepat, akan tetapi rerata saat inisiasi kalus yang rendah dikarenakan jumlah eksplan yang membentuk kalus sangat sedikit. Kalus sebenarnya baru muncul sekitar tiga minggu setelah inokulasi, yaitu pada 18 - 23 hsi. Penambahan 0,5 BA mg.L⁻¹ pada New Phalaenopsis Medium (NPM) dapat membentuk kalus *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. paling cepat dengan rerata lama waktu inisiasi 22,5 hari (Handoyo, 2008). Media MS tanpa tambahan ZPT juga mampu menginduksi kalus melon pada minggu III (Setiti *et al.*, 1996).

Persentase pembentukan PLB dipengaruhi secara nyata oleh kombinasi spesies dengan media, di mana persentase pembentukan PLB tertinggi terdapat pada kombinasi perlakuan *D. spectabile* yang dikulturkan pada media VW dengan persentase PLB yang terbentuk sebesar 10%. PLB terbentuk paling cepat pada kombinasi perlakuan *D. spectabile* yang dikulturkan pada media ½ MS. PLB muncul pada 12-35 hsi. Hasil ini lebih lambat dibandingkan saat inisiasi PLB *Cymbidium* dimana PLB muncul pada minggu II setelah inokulasi di media MS + 0,5 mg.L⁻¹ dan muncul pada minggu III di media MS tanpa tambahan ZPT (Begum *et al.*, 1994). Akan tetapi, hasil ini jauh lebih cepat dibanding *Phalaenopsis amabilis* (L.)Bl. dimana PLB terbentuk paling cepat pada media NPM + 0,5 BA mg.L⁻¹ dengan rerata lama waktu pembentukan PLB selama 94,67 hari (Handoyo, 2008).

Kombinasi spesies dengan media tidak berpengaruh nyata pada jumlah PLB per eksplan. Winarsih *et al.* (2003) menyatakan bahwa tidak adanya pengaruh zat pengatur tumbuh, klon dan interaksi antara zat pengatur tumbuh dengan klon yang diuji mungkin disebabkan karena rata-rata jumlah eksplan menghasilkan embrio pada setiap klon relatif rendah.

Selain membentuk kalus dan PLB, pada tahap ini juga terdapat eksplan yang langsung membentuk tunas tanpa didahului pembentukan kalus. Proses pembentukan organ (tunas) tanpa melalui pertumbuhan kalus disebut organogenesis langsung (Gahan dan George, 2008). Organogenesis tunas langsung dari eksplan juga terjadi pada *D. crumenatum* (Meesawat dan Kanchanapoom, 2002), *D. candidum* (Zhao *et al.*, 2007), *Acampe praemorsa* (Nayak *et al.*, 1997) dan nilam (Kurniawan, 2007). Proses ini dapat terjadi terutama karena adanya kandungan sitokinin pada media yang penting untuk menginduksi mata tunas dari eksplan (Nayak *et al.*, 1997).

Hasil analisis ragam menunjukkan kombinasi spesies dengan media tidak berpengaruh nyata pada persentase pembentukan tunas dan jumlah tunas per eksplan. Dari penelitian Satria (2004) didapatkan bahwa persentase eksplan membentuk plantlet pada kentang tidak dipengaruhi oleh media, klon serta interaksi klon dengan media, sedangkan jumlah tunas dipengaruhi oleh media,

klon dan interaksi klon dengan media. Jumlah tunas lili diketahui tidak dipengaruhi oleh media dan interaksi kultivar dan media (Damayanti *et al.*, 2005).

Kalus, PLB dan tunas yang terbentuk pada tahap ini terlihat pucat dengan warna putih kekuningan. Penelitian Wijaya *et al.*(2006) pada ruang gelap juga menghasilkan protokorm berwarna putih. Hal ini terjadi karena pada ruang gelap eksplan tidak aktif membentuk klorofil (Simatupang, 1995). Ditambahkan oleh pula oleh Abidin (1993) bahwa sintesis klorofil sangat dipengaruhi oleh faktor keturunan, cahaya dan ketersediaan mineral tertentu.

4.2.4 Percobaan 2 tahap II : Induksi PLB dan tunas dari eksplan PLB

Setelah 40 hari dalam ruang gelap, eksplan disubkultur pada media induksi PLB dan tunas dengan tambahan pencahayaan. Pada percobaan tahap kedua ini, eksplan tidak hanya membentuk kalus, PLB atau tunas saja, tetapi juga membentuk kombinasi kalus dan PLB serta kombinasi PLB dan tunas. Kombinasi ini mungkin dapat terjadi karena adanya perbedaan respon sel pada satu eksplan yang sama terhadap rangsangan media yang diberikan. Sesuai dengan pendapat Utami *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa sel yang identik dapat memberikan respon yang berbeda terhadap rangsang yang sama. PLB dan kombinasi kalus dan PLB juga muncul saat tahap induksi kalus Phalaenopsis (Ishii *et al.*, 1998).

Analisis ragam menunjukkan bahwa persentase pembentukan kalus dan persentase pembentukan kombinasi kalus dan PLB dipengaruhi kombinasi spesies dengan media. Kombinasi *D. spectabile* dengan media VW menghasilkan persentase pembentukan kalus paling besar. Sedangkan persentase pembentukan kombinasi kalus dan PLB tertinggi terdapat pada *D. spectabile* dengan media $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 mg.L⁻¹. Menurut Fehr (1987), penampilan suatu karakter tanaman selain dikendalikan secara genetik, juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan interaksi genetik dengan lingkungannya. Dengan demikian karakter satu fenotipe tanaman yang ditanam di satu lingkungan belum tentu memberikan penampilan yang sama bila ditanam di lingkungan lain yang berbeda.

Perlakuan tidak berpengaruh nyata pada persentase pembentukan PLB, persentase pembentukan tunas, persentase pembentukan kombinasi kalus dan PLB,

jumlah PLB per eksplan dan jumlah tunas per eksplan. Sampai akhir pengamatan, hanya *D. spectabile* yang menunjukkan respon, sedangkan *D. ascipilanense* tidak menunjukkan respon apapun. Adanya perbedaan respon ini menunjukkan bahwa setiap genotip mempunyai kandungan hormon endogen yang berbeda sehingga memerlukan tambahan hormon eksogen yang berbeda pula dalam media kulturnya. Seperti yang dinyatakan oleh Gahan dan George (2008) bahwa kandungan zat tumbuh kemungkinan bervariasi pada genotipe yang berbeda. Spesies-spesies yang digunakan diprediksi memiliki kecepatan tumbuh yang berbeda. Berbagai jenis *Dendrobium*, baik spesies maupun hibrida, memiliki kecepatan tumbuh yang berbeda-beda pada kultur *in vitro* (Arditti dan Ernst, 1992).

Pada tahap ini, kalus, PLB dan tunas mengalami perubahan warna. Dua hari setelah subkultur sudah terlihat perubahan warna menjadi lebih cerah. Di akhir pengamatan, kalus secara umum berwarna kuning kehijauan dan ukurannya semakin besar. Sedangkan PLB dan tunas menjadi hijau terang. Adanya cahaya pada ruang kultur mempengaruhi sintesis klorofil pada eksplan (Abidin, 1993; Wijaya *et al.*, 2006).

Dari hasil pengamatan terlihat adanya embriogenesis somatik, yaitu pembentukan embrio dari sel somatik, baik secara langsung maupun tidak langsung. PLB (embrio somatik) yang langsung muncul pada eksplan tanpa adanya kalus terlebih dahulu menunjukkan terjadinya embriogenesis somatik langsung, seperti hasil penelitian Chen dan Chang (2004). Sedangkan pembentukan embrio somatik yang melalui pembentukan kalus disebut embriogenesis tidak langsung (Gahan dan George, 2008; Utami *et al.*, 2007). Sel-sel kalus yang terbentuk pada eksplan dapat berkembang menjadi PLB. PLB, baik yang berasal dari embriogenesis langsung maupun tidak langsung, kemudian dapat berkembang menjadi tunas. Pada penelitian ini, kedua jalur embriogenesis terjadi secara bersamaan, seperti pada *D. crumenatum* (Meesawat dan Kanchanapoom, 2002).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Terdapat kombinasi terbaik antara eksplan PLB anggrek *Dendrobium* sp. dengan media pada persentase pembentukan PLB tahap I, persentase pembentukan kalus tahap II, serta persentase pembentukan kalus dan PLB tahap II.
2. Kombinasi terbaik antara eksplan PLB anggrek *Dendrobium* sp. dengan media pada persentase pembentukan PLB tahap I dan persentase pembentukan kalus tahap II ialah *D. spectabile* dengan media VW, sedangkan kombinasi pada persentase pembentukan kalus tahap I dan persentase pembentukan kombinasi kalus dan PLB tahap II ialah *D. spectabile* dengan media $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 mg.L⁻¹.

5.2 Saran

1. Sebaiknya untuk kultur in vitro anggrek *D. spectabile* menggunakan media VW karena dapat membentuk kalus dan PLB lebih banyak dan juga lebih efisien dibanding media lain yang digunakan pada penelitian ini.
2. Untuk kultur in vitro *D. lineale*, *D. pseudoconantum*, *D. veratrifolium* dan *D. ascipilanense* sebaiknya digunakan BA dengan kadar yang lebih tinggi atau penggunaannya dikombinasikan dengan auksin jenis NAA.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1993. Dasar-dasar pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh. Penerbit Angkasa. Bandung
- Aktar, S., K.M. Nasiruddin, dan K. Hossain. 2008. Effects of different media and organic additives interaction on in vitro regeneration of *Dendrobium* orchid. *J. Agric. Rural. Dev.* 6 (1&6): 69-74
- Anonim^a. 1980. Anggrek Indonesia. PN Balai Pustaka. Jakarta
- Anonim^b. 1980. Jenis-jenis Anggrek. PN Balai Pustaka. Jakarta
- Anonim. 1998. Media dalam kultur jaringan. *Media Perkebunan* (22-23): 51-53
- Anonim. 2005. Anggrek *Dendrobium*. Trubus Swadaya. Jakarta. p 218
- Anonim. 2008. Faktor-faktor yang berpengaruh pada keberhasilan mikropropagasi. <http://e-learning.unram.ac.id/KulJar/BAB%20VI%20Mikropropagasi/VI4%20Contoh%20Teknik%20Perbanyak%20Tanaman%20Hortikultura.htm>
- Arditti, J. and R. Ernst. 1992. Micropropagation of Orchids. John Wiley and Sons, Inc. New York
- Begum, A.A., M. Tamaki and S. Kako. 1994. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through in vitro culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63 (3): 663-673
- Bustamam, T., N. Rozen dan W. Kurniawan. 2004. Pengaruh konsentrasi NAA dan BAP terhadap kultur embrio pinang sirih (*Areca catechu* L.) secara in vitro. *Stigma XII* (2): 209-212
- Chen, J.T and Chang W.C. 2004. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *Formosa* Shimadzu. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 290-293
- Damayanti, F., Murdaningsih H.K., T. Herawati, dan J. S. Darsa. 2005. Tanggap eksplan batang tiga kultivar Lili terhadap kombinasi BA dengan beberapa taraf 2,4-D pada medium MS. *Zuriat* 16 (1): 60-66
- Damayanti, D., Sudarsono, I. Mariska dan Herman. 2007. Regenerasi pepaya melalui kultur in vitro. *J. AgroBiogen* 3 (2): 49-54
- Fauzi, A.R. 2010. Induksi Multiplikasi Tunas Ubi Kayu (*Mannihot esculenta* Crantz.) Var. Adira 2 Secara *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor

- Gahan, P.B. and E.F. George, 2008. Adventitious regeneration. In George, E.F, M.A. Hall and G. de Klerk (*eds.*). Plant propagation by tissue culture 3rd edition vol.1. Springer. Netherlands
- George, E.F and Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegenics Limited. England
- Gunawan, L.W. 1990. Teknik kultur jaringan tumbuhan. Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Pusat Antar Universitas (PAU). Institut Pertanian Bogor. Bogor. p 304
- Gomez, K.A dan A.A. Gomez. 1995. Prosedur statistik untuk penelitian pertanian. UI Press. Jakarta
- Handoyo, C. 2008. Struktur dan perkembangan embrio somatik dari kalus eksplan segmen pangkal daun anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. melalui perlakuan NAA dan BA. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Airlangga. Surabaya
- Harsanti, L., Hanibal, dan Mugiono. 2003. Analisis Daya Adaptasi 10 Galur Mutan Padi Sawah di 20 Lokasi Uji Daya Hasil pada Dua Musim. Zuriat. 14 (1): 1-7
- Hendaryono, D.P.S. 2000. Pembibitan anggrek dalam botol. Kanisius. Yogyakarta
- Hendaryono, D.P.S. dan A. Wijayani. 1994. Teknik kultur jaringan : Pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif modern. Kanisius. Yogyakarta
- Hidayat. 2002. Kajian interaksi genotipe x lingkungan pada tanaman padi di lahan pasang surut berjenis tanah gambut. Agrivita 23(3): 186-192
- Hossain, M.M. 2008. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). African Journal of Biotechnology Vol. 7 (20): 3614-3619
- Husni, A., I. Mariska dan M. Kosmiatin. 1997. Embriogenesis somatic tanaman lada liar. Makalah Seminar Mingguan Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor, 5 September 1997
- Hutami, S., I. Mariska, R. Purnamaningsih, M. Herman, D.Damayanti, and T.I.Utami. 2002. Regeneration of papaya (*Carica papaya*) through somatic embryogenesis. Proc. the 2nd Indonesian Biotechnology Conference. Indonesian Biotechnology Consortium. Jakarta
- Ishii, Y., T. Takamura, M. Goi dan M. Tanaka. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. Plant Cell Reports 17: 446-450

- Iswanto, H. 2002. Petunjuk perawatan angrek. AgroMedia Pustaka. Jakarta
- Kasno, A., Trustinah, J. Purnomo, dan B. Swasono. 2007. Interaksi genotipe dengan lingkungan dan implikasinya dalam pemilihan galur harapan kacang tanah. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan 26 (3)
- Kenyo, A.P., Murdaningsih H.K., Tien Herawati, dan J.S. Darsa. 2002. Tanggap dua kultivar Lili terhadap kombinasi komposisi media MS dan gula pasir untuk konservasi *in vitro*. Zuriat 13(2): 87-96
- Khanna, H.K. and S.K. Raina. 1998. Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52 (3): 145-153
- Khosravi, A.R, M.A. Kadir, S.B. Kazemin, Zaman F.Q., and A.E. De Silva. 2008. Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv. Serdang Beauty. African Journal of Biotechnology 7 (22): 4093-4099
- Kitsaki, C.K., S. Zygouraki, M. Ziobora and S. Kintzios. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species (Orchidaceae). Plant Cell Rep. 23: 284-290
- Kong, Q., S.Y. Yuan, Gy. Végvári. 2007. Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rehb.f. International Journal of Horticultural Science 13 (1): 61-64
- Kurniawan, D. 2007. Induksi Kalus Eksplan dari Daun Tiga Varietas Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) dalam Berbagai Konsentrasi 2,4-D Secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Bandung
- Lestari, E.G. dan R. Yunita. 2008. Induksi Kalus dan Regenerasi Tunas Padi Varietas Fatmawati. Bul. Agron. 36 (2): 106 – 110
- Lestari, S.S. 1990. Mengenal dan Bertanam Angrek. Aneka Ilmu. Semarang
- Mariani, T.S., H. Miyake and Y. Takeoka. 2002. Direct Somatic Embryogenesis in Rice (*Oryza sativa* L.) : Structural and Developmental Patterns. J. Matematika dan Sains 7 (2): 53 – 56
- Mariska, I., D. Sopandie, S. Hutami, E. Syamsudin dan M. Kosmiatin. 2001. Peningkatan ketahanan terhadap AI pada tanaman kedelai melalui kultur in vitro. Laporan Riset Unggulan Terpadu VIII. Kantor Menristek dan LIPI. Jakarta

- Marlin. 2005. Regenerasi in vitro plntlet jahe bebas penyalit layu bakteri beberapa taraf konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 1- Naphtaleneacetic Acid (NAA). Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian Indonesia 7 (1): 8-14
- Marlina, N. 2004. Teknik modifikasi media Murashige dan Skoog (MS) untuk konservasi in vitro mawar (*Rossa* spp.). Bulletin Teknik Pertanian 9 (1): 4-6
- Mayerni, R. 2005. Inisiasi dan penggandaan tunas rami (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud) pada berbagai konsentrasi sitokinin melalui teknik kultur jaringan. Stigma XIII(3): 176-179
- Meesawat, U. and K. Kanchanapoom. 2002. In vitro plant regeneration through embryogenesis and organogenesis from callus culture of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.). Thammasat Int. J. Sc. Tech. 7(2): 17
- Nayak, N.R., S. Patnaik and S.P Rath. 1997. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe preamorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. Plant Cell Reports 16: 583-586
- Nisa, C. dan Rodinah. 2005. Kultur jaringan beberapa kultivar buah pisang (*Musa paradisiaca* L.) dengan pemberian campuran NAA dan kinetin. BIOSCIENTIAE 2(2): 23-36
- Piluek, C. and D. Bunchai. 2008. A manual of micropropagation of orchids and ornamental plants. Workshop on micropropagation of orchids and ornamental plants. Surabaya Orchid Show and Indonesia Horticultural Department
- Priyadi, D. dan E. Sudarmonowati. 2006. Pengaruh Komposisi Media dan Ukuran Eksplan terhadap Pembentukan Kalus Embriogenik Beberapa Genotip Lokal Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz). Biodiversitas 7 (3): 269-272
- Puchooa, D. 2004. Comparison of different culture media for the in vitro culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). Int. J. Agri. Biol. 6 (5): 884-888
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. Buletin AgroBio 5 (2): 51-58
- Rahardja, P. C. 1994. Kultur Jaringan. Penebar Swadaya. Jakarta. p 52
- Rianawati, S., A. Purwito, B. Marwoto, R. Kurniati dan Suryanah. 2009. Embriogenesis Somatik dari Eksplan Daun Anggrek *Phalaenopsis* sp L. J. Agron. Indonesia 37 (3) : 240 – 248
- Rosita, E., M. Ariyanti dan S. Amien. 2008. Induksi akar dari eksplan daun tiga varietas nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) dalam media MS yang mengandung Paclobutrazol in vitro. Zuriat 19 (1): 16-31

- Salisbury, F.B. dan C.W. Ross. 1992. Fisiologi tumbuhan. Penerbit ITB. Bandung
- Santoso, U. dan F. Nursandi. 2004. Kultur jaringan tanaman. Pusbitan UMM. Malang
- Satria, B. 2004. Perbanyak vegetatif klon kentang unggul (*Solanum tuberosum* L.) dengan pemberian berbagai konsentrasi BAP pada media MS melalui kultur jaringan. Stigma XII (1)
- Setiti, E.W.U., S. Puji A.W dan T. Soedarti. 1996. Peranan media dan zat pengatur tumbuh untuk induksi dan diferensiasi kalus pada budidaya jaringan melon. J. Hort. 5 (5): 76-79
- Sharma, U., V.R. Rao, J.S.S. Mohan, and A.S. Reddy. 2007. In vitro propagation of *Dendrobium microbulbon* A. Rich – A rare ethnomedical herb. Indian Journal of Biothecnology 6: 381-384
- Sheela, V.L., S. Sarada, and S. Anita. 2006. Development of protocorm-like bodies and shoots in *Dendrobium* cv. Sonia following gamma irradiation. Journal of Tropical Agriculture 44 (1-2): 86-87
- Simatupang, S. 1995. Perbanyakn asparagus (*Asparagus officinalis* L.) melalui kultur in vitro. J. Hort. 5 (1): 65-69
- Simatupang, S. 1996. Pengaruh penambahan sitokinin dan asam naftalen asetat pada media Murashige dan Skoog terhadap perkembangan eksplan asparagus. J. Hort. 6 (2): 105-108
- Soeryowinoto, S.M. dan M. Soeryowinoto. 1984. Perbanyak vegetatif pada Anggrek. Kanisius. Yogyakarta
- Supriati, Y., I. Mariska, dan Mujiman. 2006. Multiplikasi Tunas Belimbing Dewi (*Averrhoa carambola*) melalui Kultur In Vitro. Buletin Plasma Nutfah 12 (2): 50-55
- Supriyatna, A. 2009. Pengaruh NAA (Asam α -naftalen asetat) dan BAP (6-Benzil amino purin) pada Multiplikasi Pucuk Anggrek *Dendrobium* cv. Samarai secara *In Vitro*. Tesis. Program Studi Magister Biologi SITH-ITB
- Susanto, A., N.F. Devy dan B.V. Lotulung. 1995. Perbanyak vegetatif batang bawah apel (*Mallus domestica* Borkh.) secara in vitro: Penentuan komposisi media yang sesuai untuk masing-masing tahapan perbanyak. J. Hort. 5 (1): 19-24
- Sutanto, A. Dan M.A. Aziz. 2006. Induksi dan regenerasi embriogenesis somatik pepaya. J. Hort. 16 (2): 89-95

- Sutiyoso, Y. dan B. Sarwono. 2007. Merawat anggrek. Penebar Swadaya. Jakarta
- Tokuhara, K. and M. Mii. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37 : 457-461
- Untari, R., D. Murti puspitaningtyas. 2006. Pengaruh bahan organik dan NAA terhadap pertumbuhan anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) dalam kultur *in vitro*. *Biodiversitas* 7 (3): 344-348
- Utami, E.S.W., I. Sumardi, Taryono, dan E. Semiarti. 2007. Pengaruh α -Naphtaleneacetic Acid (NAA) terhadap embryogenesis somatic anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. *Biodiversitas* 8 (4): 295-299
- Wardiyati, T., N. Basuki, Radian, dan Soetarto. 1993. Penggunaan air kelapa dalam media kultur jaringan pisang (*Musa paradisiaca*). *Agrivita* 16 (2): 83-85
- Wattimena, G.A. 1988. Bioteknologi tanaman. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor
- Widiastoety, D., N. Solvia dan Syafni. 1998. Kultur embrio pada anggrek *Dendrobium*. *J. Hort.* 7 (4): 860-863
- Widiastoety, D. dan S. Kartikaningrum. 2003. Pemanfaatan ekstrak ragi dalam kultur *in vitro* plantlet media anggrek. *J. Hort.* 13 (2): 82-86
- Widiastoety, D., S. Kusumo dan Syafni. 1997. Pengaruh tingkat ketuaan air kelapa dan jenis kelapa terhadap pertumbuhan plantlet anggrek *Dendrobium*. *J. Hort.* 7 (3): 768-772
- Wijaya, A., Marlina, H. Damayanti. 2006. Respon embrio Panili (*Vanilla planifolia* Andrews) yang dikulturkan secara *in vitro* terhadap peningkatan konsentrasi NAA (Naphtaleneacetic Acid). *Agritek* 14 (4): 786-1007
- Winarsih, S., D. Santoso, dan T. Wardiyati. 2003. Regenerasi embrio zigotik dan transformasi genetik kakao melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Program Studi Ilmu Tanaman Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang
- Zhao, P., F. Wu, F.S. Feng, and W.J. Wang. 2008. Protocorm like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 44: 178-185
- Zulkarnain. 2009. Kultur jaringan tanaman. Bumi Aksara. Jakarta. p 250

Zulkarnain, B. Ichwan dan R. Astuti. 2005. Mokropropagasi kentang (*Solanum tuberosum* L.) cv. Granola: Pengaruh periode gelap pada awal kultur dan pengaruh konsentrasi kinetin pada kultur lanjutan. J. Agronomi 9(1) : 1-4



Lampiran 1

Komposisi media ½ MS campuran garam dasar dan media modifikasi VW

Media ½ MS		Media VW	
Senyawa	mg.L ⁻¹ media	Senyawa	mg.L ⁻¹ media
Makronutrien		Makronutrien	
KNO ₃	1900	KNO ₃	525
NH ₄ NO ₃	1650	(NH ₄) ₂ NO ₃	500
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	(Ca ₂) ₃ PO ₄	250
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	MgSO ₄ .7H ₂ O	250
KH ₂ PO ₄	170	KH ₂ PO ₄	250
Mikronutrien		Mikronutrien	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	MnSO ₄ .4H ₂ O	7
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Fe ₃ -Tatrat	28
H ₃ BO ₃	6,2		
KI	0,83		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025		
NaMoO.2H ₂ O	0,25		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025		
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8		
NaEDTA.2H ₂ O	37,3		
Sukrosa	30000	Sukrosa	20000
Agar	7000	Agar	7000

Lampiran 2

Deskripsi Angrek *Dendrobium* sp.

1. Seksi Spatulata (Ceratobium)

Batang pendek hingga panjang, dapat mencapai 60-200 cm, bagian bawah tertutup beberapa selaput tipis. Bagian pangkal menebal kemudian menyempit ke ujung. Daun kaku, berdaging, besar, dan sempit.

Bunga berbentuk tanduk atau bintang. Sepal dan petal sempit dan bagian tepi petal memilin. Pada beberapa spesies, petal sangat panjang dan tumbuh tegak seperti tanduk antelope. Malai bunga tumbuh dekat ujung batang. Tangkai bunga panjang dan mampu memunculkan 30-40 kuntum. Bibir sempit menyatu dengan kaki column sehingga membentuk suatu taji ramping. Warna bunga bervariasi.

Seksi ini memiliki sekitar 30 spesies. Penyebarannya mulai dari New Guinea hingga Jawa Timur. Umumnya tumbuh di daerah dataran rendah dan di pepohonan serta bebatuan dekat pantai.

a. *Dendrobium strebloceras* Rehb.f.

Terdapat di Pulau Halmahera, Maluku.

Pseudobulb mencapai panjang 1,5 m dan diameter 1,5 cm. Daun berdaging. Berbentuk bulat telur memanjang sampai lanset. Panjang daun mencapai 16 cm dan lebar 5 cm, tapi umumnya lebih kecil. Daun tumbuh pada pseudobulb bagian tengah ke atas.

Panjang tandan bunga mencapai 40 cm dengan 6-8 bunga. Masing-masing bunga panjangnya mencapai 5 cm, berbau harum. Petal dan sepal berpilin, berwarna kuning muda atau hijau yang tertutup warna cokelat sampai cokelat tua, dan seringkali warnanya menjadi lebih gelap seiring umur bunga. Berbunga sepanjang tahun dan bunganya dapat bertahan sampai 2 bulan.

b. *Dendrobium lineale* Rolfe

Dendrobium lineale terdapat secara alami di sepanjang pantai timur laut New Guinea dari pedalaman Irian Jaya sampai Milde Bay.

Pseudobulb dapat tumbuh sampai 2 m, dengan diameter 2-3 cm. Daun berbentuk oblong (lonjong memanjang) atau lanset (meruncing ke ujung) dengan panjang 8-15 cm.

Panjang tandan bunga mencapai 75 cm, melengkung. Lebar bunga 5 cm, warna bunga bervariasi, sebagian besar berwarna putih atau kuning muda dengan garis-garis biru. Berbunga sepanjang tahun dan bunganya dapat bertahan 2-3 bulan.

c. *Dendrobium pseudoconanthum* J.J.Sm.

Ditemukan di Papua dan Sulawesi pada daerah dengan ketinggian yang rendah. Termasuk anggrek epifit yang tumbuh pada suhu panas sampai hangat.

Tanaman berukuran besar sampai sangat besar. Batang berbentuk gelendong yang mengecil di bagian paling ujung (pucuk). Daun berjumlah banyak, berwarna hijau tua, tebal, licin atau berkilap, membengkok di bagian tepi.

Berbunga di akhir musim dingin dan awal musim semi. Panjang tandan bunga sekitar 23-31 cm, melengkung. Bunga berjumlah sekitar 25 kuntum dengan lebar 2,5-3 cm.

2. Seksi *Latourea*

Spesies-spesies pada seksi ini termasuk epifit pada pohon di hutan hujan di dataran rendah sampai dataran tinggi, biasanya di daerah dengan hujan sepanjang tahun. Tanaman berukuran kecil sampai sangat besar. Pseudobulb menebal ke atas, memiliki beberapa ruas dan daun yang saling menutupi dekat ujung pseudobulb.

Bunga berbentuk rangkaian dan tumbuh tegak dekat ujung pseudobulb. Bunga agak berdaging dengan ukuran bervariasi. Warna kehijauan, berukuran besar dengan mentum pendek, dan bibir terbelah tiga. Permukaan bunga berbulu kasar, bibir menggantung dan berwarna hitam. Bunga tahan lama.

Tersebar dari Papua sampai ke Pulau Jawa. Memiliki 30-35 spesies.

a. *Dendrobium spectabile* (Blume) Miq.

Disebut juga anggrek kribo. Merupakan spesies Irian dan Kepulauan Solomon. Jenis ini membutuhkan iklim yang kering, sejuk dan tempat yang sedikit terlindung. Termasuk seksi *Latourea*, seperti halnya *D. macrophyllum*. Kedua spesies ini memang mirip dalam hal kebiasaan tumbuhnya, tetapi *D. spectabile* lebih besar.

Panjang umbi semu dapat mencapai 60-100 cm. Daunnya berbentuk lonjong dengan ujung runcing yang tersusun berhadapan.

Tangkai bunga muncul dari samping batang, jumlah bunga sebanyak 12 bunga, yang tersusun pada tandan yang panjangnya 50 cm. Lebar bunga sekitar 8-12 cm. Sepal, petal dan bibir mengecil pada bagian ujung dan pinggirannya keriting bergelung-gelung sampai ke pangkalnya. Warna sepal dan petal kuning muda, kuning atau hijau pucat, pinggirannya berurat-urat warna ungu gelap suram. Bibir hampir putih pada bagian pangkal, kekuningan di ujungnya, juga berurat-urat ungu gelap pekat, belahan sisinya seperti mirip dengan belahan sisi bibir *D. macrophyllum* tapi lebih kecil, dengan kerutan-kerutan tidak teratur di pinggir. Hampir berbunga sepanjang tahun. Bunga terbanyak di dapat pada bulan Januari, April sampai September. Masa mekar bunga 15-23 hari (Gunadi, 1979; Anonim^a, 1980; Anonim^b, 1980).



Lampiran 3

Denah Percobaan

1. Denah percobaan I

G1M1U3	G3M4U1	G2M1U1	G4M4U1	G2M4U3	G3M1U3
G4M2U3	G3M4U2	G1M3U2	G2M1U3	G3M3U3	G4M1U3
G2M3U2	G1M2U3	G2M1U2	G4M2U2	G4M4U3	G3M4U3
G4M3U2	G2M4U2	G2M2U2	G2M3U3	G2M4U1	G1M1U1
G3M2U2	G4M2U1	G4M3U3	G1M2U2	G3M2U3	G2M2U1
G3M1U2	G1M1U2	G3M3U1	G4M4U2	G1M4U3	G1M3U1
G2M2U3	G3M2U1	G1M2U1	G1M3U3	G4M1U2	G1M4U2
G1M4U1	G4M3U1	G3M3U2	G4M1U1	G2M3U1	G3M1U1

2. Denah percobaan II

D1M1U1	D2M1U3	D2M2U1	D1M4U2	D1M2U3	D2M3U1
D2M1U2	D2M4U1	D2M3U3	D1M1U3	D1M3U2	D2M2U3
D2M2U2	D1M1U2	D1M2U1	D2M3U2	D2M4U1	D1M2U2
D1M4U1	D2M4U3	D1M3U1	D2M1U1	D1M3U3	D1M4U3

Lampiran 4

Tabel Analisis Ragam (ANOVA)

a. Percobaan 2 Tahap 1

Tabel 1. ANOVA Persentase Eksplan Membentuk Kalus

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		
					5%	1%	
Perlakuan	7	15,79	2,256	8,977	2,657	4,026	**
Galat	16	4,02	0,251				
Total	23	19,81					

KK (%) = 59,6503

Tabel 2. ANOVA Persentase Eksplan Membentuk PLB

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		
					5%	1%	
Perlakuan	7	17,719	2,53	8,725	2,657	4,026	**
Galat	16	4,642	0,29				
Total	23	22,361					

KK (%) = 45,9543

Tabel 3. ANOVA Persentase Eksplan Membentuk Tunas

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		
					5%	1%	
Perlakuan	7	5,917	0,845	1,397	2,657	4,026	tn
Galat	16	9,679	0,605				
Total	23	15,596					

KK (%) = 84,4125

Tabel 4. ANOVA Jumlah PLB per Eksplan

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		
					5%	1%	
Perlakuan	7	0,059	0,008	1,961	2,657	4,026	tn
Galat	16	0,069	0,004				
Total	23	0,128					

KK (%) = 8,9824

Tabel 5. ANOVA Jumlah Tunas per Eksplan

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		
					5%	1%	
Perlakuan	7	0,006	0,0009	1,508	2,657	4,026	tn
Galat	16	0,009	0,0006				
Total	23	0,016					

KK (%) = 4,3263

b. Percobaan 2 Tahap 2

Tabel 1. ANOVA Persentase Eksplan Membentuk Kalus

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		
					5%	1%	
Perlakuan	7	6,454	0,922	6,069	2,657	4,026	**
Galat	16	2,431	0,152				
Total	23	8,885					

KK (%) = 37,1293

Tabel 2. ANOVA Persentase Eksplan Membentuk PLB

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		tn
					5%	1%	
Perlakuan	7	9,252	1,322	2,310	2,657	4,026	tn
Galat	16	9,155	0,572				
Total	23	18,407					

KK (%) = 63,9360

Tabel 3. ANOVA Persentase Eksplan Membentuk Tunas

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		tn
					5%	1%	
Perlakuan	7	5,990	0,856	1,873	2,657	4,026	tn
Galat	16	7,309	0,457				
Total	23	13,299					

KK (%) = 27,7277

Tabel 4. ANOVA Persentase Eksplan Membentuk Kombinasi Kalus dan PLB

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		**
					5%	1%	
Perlakuan	7	11,857	1,694	10,377	2,657	4,026	**
Galat	16	2,612	0,163				
Total	23	14,468					

KK (%) = 37,7218

Tabel 5. ANOVA Persentase Eksplan Membentuk PLB dan Tunas

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		tn
					5%	1%	
Perlakuan	7	5,213	0,745	1,135	2,657	4,026	tn
Galat	16	10,496	0,656				
Total	23	15,709					

KK (%) = 72,8989

Tabel 6. ANOVA Jumlah PLB per Eksplan

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		tn
					5%	1%	
Perlakuan	7	0,262	0,038	2,279	2,657	4,026	tn
Galat	16	0,263	0,016				
Total	23	0,526					

KK (%) = 16,2546

Tabel 7. ANOVA Jumlah Tunas per Eksplan

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel		tn
					5%	1%	
Perlakuan	7	0,209	0,03	1,383	2,657	4,026	tn
Galat	16	0,345	0,022				
Total	23	0,553					

KK (%) = 18,8785