



**PENGARUH MEDIA DAN PERBANDINGAN KONSENTRASI ZAT
PENGATUR TUMBUH PADA REGENERASI ANGGREK *Phalaenopsis* sp
MELALUI PEMBENTUKAN EMBRIO SOMATIK**

TESIS

**Diajukan guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program
Studi Magister Agronomi (S2) dan mencapai gelar Magister Pertanian**

Oleh :

**BUDI KRISWANTO
NIM. 161520101005**

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Kupersembahkan tesis ini kepada :

- Ayahanda Soebiyanto (Alm) dan Ibunda Praningsih
- Istriku Sri Lestari dan anakku Annisa Syifa Maryam Azahra
- Kakanda Bakti Suwanto dan adinda Iwan Aviato, beserta keluarganya.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Budi Kriswanto

NIM : 161520101005

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **Pengaruh Media Dan Perbandingan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Pada Regenerasi Anggrek *Phalaenopsis Sp* Melalui Pembentukan Embrio Somatik** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 9 Januari 2020

Yang menyatakan,

Budi Kriswanto

NIM. 161520101005

TESIS

**PENGARUH MEDIA DAN PERBANDINGAN KONSENTRASI ZAT
PENGATUR TUMBUH PADA REGENERASI ANGGREK
PHALAENOPSIS SP MELALUI PEMBENTUKAN EMBRIO SOMATIK**

Oleh :

Budi Kriswanto

NIM 161520101005

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., Ph.D.

NIP. 196504251994031001

Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D.

NIP. 196005061987021001

PENGESAHAN

Tesis berjudul **Pengaruh Media Dan Perbandingan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Pada Regenerasi Anggrek *Phalaenopsis* Sp Melalui Pembentukan Embrio Somatik** telah diuji dan disahkan pada :

Hari & tanggal : 13 Januari 2020

Tempat : Ruang Sidang I, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Dosem Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., Ph.D.

NIP. 196504251994031001

Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D.

NIP. 196005061987021001

Dosen Penguji Utama

Dosen Penguji Anggota

Dr. Ir. Miswar, M.Si.

NIP. 196410191990021002

Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, M.S.

NIP. 196003171983032001

Mengesahkan

Dekan,

Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D.

NIP. 196005061987021001

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah swt. atas segala nikmat yang diberikan dan sholawat kepada nabi Muhammad saw, sehingga terselesainya penyusunan tesis berjudul **Pengaruh Media Dan Perbandingan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Pada Regenerasi Anggrek *Phalaenopsis* Sp Melalui Pembentukan Embrio Somatik** guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan magister (S2) pada Program Studi Magister Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Penyusunan tesis hingga selesai karena bantuan dari berbagai pihak dan penulis menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Jember dan sekaligus Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberi arahan dan petunjuk dalam penulisan.
2. Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, M.S. selaku Koordinator Program Studi Magister Agronomi, Fakultas Pertanian dan sekaligus Dosen Penguji Anggota yang telah memberi arahan dan masukan dalam penulisan.
3. Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ketua Laboratorium Ekofisiologi yang banyak memberi arahan, petunjuk dan masukan selama penelitan dan penulisan.
4. Dr. Ir. Miswar, M.Si selaku Dosen Penguji Utama yang banyak memberi petunjuk dan masukan dalam penulisan.
5. Dr. Ir. Slameto, M.P. selaku Koordinator Program Studi Agronomi yang telah memberi ijin pelaksanaan penelitian di laboratorium Ekofisiologi, PS. Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
6. Seluruh dosen Fakultas Pertanian, Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan pengetahuannya.
7. Ayahanda Soebiyanto (alm) dan Ibunda Praningsih atas doa yang dipanjatkan dan kasih sayang yang diberikan.

8. Teman teman kuliah di PS Magister Agronomi, teman sejawat di Faperta Unej, teman seperjuangan di laboratorium Kultur Jaringan, dan semua pihak yang telah membantu terselesainya penulisan tesis.

Tiada gading yang tiada retak, penulis menerima kritik dan saran untuk perbaikan di dalam penulisan dan mohon maaf atas kesalahan.



RINGKASAN

Pengaruh Media Dan Perbandingan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Pada Regenerasi Anggrek *Phalaenopsis* sp Melalui Pembentukan Embrio Somatik; Budi Kriswanto, 161520101005; 2019: 54 halaman; Program Studi Magister Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Anggrek merupakan tanaman hias populer dan pasar mempunyai permintaan anggrek cukup tinggi, sehingga anggrek mempunyai potensi baik untuk diusahakan dalam skala besar. Karena alasan tersebut, produksi anggrek diperlukan dalam jumlah banyak dan teknik kultur jaringan tanaman menjadi pilihan baik. Bahan tanam bersifat meristematik sangat menguntungkan untuk memperpendek waktu proses kultur jaringan, seperti protocorm maupun *protocorm like bodies* (PLB). Media mempunyai peran penting dalam perbanyakannya *in vitro*, ada 3 hal perlu perhatian dalam media yaitu tipe media, jenis media dasar dan perbandingan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT), yaitu auksin dan sitokinin.

Tujuan penelitian yaitu mendapatkan metode terbaik dalam regenerasi tanaman anggrek *Phalaenopsis* sp. Regenerasi tanaman melalui pembentukan embrio-somatik menggunakan pengaruh media dan ZPT. Pengaruh tersebut meliputi tipe media, jenis media dasar dan perbandingan konsentrasi *naphthaleneacetic acid* (NAA) dan benzylamino purine (BAP).

Percobaan dilaksanakan di laboratorium Ekofisiologi (Kultur Jaringan Tumbuhan) Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian dan laboratorium Mikroteknik, Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 3 faktor dan 3 ulangan. Faktor-faktor tersebut yaitu **tipe media** (M), **jenis media dasar** (J), dan **perbandingan konsentrasi NAA dan BAP** (K). Masing-masing faktor mempunyai level tertentu yaitu tipe media (M) terdiri dari padat (M1) dan cair (M2), jenis media dasar (J) terdiri dari Vacin & Went (J1) dan Murashige & Skoog (J2), dan perbandingan konsentrasi NAA dan BAP (K) terdiri dari NAA 0,1 mg L⁻¹: BAP 0,1 mg L⁻¹ (K1), NAA 0,1 mg L⁻¹: BAP 5 mg L⁻¹ (K2), NAA 0,1 mg L⁻¹: BAP 10 mg L⁻¹ (K3), NAA 1 mg L⁻¹

¹: BAP 0,1 mg L⁻¹ (K4), NAA 1 mg L⁻¹: BAP 5 mg L⁻¹ (K5), NAA 1 mg L⁻¹: BAP 10 mg L⁻¹ (K6).

Hasil pengamatan percobaan dalam penelitian menunjukkan interaksi 3 faktor berpengaruh berbeda sangat nyata pada variabel berat PLB dimana kombinasi perlakuan tipe media padat, jenis media dasar MS dan perbandingan konsentrasi NAA 1 mg L⁻¹ dan BAP 0,1 mg L⁻¹ menghasilkan PLB terberat yaitu 4,30 g. Interaksi 3 faktor berpengaruh tidak berbeda nyata pada variabel pengamatan selain berat PLB. Interaksi 2 faktor berpengaruh pada kemampuan pembentukan kalus, berat kalus, jumlah PLB dan jumlah planlet. Kombinasi perlakuan tipe media padat dan jenis media dasar MS memberikan kemampuan terbaik dalam pembentukan kalus yaitu 100%, dan kombinasi perlakuan tipe media cair dan jenis media dasar VW menghasilkan kalus terberat yaitu 0,14 g. Kombinasi perlakuan tipe media cair dan perbandingan konsentrasi NAA 1 mg L⁻¹ dan BAP 5 mg L⁻¹ menghasilkan jumlah PLB terbanyak yaitu 45,50 PLB. Kombinasi perlakuan jenis media dasar MS dan perbandingan konsentrasi NAA 0,1 mg L⁻¹ dan BAP 0,1 mg L⁻¹ menghasilkan jumlah planlet terbanyak yaitu 1,50 planlet. Faktor tunggal memberi pengaruh yang berbeda-beda terhadap pembentukan embrio somatik, yaitu pada variabel pengamatan PLB berkecambah dan PLB berdaun. Perlakuan tipe media padat menghasilkan PLB berkecambah lebih banyak dari media cair yaitu 4,56 PLB, perlakuan jenis media dasar MS menghasilkan PLB berkecambah lebih banyak dari jenis media dasar VW yaitu 4,75 PLB, dan jenis media dasar MS menghasilkan PLB berdaun lebih banyak dari jenis media dasar VW yaitu 2,56 PLB. Perlakuan perbandingan konsentrasi NAA dan BAP berpengaruh pada PLB berkecambah dan PLB berdaun, dimana perbandingan konsentrasi NAA 0,1 mg L⁻¹ dan BAP 0,1 mg L⁻¹ menghasilkan terbanyak yaitu 6,92 PLB dan 3,83 PLB.

SUMMARY

Effect of Media and Concentration Ratio of Plant Growth Regulator in *Phalaenopsis* sp Regeneration Through Somatic Embryogenesis; Budi Kriswanto, 161520101005; 2019: 54 pages; Program Study of Magister Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Orchid is a popular ornamental plant and the market demands of its are quite high, so that orchids have potential to be cultivated on a large scale. For this reason, production of orchid plant seedling in large quantities is needed and plant tissue culture techniques are a good alternative. Meristematic explant is very beneficial to shorten the process of tissue culture, such as protocorms and protocorm like bodies (PLB). The media plays an important role in micropropagation, and important things are the type of media, the type of basal media and the ratio concentration of auxin and cytokinin, namely *naphthaleneacetic acid* (NAA) and *benzylaminopurine* (BAP).

The aim of research was to obtain the best method in regeneration of *Phalaenopsis* sp. The regeneration through the somatic embryogenesis using the influence of different of media and plant growth regulator. The difference of its namely media type, basal media type and concentrations ratio of NAA and BAP.

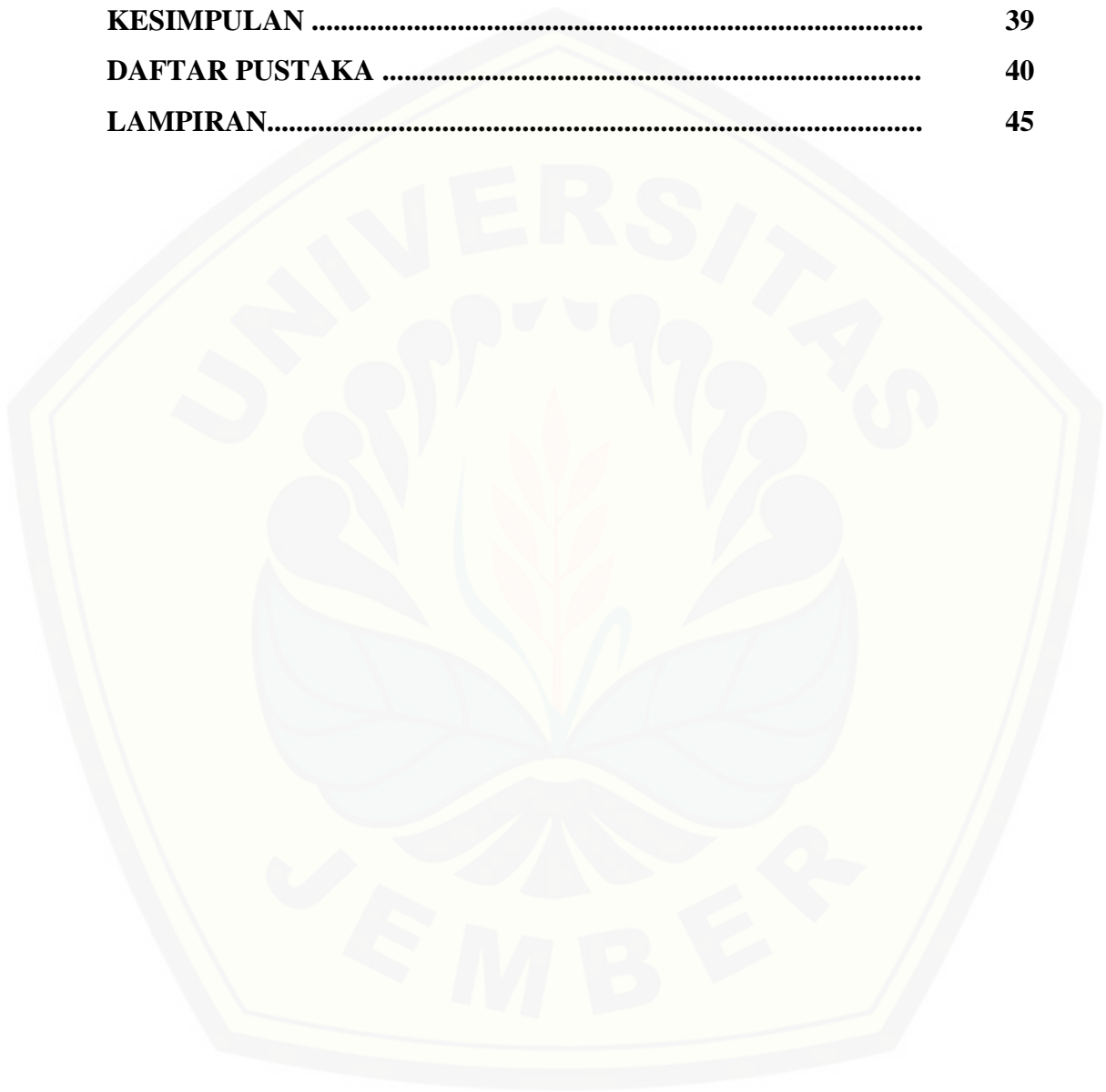
The experiment was conducted at the laboratory of Ecophysiology (Plant Tissue Culture) Program Study of Agronomy, Faculty of Agriculture and laboratory of Microtechnical, Program Study of Biology Education, Faculty of Teacher Training and Education, University of Jember. The experiment used Completely Randomized Designed with 3 factors and 3 replications. These factors were media type (M), basal media type (J), and concentrations ratio of NAA and BAP (K). Each factor has different levels, namely media type (M) consist of solid (M1) and liquid (M2), basal media type (J) consist of Vacin & Went (J1) and Murashige & Skoog (J2), and concentration ratio NAA and BAP (K) consist of NAA 0.1 mg L⁻¹: BAP 0.1 mg L⁻¹ (K1), NAA 0.1 mg L⁻¹: BAP 5 mg L⁻¹ (K2), NAA 0, 1 mg L⁻¹: BAP 10 mg L⁻¹ (K3), NAA 1 mg L⁻¹: BAP 0.1 mg L⁻¹ (K4), NAA 1 mg L⁻¹: BAP 5 mg L⁻¹ (K5), NAA 1 mg L⁻¹: BAP 10 mg L⁻¹ (K6).

The results shown that the interaction of 3 factors influenced the PLB weight variable which the treatment combination of solid media type, MS basal media type and concentration ratio of NAA 1 mg L^{-1} and BAP 0.1 mg L^{-1} resulted the heaviest PLB that is 4.30 g, very significantly. The interaction of 3 factors influenced non significantly to others variabel. The interaction of 2 factors influenced the ability of callus formation, callus weight, number of PLB and number of plantlets. The treatments combination of solid media types and MS basal media types provides the best ability in the formation of callus that is 100%, and the treatments combination of liquid media type and VW basal media types resulted the heaviest callus that is 0.14 g. The treatment combination of liquid media type and concentration ratio of NAA 1 mg L^{-1} and BAP 5 mg L^{-1} resulted the highest number of PLB, which was 45.50 PLBs. The treatment combination of the MS basal media and the concentration ratio of NAA 0.1 mg L^{-1} and BAP 0.1 mg L^{-1} resulted the highest number of planlets, thtt is 1.50 planlets. A single factor gives a different effect on the somatic embryos, namely the variable of PLB germination and PLB with leaves. The treatment of solid media types resulted more PLB germination than liquid media that is 4.56 PLBs, the treatment of MS basal media types results PLB germination more than VW basal media types which is 4.75 PLBs, and MS basal media types results more PLB with leaves than VW basal media type is 2.56 PLBs. The treatment of concentrations ratio of NAA and BAP had an effect on germination PLB and PLB with leaves, where concentrations ratio of NAA 0.1 mg L^{-1} and BAP 0.1 mg L^{-1} resulted the most, namely 6.92 PLBs and 3.83 PLBs.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman judul	i
Persembahan	ii
Pernyataan	iii
Pembimbingan	iv
Pengesahan	v
Kata pengantar	vi
Ringkasan	viii
Summary	x
Daftar isi	xii
Daftar gambar	xiv
Daftar tabel	xv
Daftar lampiran	xvi
Bab 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tanaman Anggrek <i>Phalenopsis</i>	5
2.2 Media Kultur Jaringan Tanaman	5
2.3 Zat Pengatur Tumbuh Auksin Dan Sitokinin	9
2.4 Pembentukan Embrio Somatik Anggrek <i>Phalaenopsis</i> sp	12
2.5 Histologi Pada Pembentukan Embrio Somatik Anggrek....	14
2.6 Analisa Gambar Menggunakan Citra Digital ImageJ.....	14
2.7 Hipotesis.....	15
BAB 3. METODOLOGI	16
3.1 Waktu Dan Tempat.....	16
3.2 Alat Dan Bahan	16
3.3 Metode Percobaan	16

3.4 Pelaksanaan Percobaan	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Hasil.....	21
4.2 Pembahasan	26
KESIMPULAN	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN.....	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Rumus bangun <i>naphthaleneacetic acid</i> dan <i>benzylaminopurine</i> ..	10
Gambar 2.2.	Histologi PLB pada embrio anggrek.....	14
Gambar 3.1.	Alur kegiatan percobaan dalam kultur jaringan pembentukan embrio somatik.....	18
Gambar 4.1.	Grafik pengaruh tipe media, jenis media dasar dan perbandingan konsentrasi NAA dan BAP terhadap umur PLB.	23
Gambar 4.2.	Perkembangan awal pembentukan embrio somatik <i>Phalaenopsis</i> sp di media induksi padat dan cair.....	29
Gambar 4.3.	Histologi pada awal embriogenesis somatik <i>Phalaenopsis</i> sp...	30
Gambar 4.4.	Protocorm like bodies dewasa.....	32
Gambar 4.5.	Pembentukan akar pada PLB berdaun.....	34
Gambar 4.6.	Histologi daun dan akar.....	35
Gambar 4.7.	Pengamatan stomata dengan scanning electron microscope.....	36
Gambar 4.8.	Protocorm like bodies berakar dengan tunas apikal dan daun primordia.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Rangkuman Nilai Kuadrat Tengah Sidik Ragam Pada Semua Variabel Pengamatan.....	21
Tabel 4.2	Data pengaruh interaksi 3 faktor terhadap berat PLB pada pembentukan embrio somatik.....	22
Tabel 4.3	Data pengaruh interaksi 2 faktor terhadap pembentukan kalus, berat kalus, jumlah PLB dan jumlah planlet	24
Tabel 4.4	Data analisa warna kalus berdasarkan citra digital ImageJ	25
Tabel 4.5	Data pengaruh faktor tunggal terhadap PLB berkecambah dan PLB berdaun	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Komposisi senyawa kimia menurut jenis media dasar MS dan VW	45
Lampiran 2	Histogram analisa warna kalas dengan ImageJ.....	46
Lampiran 3	Analisa data berat PLB.....	47
Lampiran 4	Analisa data kemampuan pembentukan kalus.....	52
Lampiran 5	Analisa data perkecambahan PLB.....	54



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Anggrek merupakan tanaman hias populer dan anggrek mempunyai bermacam-macam jenis. Beberapa jenis anggrek antara lain *Phalaenopsis* sp, *Dendrobium* sp, *Cattleya* sp, *Vanda* sp, *Oncidium* sp dan lain-lain. Ada 64 species *Phalaenopsis* sp dan keaneka ragaman tertinggi di Filipina (21 species) dan Borneo (16 species). Indonesia mempunyai 25 species, 10 diantaranya endemik (Rahayu, 2015). Keputusan Presiden nomor 4 tahun 1993 menyatakan *Phalaenopsis amabilis* sebagai puspa pesona bangsa Indonesia, *Jasminum sambac* (bunga melati) sebagai puspa bangsa dan *Rafflesia arnoldi* sebagai puspa langka Indonesia (Ningrum, 2017). Badan Pusat Statistik (2015) menyatakan ekspor anggrek mempunyai peluang besar di beberapa negara antara lain Malaysia (93,67%), Singapura (51,51%), Jepang (46,98%), Taiwan (1,93%) dan Australia (0,11%). Budidaya anggrek secara komersial bisa berkembang melalui kultur jaringan tanaman. Budidaya anggrek melalui teknik kultur *in vitro* ideal untuk konservasi sumberdaya genetik dan pengadaan benih, misalnya species dalam bahaya kepunahan dan genotipe elite bisa dikembangkan biakkan pada skala besar dalam laboratoium produksi (Tjokrokusumo, 2004). Perbanyak tanaman melalui kultur jaringan menghasilkan 1 juta embrio/plb pada jenis *Phalaenopsis* dan 148.438 planlet pada jenis *Dendrobium* dari setiap eksplan dalam waktu 1 tahun (Winarto, 2012).

Media menentukan keberhasilan kultur jaringan tanaman anggrek dan bermacam-macam media dasar mempunyai komposisi dan konsentrasi garam-garam berbeda, dimana garam-garam berfungsi sebagai unsur hara. Media kultur jaringan tanaman anggrek menggunakan Vacin & Went (VW) untuk pertumbuhannya (Silva *et. al.*, 2000), media setengah konsentrasi Murashige & Skoog (MS) (Meilasari & Iriawati, 2016), dan media New Dogashima Medium (NDM) (Azadeh *et. al.*, 2009). Menurut George *et. al.* (1987), media MS mempunyai komposisi senyawa kimia lebih banyak macamnya dan lebih tinggi konsentrasinya dari pada VW. Media dasar konsentrasi setengah MS

menghasilkan embrio terbanyak pada *Phalaenopsis amabilis*, namun media dasar VW menghasilkan diameter *protocorm like bodies* (PLB) yang lebih besar (Puspita *et. al.*, 2011), dan menghasilkan persentase hidup tertinggi pada perbanyakan PLB (Raynalta dan Sukma, 2013). Yih Ng. *et. al.*, (2010) menyatakan penggunaan N-organik dari *casein hydrolysate*, *peptone*, dan *tryptone-peptone* menghasilkan multiplikasi tunas lebih banyak dari kontrol.

Media mempunyai 2 tipe yaitu cair dan padat. Respon pertumbuhan eksplan berbeda antara media padat dan media cair walaupun menggunakan jenis media yang sama, karena ada perbedaan kelembaban dan ketersediaan nutrisi (Muñoz *et. al.*, 2009). Hvoslef-Eide dan Preil (2005) menyatakan media cair perlu memperhatikan ketersediaan oksigen, media padat lebih banyak digunakan dari pada media cair karena lingkungannya menyerupai kondisi alam, khususnya penyediaan oksigen yang optimal. Penelitian tentang penyediaan oksigen dalam bioreaktor menunjukkan bahwa produksi embrio *Daucus* menurun dengan significant jika oksigen terlarut berkurang yaitu 600 embrio somatik per ml pada tingkat oksigen terlarut 100% dan 170 embrio somatik per ml pada tingkat oksigen terlarut 10% (Jackson, 2005). Oksigen (O₂) termasuk senyawa non polar dan bisa berinteraksi dengan air, sehingga oksigen bisa terdifusi ke dalam media cair. Salmin (2005) menyatakan oksigen dalam air berasal dari udara bebas dan hasil fotosintesis yang terdifusi. Kecepatan difusi oksigen di antaranya bergantung pada suhu, pergerakan massa udara dan air. Mbiyu, *et. al.*, (2012) menyatakan media cair mempunyai kelebihan yaitu kontak media dengan bahan tanam (ekplan) tidak terbatas sehingga nutrisi bisa terserap ke dalam tanaman lebih banyak dan biaya pembuatan media menjadi lebih murah, dimana ada pengurangan biaya agar-agar Muñoz *et. al.*, (2009) menyatakan media cair lebih baik dari media padat dalam pertumbuhan tanaman tetapi kemampuan bertahan dan keberhasilan hidup saat aklimatisasi planlet media padat lebih baik dari media cair.

Zat pengatur tumbuh (ZPT) mempunyai peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Auksin dan sitokinin konsentrasi rendah diberikan pada inisiasi awal pembentukan protocorm (Paek. *et. al.*, 2011). Interaksi auksin

dan sitokinin mempunyai peran penting untuk mengontrol proses perkembangan kultur, seperti pembentukan dan pemeliharaan meristem untuk tunas dan akar (Su *et. al.*, 2011). Auksin bermanfaat dalam menginduksi kalus dan akar, dan sitokinin bermanfaat dalam menginduksi tunas. Kedua golongan ZPT tersebut digunakan bersama-sama karena bekerja secara bersinergi di dalam pertumbuhan dan perkembangan kultur, perbandingan konsentrasi antara auksin dan sitokinin mempengaruhi arah pertumbuhan eksplan (Gunawan, 1988). So Young *et. al.* (2000) menyatakan penggunaan NAA 1 mg L^{-1} dan BAP 15 mg L^{-1} menghasilkan PLB dari eksplan daun planlet dan memperbanyak PLB dalam bioreaktor, dan Meilasari dan Iriawati (2016) menyatakan penggunaan NAA $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, BAP 5 mgL^{-1} , IAA $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ menghasilkan PLB dari eksplan akar planlet. Sementara Zhao *et. al.*, (2008) menyatakan penggunaan NAA $2,7 \mu\text{M}$ atau $1,5771 \text{ mg L}^{-1}$ baik digunakan untuk menginduksi akar anggrek.

1.2 Perumusan Masalah

Kultur jaringan merupakan metode efisien dalam perbanyak tanaman secara vegetatif, regenerasi tanaman unggul dalam jumlah maksimal bisa menggunakan teknik kultur jaringan. Oleh karena itu, pemilihan bahan tanam (eksplan) bersifat meristematik seperti *PLB* berfungsi mempersingkat waktu, karena memberikan respon pertumbuhan yang cepat. Media mempunyai peran penting dalam kultur jaringan. Ada 2 tipe media yaitu padat dan cair, dimana kelebihan masing-masing yaitu ketersediaan oksigen yang melimpah pada media padat dan nutrisi dan ZPT yang mudah diserap eksplan pada media cair. Selain tipe media, jenis media dasar berpengaruh dalam kultur jaringan tanaman karena setiap jenis media dasar mempunyai formulasi komposisi senyawa kimia yang berbeda, sehingga tidak setiap jenis media dasar menghasilkan perkembangan tanaman yang sama. Zat pengatur tumbuh sering kali ditambahkan ke media dan ZPT bisa menentukan arah perkembangan tanaman. Auksin berperan untuk menginduksi kalus dan akar, sementara sitokinin menginduksi tunas. Berdasarkan perbedaan tipe media, jenis media dasar dan perbandingan konsentrasi NAA dan BAP, maka diduga ada pengaruh pada regenerasi tanaman melalui pembentukan

embrio somatik. Analisa histologi dilakukan untuk mengetahui perkembangan embrio-somatik anggrek *Phalaenopsis* sp mulai awal hingga terbentuk planlet.

1.3 Tujuan

1. Penelitian bertujuan mendapatkan pengaruh terbaik dari interaksi 3 faktor, 2 faktor dan faktor tunggal dari tipe media, jenis media dasar dan perbandingan konsentrasi NAA dan BAP dalam regenerasi anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembentukan embrio somatik.
2. Penelitian bertujuan mendapatkan media pertumbuhan terbaik untuk regenerasi anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembentukan embrio-somatik.
3. Penelitian bertujuan mengetahui perkembangan embrio-somatik tanaman anggrek *Phalaenopsis* sp sejak awal hingga akhir (planlet) melalui pengamatan histologi.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Penelitian bermanfaat untuk mendapatkan metode perbanyak tanaman yang baik melalui inovasi aplikasi media tumbuh pada regenerasi anggrek *Phalaenopsis* sp dengan pembentukan embrio-somatik.
2. Penelitian membantu usaha pelestarian tanaman anggrek *Phalaenopsis* sp pada plasma nutfah melalui regenerasi tanaman secara embrio somatik.
3. Penelitian membantu pengembangan usaha budidaya anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembibitan tanaman anggrek secara cepat dan berkualitas.
4. Penelitian bermanfaat untuk mendapatkan pengetahuan tentang proses regenerasi tanaman anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembentukan embrio somatik.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Anggrek *Phalaenopsis* sp.

Menurut Gandawidjaya (1980), klasifikasi anggrek *Phalaenopsis* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Angiospermae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Monocotyledoneae
Sub kelas	: Liliidae
Ordo	: Orchidales
Famili	: Orchidaceae (suku anggrek-anggrekan)
Genus	: <i>Phalaenopsis</i>
Spesies	: <i>Phalaenopsis</i> sp.

Beberapa jenis anggrek di Indonesia antara lain *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Vanda*, *Cattleya* dan *Grammatophylum*. *Phalaenopsis* tersebar mulai Indonesia, Malaysia, Filipina hingga Australia. Cara hidupnya secara epifit, dimana tanaman menempel pada batang atau cabang pohon, anggrek bisa tumbuh subur hingga ketinggian 600 meter di atas permukaan laut. *Phalaenopsis* termasuk tanaman anggrek monopodial yang menyukai sedikit cahaya matahari. Daunnya berwarna hijau dengan bentuk memanjang. Akarnya berwarna putih dengan bentuk bulat memanjang, seperti berdaging. Bunganya sedikit harum dan waktu mekar lama dan bunga dapat tumbuh hingga diameter 10 cm lebih.

2.2 Media Kultur Jaringan Tanaman

Media kultur jaringan tanaman mengandung senyawa-senyawa kimia sebagai hara makro, hara mikro, vitamin, sumber karbon, asam amino dan N-organik, senyawa organik kompleks (suplement), buffer, arang aktif, zat pengatur tumbuh dan bahan pematat. Respon pertumbuhan eksplan berbeda dalam media

padat atau media cair walaupun menggunakan jenis media yang sama, karena ada perbedaan kelembaban dan ketersediaan nutrisi. *Hyperhidricity* sering terjadi di media cair namun hasil perbanyakannya dan pertumbuhannya lebih cepat. Media cair lebih baik dalam regenerasi, jika menggunakan *temporary immersed system* (TIS). *Temporary immersed system* mempunyai keunggulan dalam penyeragaman dan suplai oksigen, menurunkan dominansi apikal dan menstimulasi tunas samping (Munoz, 2009).

Hvoslef-Eide dan Preil (2005) menyatakan media cair perlu memperhatikan ketersediaan oksigen, media padat lebih banyak digunakan dari pada media cair karena lingkungannya menyerupai kondisi alam, khususnya penyediaan oksigen yang optimal. Menurut Jackson (2005), koefisien difusi gas untuk O₂, ethylene dan CO₂ di dalam air hampir 10000 kali lebih rendah dari pada di udara (di udara 0,201 cm².s⁻¹; di dalam air 2,1x10⁻⁵ cm².s⁻¹). Penelitian tentang penyediaan oksigen dalam bioreaktor menunjukkan bahwa produksi embrio *Daucus* menurun dengan significant jika oksigen terlarut berkurang yaitu 600 embrio somatik per ml pada tingkat oksigen terlarut 100% dan 170 embrio somatik per ml pada tingkat oksigen terlarut 10%. Salmin (2005) menyatakan oksigen berperan dalam proses kimia oksidasi-reduksi. Udara (*atmosphere*) dan hasil fotosintesa merupakan sumber utama oksigen dalam air melalui proses difusi. Oksigen dalam air bisa diukur sebagai oksigen terlarut (*Dissolved Oxygen* = DO) dan kebutuhan oksigen biologis (*Biological Oxygen Demand* = BOD). Dalam keadaan normal kandungan minimal oksigen terlarut adalah 2 ppm untuk mendukung kehidupan organisme.

Menurut Salisbury dan Ross (1991), oksigen penting bagi tanaman, oksigen diperlukan dalam respirasi tanaman. Respirasi diawali oleh proses *glycolisis* yaitu perubahan karbohidrat dalam proses biokimia yang menghasilkan produk asam *piruvat*. Karbohidrat (pati, sukrose ataupun fruktosan) mengalami proses degradasi oleh enzim (*amilase, phosphorylase, invertase, β-fructofuranosidase*) menghasilkan produk *D-glucose, glucose 1-phosphate, D-fructose* oleh masing-masing enzim tersebut, dan degradasi selanjutnya menghasilkan *fructose 6-phosphate*. Degradasi selanjutnya menghasilkan *fructose*

1,6-bisphosphate, 3-phosphoglyceraldehyde, 1,3-biphosphoglyceric acid, 3-phosphoglyceric acid, 2-phophoglyceric acid, phosphoenolpyruvic acid, dan terakhir *pyruvic acid* (asam piruvat). Selanjutnya, asam piruvat masuk ke dalam siklus *Krebs*, dimana asam piruvat mengalami proses oksidasi menghasilkan *acetyl co-A* dan pelepasan CO_2 . *Acetyl co-A* merupakan materi penting sebagai bahan baku asam-asam organik intermediate, antara lain *citric acid, isocitric acid, α -ketoglutaric acid, succinyl Co-A, succinic acid, fumaric acid, L-malic acid,* dan *oxaloacetic acid*. Dalam siklus *Krebs* terjadi perubahan NAD^+ menjadi *NADH* dari pelepasan elektron asam-asam organik intermediate. Pelepasan elektron merupakan konsekuensi proses oksidasi kemudian elektron dimanfaatkan dalam rangkaian transport elektron yang akan menghasilkan ATP.

Suthar *et al*, (2011) menyatakan media menggunakan agarose konsentrasi berbeda-beda memberikan hasil berbeda, dimana agar konsentrasi 0,20 % menghasilkan tunas terbanyak ($24,00 \pm 2,00$ tunas), konsentrasi 0,60 % ($12,50 \pm 3,15$ tunas), konsentrasi 0,40 % ($12,00 \pm 0,89$ tunas), konsentrasi 0,80 % ($11,33 \pm 2,42$ tunas) dan konsentrasi 1 % ($9,00 \pm 1,67$ tunas), hal tersebut sama untuk variabel pengamatan panjang tunas, jumlah daun, berat segar, berat kering dan total chlorophyll pada tanaman obat-obatan *Boswellia serrata* Roxb di India. Media cair (agar 0,00%) memberikan hasil lebih baik pada hampir semua parameter, kecuali jumlah tunas. Pemanfaatan bioreaktor dalam berbagai species merupakan salah satu bagian untuk proses propagasi, khususnya peningkatan kalus embrionik, embrio fase globular dan hati, dan pada fase perkembangan tanaman, kultur dipindahkan ke media padat atau media cair sistem tergenang berkala TIS (Hvoslef-Eide dan Preil, 2005). Pergerakan air tergantung potensial air, dimana arah pergerakan berasal dari potensial air tinggi ke rendah. Nilai potensial air murni adalah 0, keberadaan zat terlarut di dalamnya bisa menurunkan nilai potensial air, sehingga potensial air suatu larutan bernilai negatif (-). Aliran cairan terjadi karena ada perbedaan kondisi 2 daerah dan jika di antara keduanya ada membran pemisah yang bersifat selektif merupakan proses osmose (Bidwell, 1979).

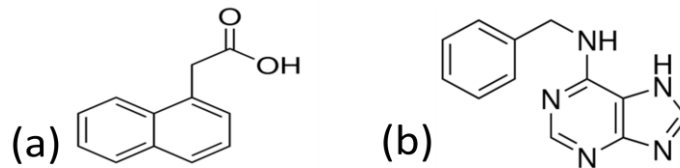
Selain tipe cair dan padat, kultur jaringan menggunakan beberapa jenis media dasar (basal), di antaranya Vacin & Went (VW) dan Murashige & Skoog (MS). Berdasarkan George (1987) media MS mempunyai komposisi senyawa lebih banyak dan konsentrasi lebih tinggi dari VW. Di dalam media MS terdapat senyawa anorganik dan organik, seperti mio inositol, glycine dan senyawa anorganik, serta kandungan sukrose yang lebih banyak dari VW. Media dasar MS mempunyai sukrose (karbohidrat) 30000 mgL⁻¹ dan VW yang hanya 20000 mgL⁻¹ (George, 1987). Park *et. al.* (2002) menyatakan bahwa PLB muncul pada media dengan penambahan sukrose, media tanpa sukrose tidak memunculkan PLB dan kandungan sukrose optimum pada konsentrasi 30 g L⁻¹. Yih Ng. *et. al.*, (2010) menyatakan penggunaan N-organik dari *casein hydrolysate*, *peptone*, dan *tryptone-peptone* menghasilkan multiplikasi tunas lebih banyak dari kontrol. Selain sukrose lebih banyak, media MS mengandung vitamin B1 (*thiamine*) dan *thiamine* membantu di dalam siklus Krebs.

Salisbury dan Ross (1991) menyatakan dalam proses dekarboksilasi asam piruvat menyertakan juga thiamine pyrophosphat untuk menghasilkan acetyl CoA. Beberapa manfaat unsur di dalam tanaman antara lain kekurangan boron berakibat terganggunya pemanjangan sel secara normal di meristem karena bisa menghambat sintesa DNA dan RNA, pembelahan sel di meristem tunas terhambat juga. Kebanyakan bukti kekurangan boron mengalami gangguan pada vascular dan masuknya silikon (Si) ke dinding sel. Seng (Zn) berperan di dalam pembentukan enzim yang esensial dalam fungsinya, dan diduga berperan dalam pembentukan klorofil dan mencegah kerusakannya. Tembaga (Cu) berperan dalam pemberntukan enzim, khususnya dalam proses oksidasi-reduksi, seperti cytochrom oksidase. Molibdenum (Mo) terlibat dalam kegiatan enzim nitrate reductase, yang mengubah ion nitrate menjadi nitrite. Gunawan (1988) menyatakan bahwa *nicotinic acid* merupakan senyawa penting untuk kultur akar tomat, ercis dan lobak, dan *pyridoxine* juga diperlukan dalam kultur akar tomat, serta *mio-inositol* bisa memperbaiki pertumbuhan dan morfogenesis tanaman. *Thiamine* meningkatkan perakaran tanaman kayu *Taxus brevifolia* Peattie hingga 61,5% sementara tanpa thiamine hanya 30% (Abrahamian & Kantharajah, 2011),

thiamine bersama-sama dengan sitokinin berperan di dalam induksi akar dan pertumbuhan kalus, dan *nicotinic acid* diperlukan tanaman untuk sintesa asam amino dan membantu metabolisme karbohidrat (Tomar, 2018). Kombinasi IAA, NAA, IBA dengan CuSO_4 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ bisa meningkatkan 20x perakaran sorgum dibandingkan kontrol pada media MS secara *in vitro* (Liu, *et.al.*, 2013). Senyawa-senyawa kimia di dalam media MS berperan baik dalam pertumbuhan dan morfogenesis tanaman. Mio inositol mempunyai peranan dalam biosintesa asam-D-galakturonat yang menghasilkan vitamin C dan pektin, serta berperan dalam fosfoinositida dan fosfatidil inositol dalam pembelahan sel. Sementara glycine merupakan sumber N organik yang bisa lebih cepat dimanfaatkan dari pada N anorganik (Gunawan, 1988).

2.3 Zat Pengatur Tumbuh Auksin dan Sitokinin

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah relatif sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh dalam tanaman terdapat 5 (lima) kelompok yaitu *auksin*, *gibberellin*, *sitokinin*, *ethylene* dan *inhibitor* dengan ciri khas dan pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis (Abidin, 1983). Pemberian hormon eksogen diperlukan dalam kultur sel atau jaringan (Arditti & Krikorian, 1996). Dua golongan ZPT yang sering digunakan dalam kultur jaringan tumbuhan adalah *auksin* dan *sitokinin*, ZPT ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan dan organ. Interaksi dan perimbangan konsentrasi ZPT di media (eksogen) dan jumlah ZPT endogen menentukan arah perkembangan kultur. Penambahan ZPT dalam media mempengaruhi level hormon endogen yang merupakan triggering factor proses pertumbuhan dan morfogenesis (Gunawan, 1988).



Gambar 2.1. Rumus bangun (a). *Naphtaleneacetic Acid* ($C_{12}H_{10}O_2$), BM. 186,21 dan (b). *Benzylaminopurine* ($C_{12}H_{11}N_5$), BM. 225,26. Sumber : Davies, 1987.

Penelitian Danso *et.al.* (2008) menunjukkan bahwa konsentrasi BAP 5 mgL^{-1} dan NAA 2 mgL^{-1} di media cair menghasilkan 29,3 planlet nanas dan di media padat 7,4 planlet nanas. *Auksin*, misalnya *indoleaceticacid* (IAA), disintesa dari *tryptophan* pada daun primordia dan daun muda, dan biji yang sedang berkembang, dan *auksin* ditransport dari sel ke sel menuju akar. Efek dari *auksin* antara lain pembesaran sel, *auksin* bersama dengan *sitokinin* menyebabkan pembelahan sel, diferensiasi jaringan vascular, menginisiasi akar dan perkembangannya, respon tropistic, dominansi apical (Davies, 1987). Mekanisme kerja auksin dalam mempengaruhi sel melalui pengaturan tekanan osmotik sel sehingga cairan bisa keluar-masuk sel, dimana dinding sel menjadi lebih longgar karena pengasaman akibat pemberian auksin, dijelaskan Majda (2018) bahwa auksin mengaktifkan pompa proton H^+ -ATPase di plasma membran yang memompa proton (H^+) ke dalam matrix dinding sel yang menyebabkan pengasaman. Kondisi asam menyebabkan channel potassium di apoplast aktif dan mengangkut ion K^+ ke sitosol, sehingga terjadi penyerapan air (H_2O) oleh sel dan ada tegangan dari tekanan sel. Kondisi asam mengaktifkan enzim dan protein perenggang dinding sel, yaitu terjadi perenggangan hubungan antar polysakarida. PECTIN METHYLESTERASE (PME) mengaktifkan plasma membran nicotinamide adenine dinucleotid phosphate (NADPH), mengangkut anion superoxide ke dalam dinding sel yang kemudian di konversi menjadi hydrogen peroxide. Enzim dan protein perenggang dinding sel menyebabkan cellulose microfibriles (CMF) berpindah tempat yang meningkatkan porositas dinding sel. Pengembangan dinding sel mengaktifkan channel calcium dan memasukkan calcium ke sitosol dan menghambat pompa proton H^+ -ATPase dan menjadikan

suasana alkaline di dalam protoplas. Sintesa baru polisakarida terjadi di dalam dinding sel. Suasana alkaline mengaktifkan PME yang mengaktifkan enzim degradasi dinding sel dan NADPH menyebabkan pengaitan silang polisakarida dinding sel dan penghentian pertumbuhan.

Golongan *sitokinin* adalah turunan dari *adenin*, golongan ini penting dalam pembelahan sel dan morfogenesis. Sitokinin dalam sel mempunyai peran penting sebagai pemicu sitokinensis, sitokinin mendorong pembelahan sel dengan meningkatkan peralihan G2 ke mitosis dan dalam hal ini sitokinin juga meningkatkan laju sintesa protein. Beberapa protein itu adalah protein pembangun atau enzim yang diperlukan dalam mitosis (Salisbury dan Ross, 1991). Sintesa *sitokinin* ada 2 jalur yaitu (1) hidrolisis tRNA dan (2) sintesa langsung. Sintesa *sitokinin* secara langsung terjadi secara enzimatis dimana terjadi katalisis pembentukan [9R-5'P]iP dari *adenosine-5'-monophosphate* (AMP) dan *isopentenyl pyrophosphate* (iPP). Hidrolisis tRNA menghasilkan *sitokinin* karena ada bagian dari tRNA yang merupakan *sitokinin* yang terikat di dalamnya dalam bentuk basa-basa, seperti *2-methylthio cytokinins*, *cis-[9R]Z*, [9R]iP. Namun, proses oksidasi pada *sitokinin* bisa mengakibatkan kehilangan aktivitasnya, seperti pada proses pembentukan *N-glucosyl* atau *N-alanyl*. Sintesa *sitokinin* kebanyakan terjadi di ujung akar dan biji yang sedang tumbuh, dan transport *sitokinin* ada dalam xylem dari akar ke tajuk. Efek *sitokinin* dalam tumbuhan antara lain bersama-sama *auksin* memproses pembelahan sel dalam jaringan, berperan pada morfogenesis membentuk tunas, perluasan daun, perkembangan kloroplas dan menunda proses daun tua (Davies, 1987). Cardoso & Ono (2011) menyatakan penggunaan *BAP* 1 mg L⁻¹ baik untuk multiplikasi tunas. Sitokinin juga mempendek fase S yaitu dengan cara mengaktifkan DNA, sehingga salinan DNA menjadi 2 kali lebih besar kemudian laju sintesis DNA digandakan. Sitokinin dapat mempengaruhi gen *KNOX* (*Knotted Like Homeobox*). Gen *KNOX* tanaman *Arabidopsis* bekerja di bagian tepi meristem ujung batang organ vegetatif dan menunjukkan pemeliharaan aktivitas meristematis. Ekspresi gen *KNOX* yang terlalu besar menyebabkan aktivitas meristematis terhenti kemudian menginisiasi primordia daun (Lincoln, 1994). Auksin dan sitokinin dalam

konsentrasi rendah terkadang diberikan pada saat inisiasi awal pembentukan protocorm tetapi auksin-sitokinin tidak diperlukan di fase akhir perkembangan protocorm untuk menumbuhkan tunas dan akar. Perbanyak tanaman melalui protocorm atau protocorm like bodies merupakan strategi penting untuk mendapatkan keseragaman genetik dan pengembangan kualitas tanaman (Paek *et. al.*, 2011).

2.4 Pembentukan Embrio Somatik Pada Anggrek *Phalaenopsis* sp

Pembentukan embrio anggrek *Phalaenopsis* sp bisa secara generatif dan vegetatif, pembentukan embrio secara vegetatif salah satunya melalui pembentukan embrio somatik. Perkembangan embrio somatik mirip dengan embrio zigotik. Somatic-embriogenesis merupakan proses sel-sel soma yang berkembang seperti embrio zigotik, secara morfologi tahapan-tahapan dalam embrio somatik sama dengan embrio zigotik (Utami *et. al.*, 2007). Menurut Ajijah (2016), pada proses embrio somatik nutrisi hanya disuplai dari media karena tidak ada hubungan dengan jaringan induk seperti pada embrio zigotik yang masih berhubungan dengan pohonnya. Penambahan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin dan sitokinin ke media diperlukan untuk mendukung pertumbuhan protocorm secara optimal (Ningrum, 2017). Menurut Su *et al.*, (2011) bahwa perkembangan embrio diawali pembentukan sumbu/poros apical-basal, dimana pembentukan poros apical-basal dipengaruhi oleh distribusi auksin oleh protein PINFORMD (PIN) dalam sel. Pada pembentukan embrio somatik anggrek bagian meristematik awalnya hanya terdapat di salah satu ujung saja dan kemudian tumbuh berkembang menjadi tunas, sementara ujung lain menginisiasi akar di waktu kemudian (Fang *et al.*, 2016). Pembentukan tunas kemungkinan lebih banyak ditentukan oleh hormon endogen. Palama *et al.*, (2010) menyatakan hormon eksogen thidiazuron (TDZ) 0,3 mg L⁻¹ tidak sesuai untuk menginduksi diferensiasi tunas tanaman *vanilla planifolia* (*Orchidaceae*). Diferensiasi tunas terjadi pada penghilangan TDZ dan diawali oleh efek modulasi auksin (NAA) pada level sitokinin endogen. Hipotesa level tinggi sitokinin endogen di dalam kalus embrionik tidak bisa disangkal, karena ada perbedaan mencolok setelah

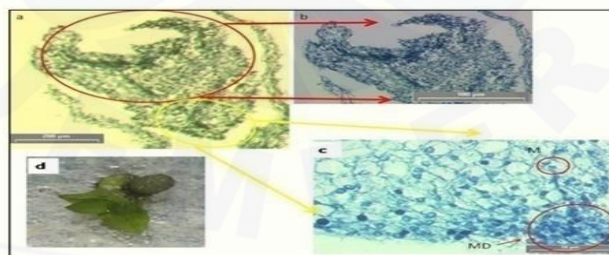
pemindahan kalus tersebut ke media tanpa hormon dan bisa menghasilkan sel berdiferensiasi membentuk tunas. Salisbury dan Ross (1991) menyatakan sitokinin di dalam tumbuhan berada pada kisaran $0,01 - 1 \mu\text{M}$ (BM. 225,3 dikonversi = $0,002253 - 0,2253 \text{ mg L}^{-1}$) dan calcium diperlukan dalam pembentukan lamela tengah sel yang baru membelah diri yang banyak terjadi di meristem, jika kekurangan calcium (*deficiency*) berakibat meristem lebih cepat mati. Pada fase 32 sel, PIN7 terpolarisasi, sehingga berakibat ada transport auksin ke sel suspensor untuk membentuk *hypophysis*, dimana *hypophysis* sebagai bakal embrionik akar (Friml *et al.*, 2003).

Menurut Utami *et al.*, (2007) embrio anggrek bersifat monopolar dan seluruh kecambah berasal dari kutub plumula, bagian basal tidak membentuk meristem perakaran, tetapi muncul akar adventif dan kemunculannya setelah diferensiasi tunas. Perakaran tidak selalu tumbuh pada setiap PLB. Su *et al.*, (2011) menjelaskan tidak terbentuk akar bisa karena tidak ada fungsi dari salah satu protein (*gen*). Setelah pembentukan SAM pada embriogenesis, karena kerja transport polaritas protein PIN7 maka auksin mengalir ke bagian sel-sel suspensor (basal), dan kebanyakan auksin terkumpul di sel-sel bagian atas suspensor sehingga terbentuk *hypophysis* sebagai tempat sel-sel embrionik akar. MONOPTEROS (MP)/ARF5 dan BODENLOS (BDL)/IAA12 merupakan pusat respon auksin selama embriogenesis dalam *Arabidopsis*, MP mengawali pembentukan sel-sel embrionik pada pola axial dengan modulasi TARGET OF MP 5 (TMO5) dan TMO7 dalam merespon signal auksin. Jika kehilangan fungsi MP atau mendapatkan fungsi BDL maka terjadi penyimpangan/gangguan dalam spesifikasi sel-sel apical dan tercegahnya pembentukan sel-sel embrionik perakaran. Jadi, mekanisme transport dan respon auksin diperlukan dalam memantik spesifikasi sel-sel meristem akar. Dalam Su *et.al.* (2011) dinyatakan meristem perakaran dibagi 3 daerah yaitu *proximal meristem* (PM), *elongation differentiation zone* (EDZ), dan *transition zone* (TZ). Interaksi auksin-sitokinin terjadi di zona transisi (TZ) untuk mengatur perkembangan sel ke arah pembelahan (PM) atau pemanjangan (EDZ). ARR1 merupakan protein pengatur signal dari sitokinin, jika ada pemberian sitokinin dari luar maka protein tersebut

mengikat promotor SHY2, SHY2 merupakan bagian dari auksin di jaringan angkut (vascular), sehingga tidak terjadi transkripsi pada SHY2. Akibatnya, tidak terjadi pengaturan di vascular karena kehilangan fungsi SHY2 dan pada akar terjadi penyimpangan berupa pembesaran meristem atau sebaliknya.

2.5 Histologi Pada Pembentukan Embrio Somatik Anggrek

Pengamatan histologi membantu pemahaman dalam mempelajari morfologi tanaman. Pengujian histologi yang baik berdasarkan perubahan histokimia dan anatomi memberikan informasi perubahan organisasi tubuh tanaman dan morfologi secara selular (Yeung, 1999). Pengamatan histologi membantu memilih dan menampilkan suatu kultur yang baik untuk menghasilkan sel kompeten dalam teknik transformasi. Histologi dan sem telah dilakukan untuk mengamati stomata dan trikoma pada plb anggrek *Dendrobium sp* (Julkifle *et al*, 2012), anggrek hibrida *mokara spp* (James Antony *et al*, 2014). Gnasekaran *et al* (2016) melakukan pengamatan histology pada perkembangan embrio bipolar anggrek *Vanda sp* dalam pembentukan meristem pucuk dan akar. Ada 2 type sel berdasarkan ukuran, dimana beberapa baris sel dari tepi luar berukuran kecil berdiameter sama dengan sitoplasma rapat dan inti sel nampak jelas dan besar. Sementara sel di posisi lebih dalam berukuran lebih besar dengan inti sel kecil dan vakuola besar (Gnasekaran *et al.*, 2016; Thorpe and Patel, 1986).



Gambar 2.2 Histologi PLB pada embrio somatik anggrek. Sumber : Gnasekaran *et al*, 2016.

2.6 Analisa Gambar Menggunakan Citra Digital ImageJ

ImageJ merupakan aplikasi perangkat lunak komputer untuk analisa gambar menggunakan sistem digital. Sistem kerja yang digunakan adalah memanfaatkan *dot per inch* (dpi) atau *pixel*. ImageJ dimanfaatkan peneliti antara

lain Ogita dan Sasamoto (2017) untuk analisa kandungan allelopati pada bambu, Adnan *et.al.* (2015) untuk identifikasi varietas padi, Robot *et.al.* (2018) untuk menghitung luas daun *Avicennia marina*, dan peneliti-peneliti di bidang kedokteran, biologi dan lain lain. ImageJ bisa mengukur intensitas warna menggunakan menu red, green, blue (RGB) atau intensitas gelap dan terang gambar menggunakan menu nilai abu-abu (gray value). Warna diukur pada jarak warna dalam X-axis dan intensitasnya dalam Y-ordinat, demikian juga gray value. Score untuk warna dan gray value dimulai dari 0 hingga 255, dimana score kecil (mulai 0) berarti hitam dan score besar (hingga 255) berarti putih untuk gray value atau warna paling lemah dan warna paling kuat untuk warna RGB. Hasil pengukuran warna dengan ImageJ ditampilkan dalam bentuk Histogram, seperti pada Lampiran 2.

2.7. Hipotesis

1. Interaksi 3 faktor tipe media, jenis media dasar dan perbandingan konsentrasi NAA dan BAP berpengaruh pada regenerasi anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembentukan embrio-somatik.
2. Interaksi 2 faktor tipe media dengan jenis media dasar, tipe media dengan perbandingan konsentrasi NAA dan BAP, dan jenis media dasar dengan perbandingan konsentrasi NAA dan BAP berpengaruh pada regenerasi anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembentukan embrio-somatik.
3. Tipe media padat memberikan pengaruh lebih baik dari pada cair pada regenerasi anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembentukan embrio-somatik.
4. Jenis media dasar MS memberikan pengaruh lebih baik dari pada VW pada regenerasi anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembentukan embrio-somatik.
5. Ada perbandingan konsentrasi NAA dan BAP terbaik pada regenerasi anggrek *Phalaenopsis* sp melalui pembentukan embrio-somatik.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Percobaan di dalam penelitian memerlukan waktu selama 6 bulan, dimulai bulan Oktober 2018 hingga April 2019. Percobaan kultur jaringan tanaman di laboratorium Ekofisiologi, Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian dan analisa histologi dilaksanakan di laboratorium Mikroteknik Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan dalam percobaan menggunakan beberapa macam jenis antara lain peralatan sterilisasi, disectan jaringan tanaman, pH-meter, neraca dan ruang inkubasi untuk pertumbuhan kultur jaringan tanaman anggrek. Analisa *histologi* embrio anggrek menggunakan peralatan fiksasi, dehidrasi dan penanaman dalam parafin (blocking), oven, pemotongan menggunakan mikrotom rotari Anjue, pengecatan, dan pengamatan mikroskopi menggunakan mikroskop cahaya merk Leica EZ4HD dan OptiLab. Pengamatan stomata menggunakan Scanning electrone microscope (SEM).

Bahan dalam percobaan menggunakan beberapa macam jenis antara lain bahan kimia untuk media dasar VW, MS, air kelapa, NAA dan BAP, PLB *Phalaenopsis* sp. Bahan-bahan untuk analisa histologi antara lain parafin, xilol, larutan FAA, alkohol, safranin dan fast green.

3.3 Metode percobaan

Rancangan percobaan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap untuk meneliti 3 faktor yang diulang 3 kali. Ketiga faktor tersebut yaitu:

- Faktor pertama yaitu tipe media (M), terdiri dari 2 tarap, masing-masing media padat (M1) dan media cair (M2).
- Faktor kedua yaitu jenis media dasar (J), terdiri dari 2 tarap, masing-masing Vacin dan Went (J1) dan Murashige dan Skoog (J2).

- Faktor ketiga yaitu perbandingan konsentrasi NAA dan BAP (K), terdiri dari 6 taraf, masing-masing yaitu :

NAA 0,1 mg L⁻¹ dan BAP 0,1 mg L⁻¹ (K1),

NAA 0,1 mg L⁻¹ dan BAP 5 mg L⁻¹ (K2),

NAA 0,1 mg L⁻¹ dan BAP 10 mg L⁻¹ (K3),

NAA 1 mg L⁻¹ dan BAP 0,1 mg L⁻¹ (K4),

NAA 1 mg L⁻¹ dan BAP 5 mg L⁻¹ (K5),

NAA 1 mg L⁻¹ dan BAP 10 mg L⁻¹ (K6).

Model persamaan matematika yang digunakan adalah :

$$Y_{mjk} = \mu + M_m + J_j + K_k + (MJ)_{mj} + (MK)_{mk} + (JK)_{jk} + (MJK)_{mjk} + \varepsilon_{mjk}$$

dimana :

Y_{mjk} : nilai pengamatan pada baris ke-i kolom ke-j yang mendapatkan perlakuan ke-t

μ : rata-rata umum populasi

M_m : pengaruh aditif taraf ke-m dari faktor M

J_j : pengaruh aditif taraf ke-j dari faktor J

K_k : pengaruh aditif taraf ke-k dari faktor K

$(MJ)_{mj}$: pengaruh interaksi taraf ke-m faktor M dan taraf ke-j faktor J

$(MK)_{mk}$: pengaruh interaksi taraf ke-m faktor M dan taraf ke-k faktor K

$(JK)_{jk}$: pengaruh interaksi taraf ke-j faktor J dan taraf ke-k faktor K

$(MJK)_{mjk}$: pengaruh interaksi taraf ke-m faktor M dan taraf ke-j faktor J dan taraf ke-k faktor K.

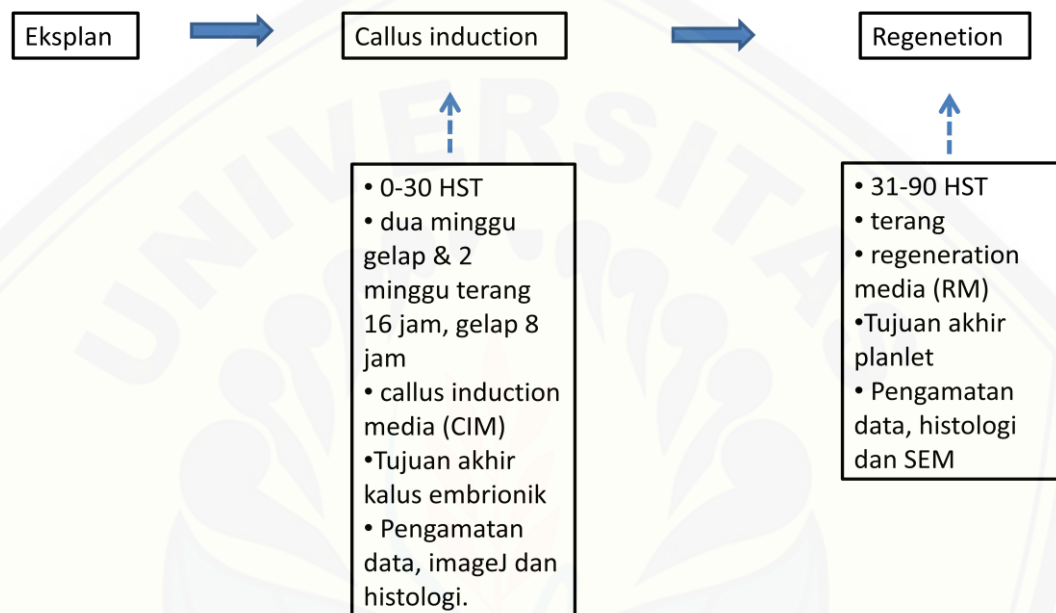
ε_{mjk} : pengaruh galat percobaan pada kelompok ke-l yang memperoleh taraf ke-m faktor M, taraf ke-j faktor J, dan taraf ke-k faktor K.

Analisa data menggunakan sidik ragam (Anova) dan dilanjutkan dengan uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) taraf 0.05 jika terdapat beda nyata.

3.4 Pelaksanaan percobaan.

3.4.1 Alur Percobaan dan Pembuatan media.

Percobaan dalam penelitian dibuat untuk 2 tahapan pertumbuhan yaitu tahapan induksi kalus dan tahapan regenerasi. Adapun alur kegiatan percobaan sebagai berikut :



Gambar 3.1. Alur kegiatan percobaan dalam kultur jaringan pembentukan embrio somatik.

Eksplan berasal dari PLB *Phalaenopsis* sp dipotong pangkal dan ujungnya yang ditanam di media CIM, kemudian perkembangan selanjutnya di sub kultur ke media regenerasi.

Media CIM terdiri dari media dasar VW dan MS, tipe cair dan padat, perlakuan NAA dan BAP sesuai taraf perlakuan, air kelapa 15%, sukrose 3% dan media regenerasi terdiri dari media dasar VW dan MS, tipe padat, tanpa NAA dan BAP, air kelapa 15%, sukrose 3%. Semua media di atur pada pH 5.8, disteril dengan autoclave pada temperatur 121°C selama 20 menit.

3.4.2 *Histologi dan scanning electrone microscope (SEM).*

Proses perkembangan embrio diamati secara mikroskopi, pengamatan bagian dalam jaringan (anatomi) menggunakan mikroskop stereo Leica EZ4 HD dan Optic Lab, sementara pengamatan stomata di permukaan PLB menggunakan SEM. Pengamatan anatomi embrio somatik menggunakan prosedur histologi. Adapun prosedur kerja pada histologi meliputi (1) fiksasi jaringan menggunakan larutan 90% Formalin : 5% Aceticacid : 5% Alkohol (FAA), (2) dehidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertahap mulai dari 70%, 80%, 95% dan 100%, (3) clearing menggunakan campuran alkohol : xilol perbandingan bertahap 3:1, 1:1, dan 1:3, (4) infiltrasi dengan merendam parafin selama 24 jam, (5) pemotongan mikrotom rotary setebal 8-12 μ m, (6) perekatan pita parafin pada deglass (9) pewarnaan menggunakan bahan kimia Safranin atau Fastgreen 1%, (10) mounting menggunakan balsam canada, dan (11) pengamatan mikroskopi.

3.4.3 *Pengukuran Warna Menggunakan ImageJ.*

- a. Mengambil foto kalus menggunakan kamera mikroskop Leica dan disimpan dalam file.
- b. Membuka file foto kalus dengan program aplikasi ImageJ menggunakan menu File, Open dan memilih file foto.
- c. Memberi tanda pada kalus dengan *freehand tools* kemudian menu Analyze, Histogram sehingga muncul hasilnya.

3.4.4 *Variabel Pengamatan*

Pengamatan hasil percobaan di dalam penelitian meliputi variabel-variabel berikut :

1. Kemampuan pembentukan kalus (%). Kemampuan pembentukan kalus berdasarkan nilai perbandingan eksplan yang menghasilkan kalus dengan jumlah eksplan yang ditanam. Waktu pengamatan yaitu pada akhir tahapan media induksi (30 HST).
2. Berat kalus (g). Berat kalus ditimbang di akhir tahapan induksi kalus (30 HST). Sebelum penimbangan, kalus dari media cair ditiriskan terlebih

dahulu di tissue steril dan kalus dari media padat dibersihkan dari semua bahan pematat.

3. Berat PLB (g). Pengamatan berat PLB dilakukan pada akhir tahapan regenerasi dan pengamatan penambahan berat PLB dilakukan setiap periode 15 hari.
4. Jumlah PLB. Pengamatan jumlah PLB dilakukan di akhir tahapan regenerasi yaitu pada 90 HST. Jumlah PLB dihitung berdasarkan rata-rata PLB terbentuk dari setiap eksplan.
5. Jumlah PLB berkecambah. Protocorm like bodies berkecambah ditandai dengan munculnya primordia daun di ujung apical. Pengamatan PLB berkecambah dilakukan pada akhir tahapan regenerasi yaitu 90 HST. Protocorm like bodies berkecambah dihitung dari total PLB berkecambah ditambah PLB berdaun dan planlet dalam perlakuan.
6. Jumlah PLB berdaun. Pengamatan jumlah PLB berdaun dilakukan di akhir tahapan regenerasi yaitu 90 HST. Protocorm like bodies berdaun ditentukan jika PLB sudah mempunyai daun sempurna atau ukuran panjang daun lebih dari 5 mm. Jumlah PLB berdaun dihitung dari PLB yang mempunyai daun sempurna dan planlet dalam perlakuan.
7. Jumlah planlet. Jumlah planlet diamati di akhir tahapan regenerasi yaitu 90 HST. Jumlah planlet ditentukan dari PLB berdaun yang sudah memiliki akar.
8. Perkembangan embrio somatik *Phalaenopsis* sp. Perkembangan embrio somatik diamati secara mikroskopi pada bagian permukaan dan bagian dalam embrio somatik (anatomi) secara histologi.

BAB 5. KESIMPULAN

Berdasarkan pengamatan dan pembahasan dari hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Kombinasi antara tipe media padat, jenis media dasar MS dan perbandingan konsentrasi NAA 1 mg L^{-1} dan BAP $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ menghasilkan PLB terberat yaitu 4,30 g.
2. Kombinasi antara jenis media dasar MS dan perbandingan konsentrasi NAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ dan BAP $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ menghasilkan planlet paling banyak dibandingkan dengan kombinasi lainnya.
3. Media padat memberikan respon lebih baik pada jumlah PLB berkecambah yaitu sebesar 4,56 PLB dari pada media cair sebesar 2,72 PLB.
4. Jenis media dasar MS memberikan respon lebih baik pada PLB berkecambah yaitu 4,75 PLB dan PLB berdaun yaitu 2,56 PLB dari pada jenis media dasar VW yaitu 2,36 PLB dan 1,14 PLB.
5. Perbandingan konsentrasi NAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ dan BAP $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ menghasilkan PLB berkecambah terbanyak yaitu 6,92 PLB dan PLB berdaun terbanyak yaitu 3,83 PLB.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1983. Dasar-dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Abrahamian, P., & Kantharajah, A. 2011. Effect of Vitamins on In Vitro Organogenesis of Plant. *American Journal of Plant Sciences*, 02(05), 669–674. <https://doi.org/10.4236/ajps.2011.25080>
- Adnan, Widiastuti M.L., Wahyuni S. 2015. Identifikasi Varietas Padi Menggunakan Pengolahan Citra Digital dan Analysis Diskriminan. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan. vol.34 no.2.
- Ajjah, N., 2016. Pengaruh Komposisi Media Dasar dan Jenis Eksplan Terhadap Pembentukan Embrio Somatik Kakao. *J. TIDP* 3(3), 127-134.
- Arditti, J., & Krikorian, A. D. 1996. Orchid micropropagation: The path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122(3), 183–241. <https://doi.org/10.1006/bojl.1996.0059>
- Azadeh, N., Kadir, M., Kadzimin, S., & Abdullah, N. 2009. In vitro plant regeneration from protocorms-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (Epidendroideae : Orchidaceae). *The 6th National Biotechnology Congress of Iran*, 10(56), 0–4. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2597>
- Badan Pusat Statistik. 2015. Statistik Tanaman Hias Indonesia.
- Bidwell, R.G.S., 1979. Plant Physiology. MacMillan Publishing Co., Inc. New York., Collier Macmillan Publishers, London.
- Cardoso, J. C., & Ono, E. O. 2011. In vitro growth of *Brassocattleya* orchid hybrid in different concentrations of KNO₃, NH₄ NO₃ and benzylaminopurine. *Horticultura Brasileira*, 29(3), 359–363. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362011000300017>
- Danso, K., Ayeh, K., Oduro, V., Amiteye, S., & Amoatey, H. 2008. Effect of 6-Benzylaminopurine and -Naphthalene Acetic Acid on In vitro Production of MD2 Pineapple Planting Materials. *World Applied Sciences Journal*, 3(4), 614–619.
- Davies. P.J., 1987. Plant Hormone and Their Role in Plant Growth and Development. Martinus Nijhoff Publisher. The Netherlands.
- Fang, S.-C., Chen, J.-C., & Wei, M.-J. 2016. Protocorms and protocorm-like bodies are molecularly distinct from zygotic embryonic tissues. *Plant*

- Physiology*, 171(August), pp.00841.2016.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.00841>
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., ... Jürgens, G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*, 426(6963), 147–153. <https://doi.org/10.1038/nature02085>
- Gandawidjaya. 1980. Bunga Anggrek. Permata Belantara Indonesia. Bandung : Sumur Bandung.
- George, E.F., Puttock, D.J.M., George, H.J., 1987. Plant Culture Media. Volume 1. Formulations and Uses. Exegetic Limited, Edington, Westbury, England.
- Gnasekaran, P., Mahmood, M., & Subramaniam, S. 2016. Ultrastructure study of Vanda Kasem's Delight Orchid's Protocorm Like Body, Horticulture Brasileira 34 : 333–339. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362016003005>
- Gomez. K/A & Gomez. A.A., 2010. Prosedur Statistik Untuk Penelitian Pertanian. UI Penerbit Universitas Indonesia. UI Press. Jakarta.
- Gunawan. L.W., 1988. Teknik Kultur Jaringan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hvoslef-Eide, A., & Preil, W. 2005. Liquid culture systems for in vitro plant propagation. *Springer*, 588. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jackson, M. B. 2005. Aeration stress in plant tissue cultures. *Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation*, 459–473. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5-35>
- James Antony, J. J., Sundarasekar, J., Rathinam, X., Marimuthu, K., & Subramaniam, S. 2014. Microscopical analysis of in vitro mokara broga giant orchid's PLBs. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(1), 73–81. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i1.17447>
- Julkifle, A. L., Poobathy, R., Samian, R., & Subramaniam, S. 2012. Histological analyses of PLBs of Dendrobium sonia-28 in the recognition of cell competence for regeneration and Agrobacterium infection. *Plant OMICS*, 5(6), 514–517.
- Lincoln, C. 1994. A knotted1-like Homeobox Gene in Arabidopsis Is Expressed in the Vegetative Meristem and Dramatically Alters Leaf Morphology When Overexpressed in Transgenic Plants. *The Plant Cell Online*, 6(12), 1859–1876. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.12.1859>
- Liu. G., Gilding. E.K., Godwin I.D., 2013. Additive Effects of Three Auxin and Copper On Sorghum In Vitro Root Induction. *In Vitro Cell. Dev.Biol. Plant*

(2013) 49:191-197.

Majda, M. 2018. The Role of Auxin in Cell Wall Expansion. <https://doi.org/10.3390/ijms19040951>

Mathur. A, Mathur.A.K., Verma P., Yadav. S., Gupta M.L., Darokar M.P., 2008. Biological Hardening and Genetic Fidelity Testing of Micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivillianum* Sant.et Fernand. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 7(8), pp 1046-1053.

Mbiyu, M., Muthoni, J., Kabira, J., Muchira, C., Pwaipwai, P., Ngaruiya, J., ... Otieno, S. 2012. Comparing Liquid and Solid Media on the Growth of Plantlets from Three Kenyan Potato Cultivars. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(21), 81–89.

Meilasari, D., & Iriawati, I. 2016. Regeneration of Plantlets Through PLB (Protocorm-Like Body) Formation in *Phalaenopsis* 'Join Angle X Sogo Musadian.' *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 48(3), 204–212. <https://doi.org/10.5614/j.math.fund.sci.2016.48.3.2>

Muñoz, M., Seemann, P., Jara, G., & Riegel, R. 2009. Influence of vessel type, physical state of medium and temporary immersion on the micropropagation of three *Rhodophiala* species. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(4), 581–587. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392009000400014>

Ningrum. E.F.C., Rosyidi. I.N., Puspasari. R.R., Semiarti. E., 2017. Perkembangan Awal Protocorm Anggrek *Phalaenopsis amabilis* secara In Vitro setelah Penambahan Zat Pengatur Tumbuh α -Naphthaleneacetic Acid. *Biosfera* vol 34, no,1 Januari 2017 : 9-14.

Ogita S. and Sasamoto H., 2017. In Vitro Bioassay of Allelopathy in Four Bamboo Species; *Bambusa multiplex*, *Phyllostachys bambusoides*, *P. nigra*, *Sasa kurilensis*, Using Sandwich Method and Protoplast Co-Culture Method with Digital Image Analysis. *American Journal of Plant Sciences*, 2017, 8, 1699-1710.

Paek. K.Y., Hann.E.J., Park S.Y. 2011 dalam Thorpe. T.A dan Yeung E.C. 2011. *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*. vol. 710.

Palama, T. L., Menard, P., Fock, I., Choi, Y. H., Bourdon, E., Govinden-Soulange, J., ... Kodja, H. 2010. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology*, 10, 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-82>

- Park, S., Murthy, H. N., & Paek, K. 2002. RAPID PROPAGATION OF PHALAENOPSIS FROM FLORAL STALK-DERIVED LEAVES, (April), 168–172. <https://doi.org/10.1079/IVP2001274>
- Puspita, C., Sudiarmo dan Wardiyati, T., 2011. Pengaruh Benzyl Adenin dan Media Dasar Pada Perbanyakan Embrio Anggrek Secara In Vitro. *Buana Sains* Vol 11 no 1 : 1-6.
- Rahayu.E.M.D.,. (2015). Konservasi anggrek bulan (*Phalaenopsis* spp .) di Pusat Konservasi, *1*, 1847–1850. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010816>
- Raynalta, E dan Sukma, D. 2013. Pengaruh Komposisi Media dalam Perbanyakan Protocorm Like Bodies, Pertumbuhan Planlet, dan Aklimatisasi *Phalaenopsis amabilis*. *J.Hort. Indonesia* 4(3):131-139.
- Robot R., Sangan J.R.R., Toloh B.H., 2018. Visualisasi Data Digital Morfometrik Daun *Avicennia marina* Di Perairan Pantai Tongkaina Dan Bintauna. *Jurnal Ilmiah Platax*. vol.6(1) Januari 2018.
- Salisbury and Ross 1991 *Plant Physiology*. 4th edition. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.
- Salmin. 2005. Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) Sebagai Salah Satu Indikator Untuk Menentukan Kualitas Perairan. *Oseana*, Vol.XXX, no.3, 2005:21-26.
- Silva, P. A. K. X. D. M., Callegari-Jacques, S., & Bodanese-Zanettini, M. H. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (orchidaceae) by in vitro techniques. *Ciência Rural*, 30(1), 105–111. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100017>
- So Young, P., Murthy, H. N., & Kee Yoeup, P. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(1), 67–72. <https://doi.org/10.1023/A:1006420116883>
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. 2011. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Suthar, R. K., Habibi, N., & Purohit, S. D. 2011. Influence of agar concentration and liquid medium on in vitro propagation of *Boswellia serrata* Roxb. *Indian Journal of Biotechnology*, 10(2), 224–227.
- Thorpe, T. A., & Patel, K. R. 1986. Comparative morpho-histological studies on the sites of shoot initiation in various conifer explants. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 16(3), 257–268.

- Tjokrokusumo, O. D. S. (2004). Konservasi Plasma Nutfah Secara *In Vitro*. *Tek. Lingkungan P3TL-BPPT*, 5(2), 140–143.
- Tomar, R. S. 2018. Role of Vitamins in Plant Growth and their Impact on Regeneration of Plants under *In Vitro* Condition. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, 6(3), 423–426. <https://doi.org/10.22214/ijraset.2018.3068>
- Utami, E.S.W., Soemardi I., Taryono, Semiarti E. 2007. Embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L .) B1: struktur dan pola perkembangan EMBRIOGENESIS SOMATIK ANGGREK BULAN *Phalaenopsis amabilis* (L .) B1: STRUKTUR DAN POLA PERKEMBANGAN, (June). <https://doi.org/10.23869/bphjbr.13.1.20075>
- Winarto. B. 2012. Inovasi Teknologi Perbanyak *In Vitro* dan Kultur Meristem Mendukung Tersedianya Bibit Bermutu Anggrek Secara Berkelanjutan. Prosiding Seminar Nasional Anggrek 2012.
- Yeung, E. C. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems—Some practical comments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(2), 137–143. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0023-z>
- Yih Ng. C., Saleh N.M., Zaman F.Q., 2010. *In Vitro* Multiplication of The Rare and Endangered Slipper Orchid, *Pahiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology*. Vol.9(14), pp.2065-2068.
- Zhao, P., Wu, F., Feng, F. S., & Wang, W. J. 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(3), 178–185. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9101-2>

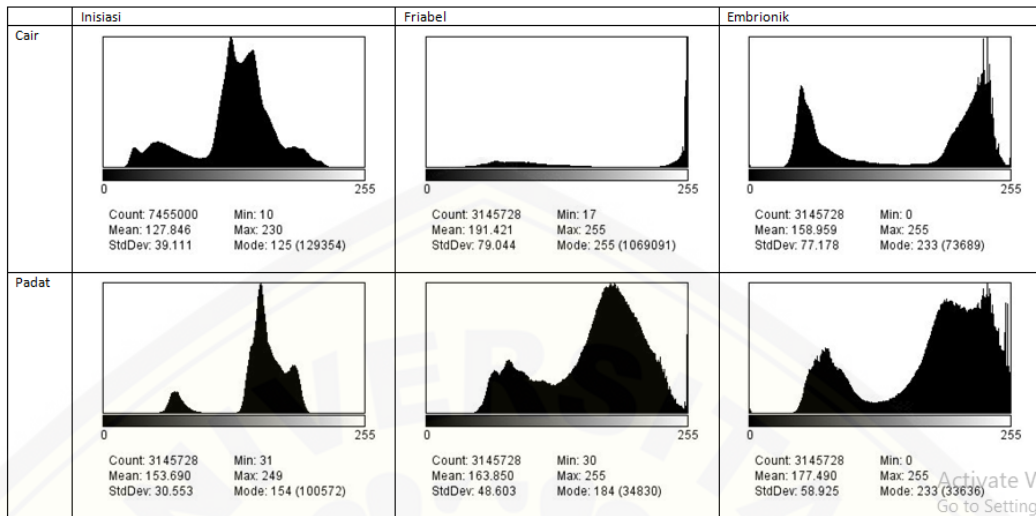
Lampiran 1. Komposisi senyawa kimia menurut jenis media dasar.

Senyawa kimia	Vacin & Went (VW)	Murashige & Skoog (MS)
<u>Makro :</u>	mg/L	mg/L
KNO ₃	525	1900
NH ₄ NO ₃	-	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	370
KH ₂ PO ₄	250	170
(NH ₄) ₂ SO ₄	500	-
<u>Mikro :</u>	µg/L	µg/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	7500	22300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	8600
H ₃ BO ₃	-	6200
KI	-	830
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	250
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	25
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	27850
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	-	37250
Ferric Tartrate	28000	-
<u>Vitamin :</u>	µg/L	µg/L
Thiamine-HCl	-	100
Nicotinic acid	-	500
Pyridoxine-HCl	-	500
Inositol	-	100 mg/L
Glycine	-	25,043 µM
Sucrose	20000 mg/L	30000 mg/L

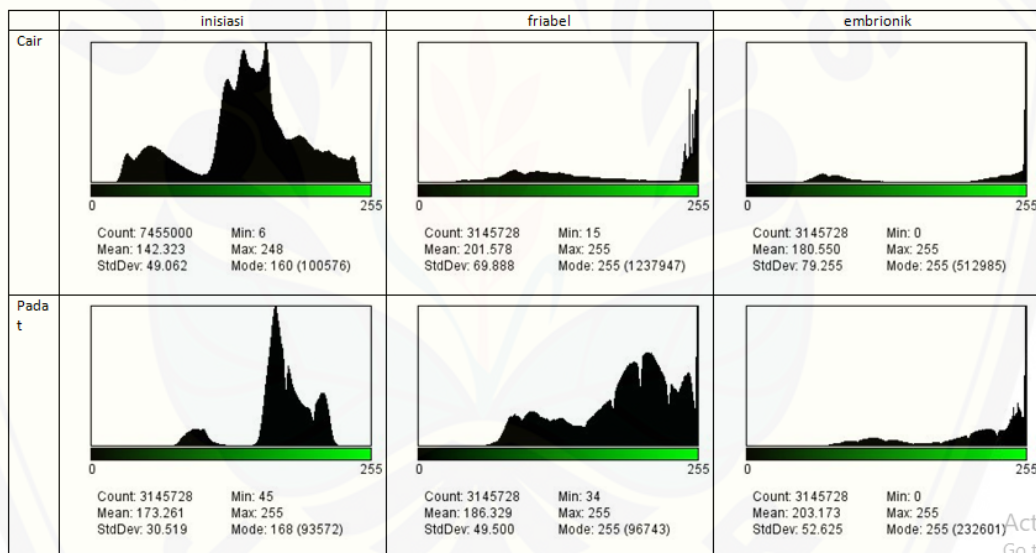
Sumber : George. E.F., *et. al.*, 1987; Gunawan, L.W., 1988.

Lampiran 2. Histogram analisa warna kalus dengan ImageJ

Nilai abu-abu



Nilai warna



Lampiran 3. Analisa data berat plb.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
M1J1K1	14,24	0,61	0,5	1,71	0,570
M1J1K2	0,5	0,49	0,52	1,51	0,503
M1J1K3	0,63	0,8	0,45	1,88	0,627
M1J1K4	2,05	1,74	2,56	6,35	2,117
M1J1K5	0,5	0,56	0,34	1,4	0,467
M1J1K6	0,35	0,4	0,25	1	0,333
M1J2K1	2,65	3,24	2,01	7,9	2,633
M1J2K2	4,1	3,88	3,85	11,83	3,943
M1J2K3	1,5	1,66	1,31	4,47	1,490
M1J2K4	4,5	3,57	4,84	12,91	4,303
M1J2K5	2,2	2,32	2,05	6,57	2,190
M1J2K6	2,1	2,02	1,75	5,87	1,957
M2J1K1	1,51	1,05	1,11	3,67	1,223
M2J1K2	2,1	2,3	1,7	6,1	2,033
M2J1K3	1,9	2,09	2,2	6,19	2,063
M2J1K4	2,05	2,13	2,2	6,38	2,127
M2J1K5	2,01	2,1	1,53	5,64	1,880
M2J1K6	1,7	1,65	1,7	5,05	1,683
M2J2K1	3,21	3,13	2,8	9,14	3,047
M2J2K2	2,5	2,4	2,2	7,1	2,367
M2J2K3	2,51	2,35	2,45	7,31	2,437
M2J2K4	1,1	0,57	0,74	2,41	0,803
M2J2K5	2,1	2,34	2,53	6,97	2,323
M2J2K6	1,19	0,92	1,41	3,52	1,173
Jumlah	45,56	44,32	43	132,88	44,2933

Tabel sidik ragam.

Sidik Ragam	db	JK	KT	f-hit	Notasi	F Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	23	74,705	3,2480	46,596	**	1,757	2,219
M	1	2,99259	2,9926	42,931	**	4,043	7,194
J	1	21,2552	21,2552	304,922	**	4,043	7,194
K	5	6,55099	1,3102	18,796	**	2,409	3,425
M x J	1	8,1664	8,1664	117,153	**	4,043	7,194
J x K	5	11,5423	2,3085	33,117	**	2,409	3,425
M x K	5	15,6528	3,1306	44,910	**	2,409	3,425
M x J x K	5	8,5448	1,7090	24,516	**	2,409	3,425
Galat	48	3,3459	0,0697				
Total	71	78,0510	1,0993				
FK	245,237						
KK (%)	0,60						

Tabel uji lanjut DMRT

		M1J2K4	M1J2K2	M2J2K1	M1J2K1	M2J2K3	M2J2K2	M2J2K5
		4,30333	3,94333	3,04667	2,63333	2,43667	2,36667	2,32333
M1J2K4	4,30333	0						
M1J2K2	3,94333	0,36	0					
M2J2K1	3,04667	1,25667	0,89667	0				
M1J2K1	2,63333	1,67	1,31	0,41333	0			
M2J2K3	2,43667	1,86667	1,50667	0,61	0,19667	0		
M2J2K2	2,36667	1,93667	1,57667	0,68	0,26667	0,07	0	
M2J2K5	2,32333	1,98	1,62	0,72333	0,31	0,11333	0,04333	0
M1J2K5	2,19	2,11333	1,75333	0,85667	0,44333	0,24667	0,17667	0,13333
M2J1K4	2,12667	2,17667	1,81667	0,92	0,50667	0,31	0,24	0,19667
M1J1K4	2,11667	2,18667	1,82667	0,93	0,51667	0,32	0,25	0,20667
M2J1K3	2,06333	2,24	1,88	0,98333	0,57	0,37333	0,30333	0,26
M2J1K2	2,03333	2,27	1,91	1,01333	0,6	0,40333	0,33333	0,29
M1J2K6	1,95667	2,34667	1,98667	1,09	0,67667	0,48	0,41	0,36667
M2J1K5	1,88	2,42333	2,06333	1,16667	0,75333	0,55667	0,48667	0,44333
M2J1K6	1,68333	2,62	2,26	1,36333	0,95	0,75333	0,68333	0,64
M1J2K3	1,49	2,81333	2,45333	1,55667	1,14333	0,94667	0,87667	0,83333
M2J1K1	1,22333	3,08	2,72	1,82333	1,41	1,21333	1,14333	1,1
M2J2K6	1,17333	3,13	2,77	1,87333	1,46	1,26333	1,19333	1,15
M2J2K4	0,80333	3,5	3,14	2,24333	1,83	1,63333	1,56333	1,52
M1J1K3	0,62667	3,67667	3,31667	2,42	2,00667	1,81	1,74	1,69667
M1J1K1	0,57	3,73333	3,37333	2,47667	2,06333	1,86667	1,79667	1,75333
M1J1K2	0,50333	3,8	3,44	2,54333	2,13	1,93333	1,86333	1,82
M1J1K5	0,46667	3,83667	3,47667	2,58	2,16667	1,97	1,9	1,85667
M1J1K6	0,33333	3,97	3,61	2,71333	2,3	2,10333	2,03333	1,99

M1J2K5	M2J1K4	M1J1K4	M2J1K3	M2J1K2	M1J2K6	M2J1K5	M2J1K6	M1J2K3
2,19	2,12667	2,11667	2,06333	2,03333	1,95667	1,88	1,68333	1,49
0								
0,06333	0							
0,07333	0,01	0						
0,12667	0,06333	0,05333	0					
0,15667	0,09333	0,08333	0,03	0				
0,23333	0,17	0,16	0,10667	0,07667	0			
0,31	0,24667	0,23667	0,18333	0,15333	0,07667	0		
0,50667	0,44333	0,43333	0,38	0,35	0,27333	0,19667	0	
0,7	0,63667	0,62667	0,57333	0,54333	0,46667	0,39	0,19333	0
0,96667	0,90333	0,89333	0,84	0,81	0,73333	0,65667	0,46	0,26667
1,01667	0,95333	0,94333	0,89	0,86	0,78333	0,70667	0,51	0,31667
1,38667	1,32333	1,31333	1,26	1,23	1,15333	1,07667	0,88	0,68667
1,56333	1,5	1,49	1,43667	1,40667	1,33	1,25333	1,05667	0,86333
1,62	1,55667	1,54667	1,49333	1,46333	1,38667	1,31	1,11333	0,92
1,68667	1,62333	1,61333	1,56	1,53	1,45333	1,37667	1,18	0,98667
1,72333	1,66	1,65	1,59667	1,56667	1,49	1,41333	1,21667	1,02333
1,85667	1,79333	1,78333	1,73	1,7	1,62333	1,54667	1,35	1,15667

M2J1K1	M2J2K6	M2J2K4	M1J1K3	M1J1K1	M1J1K2	M1J1K5	M1J1K6	Notasi
1,22333	1,17333	0,80333	0,62667	0,57	0,50333	0,46667	0,33333	
								a
								a
								b
								bc
								cd
								cde
								cde
								cdef
								cdef
								cdef
								def
								def
								defg
								efg
								fgh
								gh
0								hi
0,05	0							hi
0,42	0,37	0						ij
0,59667	0,54667	0,17667	0					j
0,65333	0,60333	0,23333	0,05667	0				j
0,72	0,67	0,3	0,12333	0,06667	0			j
0,75667	0,70667	0,33667	0,16	0,10333	0,03667	0		j
0,89	0,84	0,47	0,29333	0,23667	0,17	0,13333	0	j

Lampiran 4. Analisa data kemampuan pembentukan kalus.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
M1J1K1	100	100	100	300	100,000
M1J1K2	100	100	100	300	100,000
M1J1K3	100	85	100	285	95,000
M1J1K4	100	100	100	300	100,000
M1J1K5	85	100	100	285	95,000
M1J1K6	100	100	100	300	100,000
M1J2K1	100	100	100	300	100,000
M1J2K2	100	100	100	300	100,000
M1J2K3	100	100	100	300	100,000
M1J2K4	100	100	100	300	100,000
M1J2K5	100	100	100	300	100,000
M1J2K6	100	100	100	300	100,000
M2J1K1	100	100	100	300	100,000
M2J1K2	100	100	100	300	100,000
M2J1K3	100	100	100	300	100,000
M2J1K4	85	100	100	285	95,000
M2J1K5	100	100	100	300	100,000
M2J1K6	100	100	100	300	100,000
M2J2K1	100	100	100	300	100,000
M2J2K2	90	90	90	270	90,000
M2J2K3	100	100	85	285	95,000
M2J2K4	100	100	100	300	100,000
M2J2K5	95	95	95	285	95,000
M2J2K6	85	85	100	270	90,000
Jumlah	2340	2355	2370	7065	2355

Analisis sidik ragam.

Sidik Ragam	db	JK	KT	f-hit	Notasi	F Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	23	721,875	31,3859	2,009	*	1,757	2,219
M	1	78,125	78,1250	5,000	*	4,043	7,194
J	1	28,125	28,1250	1,800	NS	4,043	7,194
K	5	65,625	13,1250	0,840	NS	2,409	3,425
M x J	1	153,1250	153,1250	9,800	**	4,043	7,194
J x K	5	140,6250	28,1250	1,800	NS	2,409	3,425
M x K	5	90,6250	18,1250	1,160	NS	2,409	3,425
M x J x K	5	165,6250	33,1250	2,120	NS	2,409	3,425
Galat	48	750,0000	15,6250				
Total	71	1471,8750	20,7306				
FK	693253,125						
KK (%)	0,17						

Tabel uji lanjut DMRT.

		M1J2	M2J1	M1J1	M2J2	Notasi
		100	99,1667	98,3333	95	
M1J2	100	0				a
M2J1	99,1666667	0,833333	0			a
M1J1	98,3333333	1,666667	0,83333	0		ab
M2J2	95	5	4,16667	3,33333	0	b

Lampiran 5. Analisa data perkecambahan PLB.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
M1J1K1	2	2	14	18	6,000
M1J1K2	4	9	3	16	5,333
M1J1K3	4	3	1	8	2,667
M1J1K4	1	3	4	8	2,667
M1J1K5	3	2	1	6	2,000
M1J1K6	0	1	0	1	0,333
M1J2K1	15	14	6	35	11,667
M1J2K2	8	11	11	30	10,000
M1J2K3	5	4	1	10	3,333
M1J2K4	6	4	4	14	4,667
M1J2K5	5	3	1	9	3,000
M1J2K6	3	0	0	3	1,000
M2J1K1	2	2	1	5	1,667
M2J1K2	4	4	3	11	3,667
M2J1K3	0	0	0	0	0,000
M2J1K4	3	3	1	7	2,333
M2J1K5	1	4	0	5	1,667
M2J1K6	0	0	0	0	0,000
M2J2K1	20	5	0	25	8,333
M2J2K2	3	0	7	10	3,333
M2J2K3	5	2	4	11	3,667
M2J2K4	2	3	0	5	1,667
M2J2K5	6	5	2	13	4,333
M2J2K6	3	1	2	6	2,000
Jumlah	105	85	66	256	85,3333

Tabel sidik ragam.

Sidik Ragam	db	JK	KT	f-hit	Notasi	F Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	23	607,1111	26,3961	2,625	**	1,757	2,219
M	1	50	50,0000	4,972	*	4,043	7,194
J	1	102,7222	102,7222	10,215	**	4,043	7,194
K	5	303,4444	60,6889	6,035	**	2,409	3,425
M x J	1	0,0556	0,0556	0,006	NS	4,043	7,194
J x K	5	56,2778	11,2556	1,119	NS	2,409	3,425
M x K	5	59,6667	11,9333	1,187	NS	2,409	3,425
M x J x K	5	34,9444	6,9889	0,695	NS	2,409	3,425
Galat	48	482,6667	10,0556				
Total	71	1089,7778	15,3490				
FK		910,222					
KK (%)		3,72					

Tabel uji lanjut DMRT faktor tunggal perbandingan konsentrasi NAA:BAP.

		K1	K2	K4	K5	K3	K6	Notasi
		6,916667	5,583333	2,833333	2,75	2,416667	0,833333	
K1	6,91667	0						a
K2	5,58333	1,333333	0					ab
K4	2,83333	4,083333	2,75	0				bc
K5	2,75	4,166667	2,833333	0,08333	0			bc
K3	2,41667	4,5	3,166667	0,41667	0,33333	0		c
K6	0,83333	6,083333	4,75	2	1,91667	1,58333	0	c

Tabel uji lanjut DMRT faktor tunggal jenis media dasar.

		J2	J1	Notasi
		4,75	2,361111	
J2	4,75	0		a
J1	2,36111	2,388889	0	b

Tabel uji lanjut DMRT faktor tunggal tipe media.

		M1	M2	Notasi
		4,388889	2,722222	
M1	4,38889	0		a
M2	2,72222	1,666667	0	b

