

JURNAL METAMORFOSA

Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<https://ejournal3.unud.ac.id/index.php/metamorfosa/>

Repetitif Embriogenesis Somatik *Dendrobium* sp. pada Teknik Media Kultur Padat, *Thin-film*, dan *Double-layer* secara In-Vitro

Repetitive Embryogenesis Somatic *Dendrobium* sp. on Solid, *Thin-film*, and Double-layer Culture Media Techniques In-Vitro

Thiya Fathiyatul Fauziyah^{1*}, Tintrim Rahayu¹, Gatra Ervi Jayanti¹, Dita Agisimanto²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam Universitas Islam Malang, Jl. Mayjen Hayono, Lowokwaru, Malang ²Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)

*Email: thiya.fauziyah@gmail.com

INTISARI

Dendrobium sp. merupakan salah satu jenis anggrek yang banyak dibudidayakan di Indonesia sebagai tanaman hias pot dan bunga potong. Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan secara *in vitro* yang mampu menghasilkan tanaman dalam jumlah banyak dengan waktu lebih singkat. Teknik media yang digunakan dalam kultur jaringan dapat mempengaruhi perkembangan eksplan. *Protocorm like bodies* (PLB) merupakan embrio somatik anggrek yang memiliki sel-sel embrionik, sehingga mampu menghasilkan embrio somatik baru. Tujuan penelitian yaitu menganalisis bagaimana perkembangan PLB *Dendrobium* sp. pada teknik media padat, *thin liquid film* dan *double-layer*. Penelitian menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan empat kali pengulangan. Analisis data menggunakan uji perbandingan secara univariat, Bonferroni dan Games-Howell. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada teknik media *thin liquid film* memiliki waktu muncul embrio somatik baru tercepat pada 14 HST, rerata pertambahan berat tertinggi 1621 mg, variasi warna embrio terbanyak Kuning-Hijau 150A, Kuning-Hijau 144C, dan Kuning-Hijau 144B dan variasi warna daun terbanyak Hijau-141B, Hijau-143A, Kuning-Hijau N144C dan Kuning-Hijau 144B dibandingkan dengan teknik media *double-layer* dan padat. Namun teknik media padat, *thin liquid film* dan *double layer* tidak berpengaruh signifikan terhadap waktu muncul akar pertama dengan rerata 17 HST, 25 HST, dan 22 HST, tunas pertama dengan rerata 36 HST, 42 HST, dan 48 HST, dan panjang akar dengan nilai rerata 5,6 cm, 6,75 cm dan 10,5 cm.

Kata kunci: Repetitif embriogenesis, *Thin liquid film*, *Double-layer*, *In-vitro*, PLB

ABSTRACT

Dendrobium sp. another type of orchid is widely cultivated in Indonesia as a potted plant and cut flower. In Indonesia the floriculture industry is struggling with crop production, as conventional multiplication may take a long time, so it is unable to meet market demand. Tissue culture is an *in vitro* multiplicity technique capable of producing plants in short supply. Media techniques used in tissue cultures can influence the development of explant. *Protocorm like bodies* (PLB) is a somatic orchid that has embryonic cells, thus capable of producing a new somatic embryo. The aim of the research was to analyze how the PLB *Dendrobium* sp. developed on dense media engineering, *thin liquid film* and *double-layer*. The research uses experimental methods with a complete random design (RAL) with three treatments and four times repetition. Data analysis uses mixed comparisons, Bonferroni and Games-Howell. Research shows that the *thin liquid film*'s media technique has the fastest new somatic embryo on HST, the average increase in weight 367%, the most embryonic color variations Yellow-Green 150A, Yellow-Green 144C, and Yellow-Green 144B and the most leaf color variations Green-141B, Green-143A, Yellow-Green N144c and Yellow-Green 144B compared to the *double-layer*, compact media. But dense media techniques, *thin liquid film* and *double layer* do not affect time showing first roots with ranges of 17 HST, 25 HST, and 22 HST, first shoots with RHST 36 HST, 42 HST, and 48 HST, and root length with weeds 5.6 cm, 6.75 cm and 10.5 cm.

Keywords: Repetitive embryogenesis, *Thin liquid film*, *Double-layer*, *In-vitro*, PLB

PENDAHULUAN

Anggrek *Dendrobium* sp. banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias pot dan bunga potong (Rahayu dkk., 2023). Peningkatan permintaan konsumen membutuhkan perbanyakannya secara massal dengan waktu yang lebih singkat (Rahmah dkk., 2018). Saat ini teknik perbanyakannya terbaik untuk anggrek melalui kultur jaringan (Santoso dkk., 2020). Kultur jaringan dapat dilakukan dengan menggunakan eksplan yang tepat, diantaranya yaitu *Protocorm Like Bodies* (PLB) yang merupakan suatu struktur berupa bulatan-bulatan yang terbentuk dari jaringan eksplan dan atau kalus *in vitro* (Wijayani dkk., 2007). Repetitif embriogenesis somatik disebut dengan embriogenesis somatik sekunder yang merupakan proses terbentuknya embrio somatik baru yang berasal dari embrio somatik (Raemakers, 1995). Pada embriogenesis somatik pertumbuhan sel disebabkan oleh pembelahan sel yang terus menerus bukan disebabkan karena pertambahan ukuran sel. Sel-sel yang berada pada jaringan PLB *Dendrobium* sp. merupakan sel-sel *Pre-Embryogenic Determined Cells* (PEDC) sehingga tidak terlalu sulit untuk menghasilkan embrio somatik.

Media menjadi salah satu faktor berhasilnya kultur *in-vitro*, dimana media merupakan tempat jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mendukung kehidupan jaringan. Ada dua penggolongan media tumbuh: media padat dan media cair. Media cair adalah nutrisi yang dilarutkan di air (Mahmoud dan Kosar, 2013). Penggunaan media cair memiliki resiko eksplan terendam dan mati karena kekurangan oksigen atau hiperhidrasi (Chimdessa, 2020).

Teknik media *thin-film* merupakan penggunaan media cair dengan sistem mencelupkan sementara eksplan kedalam media cair (Etienne dan Berthouly, 2002). Pada penelitian Adelberg (2005) menunjukkan bahwa penggunaan teknik media *thin-film* dapat meningkatkan multiplikasi pada tanaman *Hosta* sp. Mikropropagasi tanaman *Hosta* sp. pada media MS cair memiliki berat basah yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman *Hosta* sp. yang ditanam pada media MS padat. Jenis media *double-layer* merupakan penggunaan dua media yaitu media cair dan media padat secara bersamaan (Demirkaya dan Çömlükçioğlu, 2021). Jenis media *double-layer* memiliki komposisi yang sama antara media cair maupun media padat yang digunakan (Demirkaya dan Çömlükçioğlu, 2021). Tujuan penelitian untuk menganalisis pertumbuhan dan perkembangan PLB *Dendrobium* sp. pada berbagai teknik media padat, *thin-film*, dan *double layer*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2022 sampai Januari 2023. Bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan PT Java Indo Arjuna, Kreweh, Singosari, Kabupaten Malang, Jawa Timur.

Metode

Pembuatan Media Pra-Perlakuan media Murashige and Skoog (MS) cair yang diberi zat pengatur tumbuh thidiazuron (TDZ). TDZ 3 mg dicampur dengan 100 mL MS cair, lalu larutan diukur pH sampai 5,8. Pembuatan Media Adaptasi: Pada media adaptasi bahan yang dibutukan antara lain, 4,43 g/L MS diperkaya dengan vitamin, 100 mg/L myo-inositol, 100 mL coco-water, 30 g/L gula, 0,25 mg/L BAP dan 0,25 mg/L NAA, 25 mg/L peptone, 25 mg/L methionine, 12 g agar dengan pH larutan 5,8.

Media perlakuan: MS instan dengan penambahan zat pengatur tumbuh 6- Benzil Amino-Purine (BAP) dan Naftalen Acetic Acid (NAA). Komposisi media yang digunakan antara lain, 4,43 g/L MS, 100 mg/L myo-inositol, 0,5 mg/L 6 BAP, 0,5 mg/L NAA, 100 mL/L air kelapa, 30 g/L gula, 25 mg/L peptone, dan 25 mg/L methionine. Pembuatan media MS padat komposisi media ditambahkan agar sebanyak 10 g/L dengan pH larutan sampai 5,8. Pembuatan media padat diberikan agar 12 g/L.

Sterilisasi Alat dan Media: Sterilisasi alat-alat yang digunakan dalam kultur jaringan dilakukan dengan mencuci bersih semua alat yang dibutuhkan menggunakan detergen dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Kemudian alat-alat tanam seperti gunting, pinset, skapel, *petridish* dibungkus

menggunakan plastik wrap dan dilapisi dengan plastik tahan panas. Alat-alat tanam dan media kultur disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm dengan suhu 121°C.

Eksplan ditanam pada media pra-perlakuan: PLB dimasukan ke dalam, diyakinkan agar seluruh PLB menyentuh seluruh dasar *thinwall*. Lalu tambahkan TDZ sebanyak 2 mL menggunakan mikropipet. Beri jeda 5 menit masing-masing *thinwall*. Setelah itu PLB yang sudah terendam TDZ di letakkan di shaker selama 5 menit. PLB direndam pada media selama 1 jam, setelah 1 jam media diambil menggunakan mikro pipet hingga habis. Ulangi tahap tersebut hingga PLB yang dibutuhkan tercukupi.

Media Adaptasi: PLB yang sudah melakukan proses pra-perlakuan, dipindahkan pada media adaptasi dengan berat 1-1,5 g. Setelah itu media ditutup dan dirapatkan menggunakan plastik wrap dan diamati perkembangannya selama 2 minggu.

Media Padat: PLB yang sudah berada di dalam media adaptasi selama 2 minggu dipindahkan ke dalam media perlakuan. Media perlakuan yang pertama yaitu media MS padat. PLB ditimbang dengan berat 100-150 mg. Mulut botol media dipanaskan pada api bunsen, pastikan tidak ada cairan yang menempel pada botol, PLB dipindah ke dalam media padat yang telah diberi label T0, setelah itu ditutup menggunakan plastik wrap.

Teknik *Thin-film*: PLB yang sudah berada di dalam media adaptasi selama 2 minggu dipindahkan ke dalam media perlakuan. Media perlakuan yang pertama yaitu media MS padat. PLB ditimbang dengan berat 100-150 mg. Mulut botol media dipanaskan pada api bunsen, pastikan tidak ada cairan yang menempel pada botol, PLB dipindah ke dalam media padat yang telah diberi label T1, lalu berikan media MS cair sebanyak 300 μ l menggunakan mikropipet. Setelah itu ditutup menggunakan plastik wrap.

Teknik *Double-layer*: PLB yang sudah berada di dalam media adaptasi selama 2 minggu dipindahkan ke dalam media perlakuan. Media perlakuan yang pertama yaitu media MS padat. PLB ditimbang dengan berat 100-150 mg. Lalu panaskan mulut botol media pada api bunsen, pastikan tidak ada cairan yang menempel pada botol, PLB dipindah ke dalam media padat yang telah diberi label T1, lalu berikan media MS cair sebanyak 300 μ l menggunakan mikropipet. Setelah itu ditutup menggunakan plastik wrap.

Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi persentase hidup, waktu muncul embrio, waktu muncul akar pertama, waktu muncul tunas, panjang akar, waktu muncul akar baru, pertambahan berat, warna embrio, warna daun dan pengamatan mikroskopis. Mikroskop (Motic SM7-7TR-TACH, China). Pengamatan warna dilakukan menggunakan RHS *colour chart* Edisi Enam (Royal Holtikultura Society, UK).

Analisis Data

Analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kali ulangan padamasing-masing perlakuan. Data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan uji perbandingan secara univariat , jika terdapat perbedaan nyata akan diuji lanjut dengan menggunakan Uji Bonferroni atau *Games-Howell* pada taraf nyata 5%.

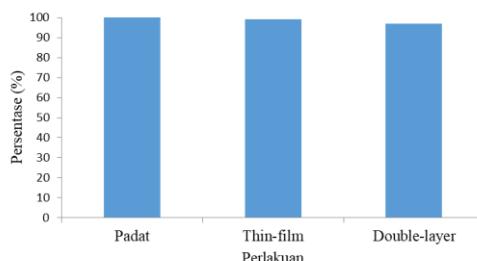
HASIL

Persentase hidup

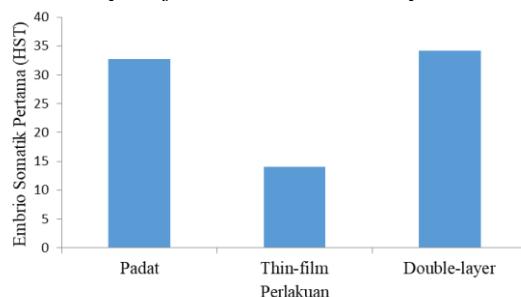
Persentase hidup PLB Anggrek *Dendrobium* sp. pada teknik media padat 100%, sedangkan pada teknik media *thin liquid film* 99%, dan pada teknik media *double-layer* 97% (Gambar 1).

Waktu munculnya embrio somatik pertama

Kemunculan embrio somatik pertama tercepat yaitu dengan teknik media *thin liquid film* yaitu dengan nilai rata-rata 14 HST. Sedangkan teknik media *double-layer* munjukkan nilai rata-rata 34,25 HST dan teknik media padat menunjukkan nilai rata-rata 32,75 HST (Gambar 2).



Gambar 1. Persentase hidup PLB anggrek *Dendrobium* sp. pada perlakuan teknik media padat, *thin liquid film*, dan *double-layer*

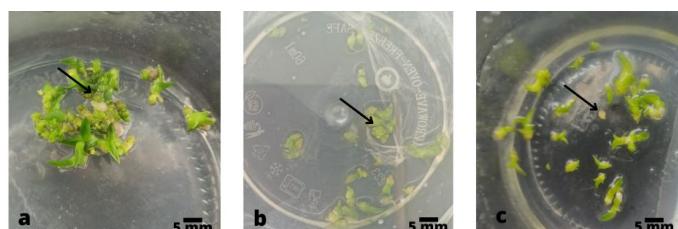


Gambar 2. Embrio somatik pertama yang muncul pada PLB anggrek *Dendrobium* sp. pada perlakuan teknik media padat, *thin liquid film*, dan *double-layer*.

Berdasarkan hasil uji *Games-Howell 5%* (Tabel 1) terhadap parameter hari munculnya embrio menunjukkan teknik media memberikan pengaruh nyata terhadap munculnya embrio pertama Anggrek *Dendrobium* sp.

Tabel 1. Hasil Uji *Games-Howell* Pengaruh Teknik Media Padat, *Thin liquid film*, dan *Double-layer* terhadap Munculnya Embrio Somatik Pertama PLB Anggrek *Dendrobium* sp.

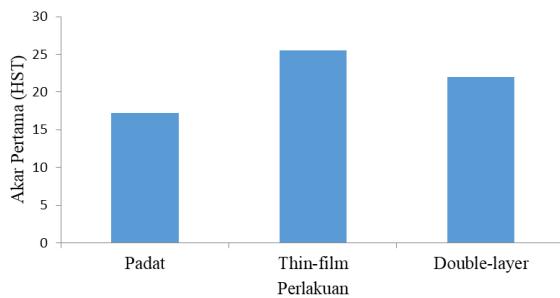
No.	Perlakuan		Signifikansi
1.	Padat	<i>Thin liquid film</i>	0,926
		<i>Double-layer</i>	0,025*
2.	<i>Thin liquid film</i>	Padat	0,926
		<i>Double-layer</i>	0,025*
3.	<i>Double-layer</i>	Padat	0,001*
		<i>Thin liquid film</i>	0,926



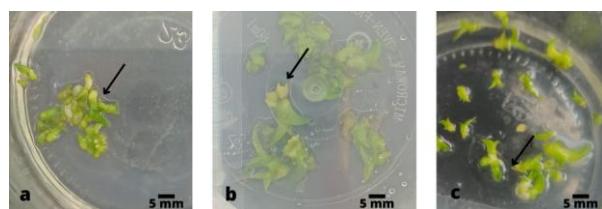
Gambar 3. Embrio somatik (tanda panah) yang muncul pada Teknik Media Padat (a) Teknik Media *Thin liquid film* (b) dan *Double-layer* (c)

Waktu muncul akar pertama

Kemunculan akar pertama tercepat yaitu dengan teknik media padat dengan nilai rata-rata 17,25 HST. Sedangkan pada teknik media double layer memiliki nilai rata-rata 22 HST dan teknik media *Thin liquid film* memiliki nilai rata-rata 25,5 HST (Gambar 4).



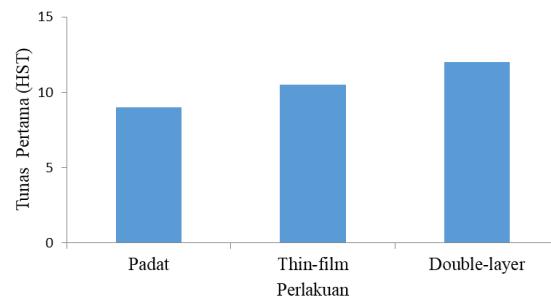
Gambar 4. Akar pertama yang muncul pada PLB anggrek *Dendrobium* sp. pada perlakuan teknik media padat, *thin liquid film*, dan *double-layer*.



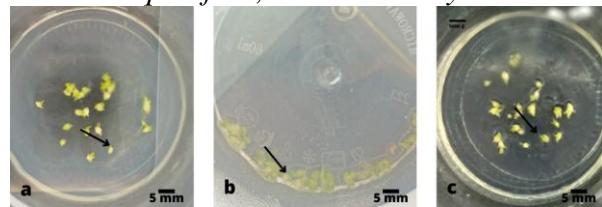
Gambar 5. Akar yang muncul (tanda panah) pada Teknik Media Padat (a) Teknik Media *Thin liquid film* (b) dan *Double-layer* (c)

Waktu muncul tunas pertama

Kemunculan tunas pertama tercepat yaitu dengan teknik media padat dengan nilai rata-rata 9 HST. Sedangkan pada teknik media *thin liquid film* memiliki nilai rata-rata 10,5 HST dan teknik media *double-layer* memiliki nilai rata-rata 12 HST (Gambar 6).



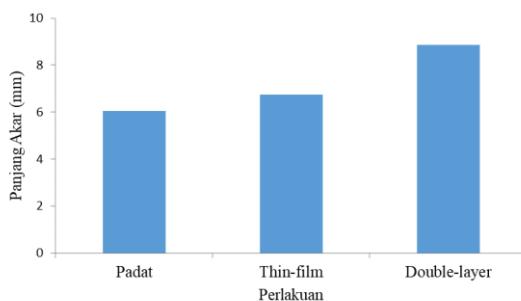
Gambar 6. Tunas pertama yang muncul pada PLB Anggrek *Dendrobium* pada teknik media padat, *thin liquid film*, dan *double-layer*.



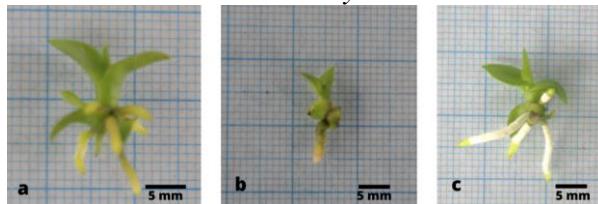
Gambar 7. Tunas yang muncul (tanda panah) pada Teknik Media Padat (a) Teknik Media *Thin liquid film* (b) dan *Double-layer* (c)

Panjang akar

Berdasarkan data pengamatan nilai rata-rata akar terpanjang yaitu dengan teknik media *double-layer* memiliki nilai rata-rata 8,86 mm. Sedangkan pada teknik media *thin liquid film* memiliki nilai rata-rata 6,75 mm dan teknik media padat dengan nilai rata-rata 6,06 mm (Gambar 8).



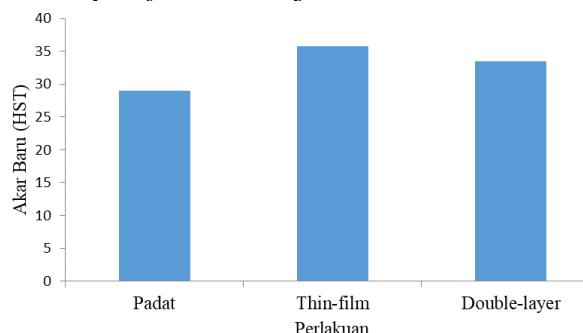
Gambar 8. Panjang akar PLB Anggrek *Dendrobium* sp. pada teknik media padat, *thin liquid film*, dan *double-layer*.



Gambar 9. Panjang Akar pada Teknik Media Padat (a) *Thin liquid film* (b) dan *Double-layer* (c)

Waktu muncul akar baru

Berdasarkan data pengamatan kemunculan akar baru tercepat yaitu dengan teknik media padat yaitu dengan nilai rata-rata 29 HST. Sedangkan teknik media *double-layer* menunjukkan nilai rata-rata 33,5 HST dan teknik media *thin liquid film* menunjukkan nilai rata-rata 35,75 HST (Gambar 10).



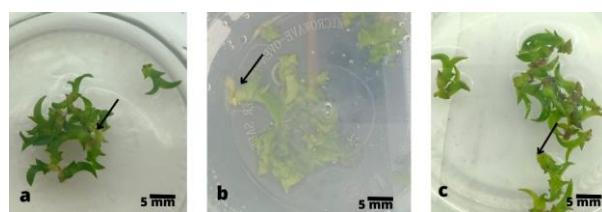
Gambar 10. Hari muncul akar baru pada PLB anggrek *Dendrobium* sp. pada perlakuan teknik media padat, *thin liquid film*, dan *double-layer*

Berdasarkan hasil uji *Games-Howell* 5% terhadap parameter hari munculnya akar baru menunjukkan teknik media memberikan pengaruh nyata terhadap munculnya embrio pertama Anggrek *Dendrobium* sp. (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Uji *Games-Howell* Pengaruh Teknik Media Padat , *Thin liquid film*, dan *Double-layer* terhadap Munculnya Akar Baru pada PLB Anggrek *Dendrobium* sp.

No.	Perlakuan		Signifikansi
1.	Padat	<i>Thin liquid film</i>	0,000*
		<i>Double-layer</i>	0,113
2.	<i>Thin liquid film</i>	Padat	0,000*
		<i>Double-layer</i>	0,409
3.	<i>Double-layer</i>	Padat	0,113
		<i>Thin liquid film</i>	0,409

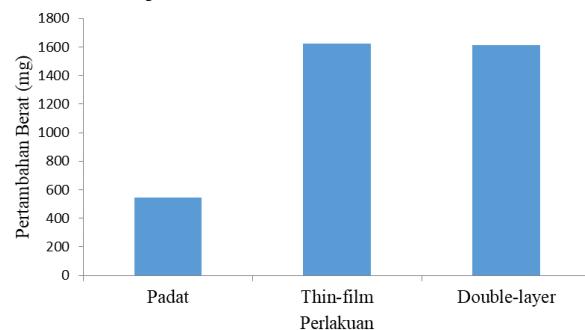
Keterangan: (*) ada perbedaan signifikan antara teknik media yang digunakan terhadap munculnya akar baru.



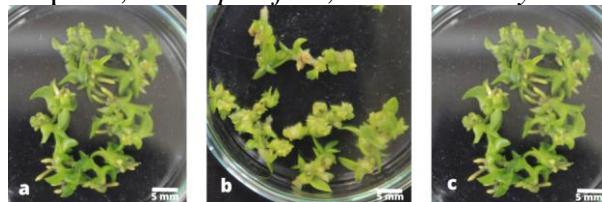
Gambar 11. Akar Baru yang muncul (tanda panah) pada Teknik Media Padat (a) *Thin liquid film* (b) dan *Double-layer* (c)

Pertambahan berat

Berdasarkan data pengamatan kemunculan akar baru tercepat yaitu dengan teknik media padat yaitu dengan nilai rata-rata 29 HST. Sedangkan teknik media double-layer menunjukkan nilai rata-rata 33,5 HST dan teknik media thin liquid film menunjukkan nilai rata-rata 35,75 HST (Gambar 12).



Gambar 12. Hari munculnya akar baru pada PLB anggrek *Dendrobium* sp. pada perlakuan teknik media padat, *thin liquid film*, dan *double-layer*.



Gambar 13. PLB *Dendrobium* sp. setelah 60 HST Pada Teknik Media Padat (a) *Thin liquid film* (b) dan *Double-layer* (c)

Hasil uji Bonferroni 5% terhadap parameter penambahan berat menunjukkan teknik media memberikan pengaruh nyata terhadap munculnya embrio pertama Anggrek *Dendrobium* sp. (Tabel 3).

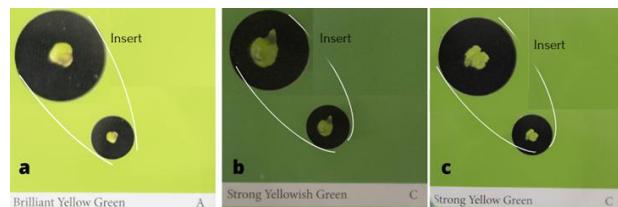
Tabel 3. Hasil Uji Bonferroni Pengaruh Teknik Media Padat, *Thin liquid film*, dan *Double-layer* terhadap Pertambahan Berat PLB Anggrek *Dendrobium* sp.

No.	Perlakuan		Signifikansi
1.	Padat	<i>Thin liquid film</i>	0,031*
		<i>Double-layer</i>	0,093
2.	<i>Thin liquid film</i>	Padat	0,031*
		<i>Double-layer</i>	1,000
3.	<i>Double-layer</i>	Padat	0,093
		<i>Thin liquid film</i>	1,000

Keterangan: (*) ada perbedaan signifikan antara teknik media yang digunakan terhadap munculnya pertambahan berat.

Warna embrio

Berdasarkan Tabel 4 diketahui pada perlakuan teknik media padat menghasilkan satu variasi warna. Teknik media *thin liquid film* menghasilkan tiga variasi warna, dan perlakuan teknik media *double-layer* menghasilkan satu warna.



Gambar 14. Warna PLB Anggrek *Dendrobium* sp. menggunakan RHS color chart (a) Kuning-Hijau 144C (Hijau Muda) pada perlakuan padat (b) Kuning-Hijau 150A (Hijau Muda) pada perlakuan *thin liquid film*, (c) Hijau-141C (Hijau Tua) pada perlakuan *double-layer*.

Tabel 4. Pengamatan Warna Embrio PLB Anggrek *Dendrobium* sp.

Perlakuan	Σ Variasi Warna	Warna Embrio (RHS Color Chart)
Padat	1	Kuning-Hijau 144C Kuning-Hijau 150A
<i>Thin liquid film</i>	3	Kuning-Hijau 144C Kuning-Hijau 144B
<i>Double-layer</i>	1	Hijau 141C

Warna daun

Berdasarkan Tabel 5 diketahui pada perlakuan teknik media padat menghasilkan tiga variasi warna. Pada teknik media *thin liquid film* menghasilkan empat variasi warna, dan perlakuan teknik media *double-layer* menghasilkan satu warna yaitu Hijau-141B.



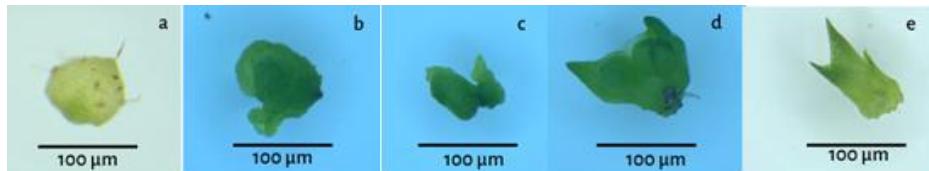
Gambar 15. Hasil pengamatan warna daun Anggrek *Dendrobium* sp. menggunakan RHS color chart (a) Hijau 143A (Hijau Muda) pada perlakuan padat, (b) Kuning-Hijau 144B (Hijau Muda) pada perlakuan *thin liquid film*, (c) Hijau 141B (Hijau Tua) pada perlakuan *double-layer*

Tabel 5. Pengamatan Warna Daun Anggrek *Dendrobium* sp.

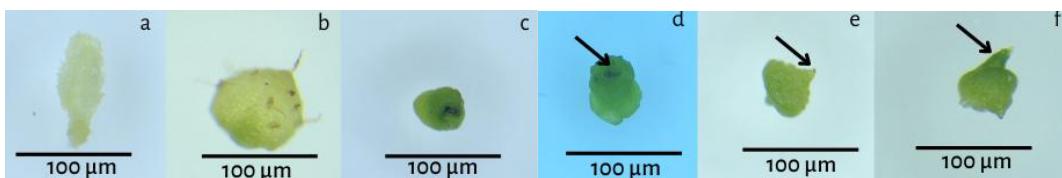
Perlakuan	Σ Variasi Warna	Warna Daun (RHS Color Chart)
Kontrol	3	Hijau-141B Hijau-143A Hijau-143B
<i>Thin liquid film</i>	4	Hijau-141B Hijau-143A Kuning-Hijau N144C Kuning-Hijau 144B
<i>Double-layer</i>	1	Hijau-141B

Pengamatan mikroskopis

Hasil pengamatan mikroskopis pada PLB Anggrek *Dendrobium* sp. disajikan pada Gambar 16.



Gambar 16. Embriogenesis somatik yang diinduksi dari PLB *Dendrobium* sp.: (a) Fase globular (4×100). (b) Fase hati ($2,5\times100$). (c) Fase torpedo ($2,5\times100$). (d) Fase kotiledon ($2,5\times100$). (e) Planlet normal ($2,5\times100$)



Gambar 17. Hasil pengamatan perkecambahan embrio anggrek *Dendrobium* sp.: (a) Biji anggrek (4×100) (b) Perkembangan embrio (40×100) (c) Protokorm ($2,5\times100$) (d) Protokorm dengan Shoot Apical Meristem (SAM) ($2,5\times100$) (e) Protokorm dengan primordia daun ($2,5\times100$) (f) Protokorm dengan daun pertama ($2,5\times100$).

PEMBAHASAN

Persentase Hidup

Pada teknik media padat presentasi hidupnya mencapai 100% hal ini disebabkan oleh komposisi dalam media yang menjadi salah satu faktor untuk menyokong kehidupan eksplan (Rahmi dkk., 2010). Gunawan (1992) menyatakan bahwa media yang digunakan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Media MS merupakan media yang cocok untuk pertumbuhan dan perkembangan hampir semua jenis tanaman. Rahmi dkk. (2010) juga menyatakan bahwa genotipe eksplan, komponen penyusun media dan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan, lingkungan tumbuh, fisiologi jaringan eksplan, dan keadaan fisik tempat kultur ditumbuhkan merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis tanaman.

Pada teknik media *thin liquid film* dan *double-layer* terjadi penurunan persentase eksplan hidup karena *browning* pada eksplan. *Browning* PLB Anggrek *Dendrobium* sp. pada teknik media *thin liquid film* dan *double-layer* diakibatkan oleh oksidasi senyawa fenolik. Beberapa macam tumbuhan spesies tropis, mengandung senyawa fenolik kosentrasi tinggi yang akan berdifusi ke luar bila sel terluka atau menua (Rahayu dkk., 2015). Akibatnya jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau hitam dan terhambat untuk tumbuh (Jain dkk., 2009).

Waktu Muncul Embrio Somatik

Terbentuknya embrio menunjukkan keberhasilan regenerasi eksplan yang diinokulasi pada media kultur *in vitro*. Nilai signifikansi antara teknik media Padat- *Thin liquid film* dan *Thin liquid film -Double-layer* sebesar 0,025 dan 0,001 ($<0,05$) yang berarti ada perbedaan signifikan antara teknik media Padat- *Thin liquid film* dan *Thin liquid film -Double-layer* berdasarkan embrio pertama. Sedangkan nilai signifikansi antara media Padat-*Double-layer* adalah 0,926 ($>0,05$) yang berarti bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara media Padat-*Double-layer* berdasarkan embrio pertama.

Embrio somatik yang muncul menunjukkan bahwa eksplan mengalami pembelahan sel dan membentuk embrio baru (Gambar 3). Jayasankar dkk., (2003) melakukan penelitian yang menunjukkan bahwa embrio somatik yang tumbuh pada media cair memiliki tingkat regenerasi yang lebih tinggi daripada embrio somatik yang tumbuh pada media padat. Pada penelitian Kriswanto (2020) regenerasi Anggrek *Phalaenopsis* sp. pada media cair menghasilkan PLB terbanyak dibandingkan dengan media padat. Media cair memiliki nutrisi dan air yang lebih besar, resistensi yang lebih rendah daripada difusi dan memiliki kontak yang lebih dekat antara eksplan dan media kultur (Avila dkk., 1996).

Pergerakan media kultur cair juga memungkinkan pemerataan nutrisi dan zat pengatur tumbuh (Ascough dan Fennell, 2004). Pada teknik media *double-layer* juga memiliki nilai yang signifikan dibandingkan dengan teknik media padat. Pada media padat, metabolit toksik dapat terakumulasi di dasar eksplan dengan lapisan cair di atas produk ini dapat diencerkan atau menyebar dalam media, yang dapat menghindari konsentrasi yang beracun (Debergh dkk., 1994).

Waktu muncul akar pertama

Pada *Test of Between-Subjects Effects*, nilai signifikansi pada variabel akar pertama lebih besar dari 0,05 yakni 0,100. Maka dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh media yang digunakan terhadap munculnya akar pertama secara signifikan. Pertumbuhan suatu tanaman akan baik tergantung dari keadaan akar pada embrio, akar berkembang dari akar embrio atau akar lembaga (*radicle*) (Gambar 5).

Pembentukan akar merupakan proses pembelahan yang aktif dan berdifirensiasi yang ditunjang oleh adanya senyawa organik dan anorganik. Pertumbuhan akar secara *in vitro* merupakan proses yang diinduksi dan diregulasi oleh faktor lingkungan seperti cahaya, temperatur dan hormon (Hartmann dkk., 2013). Menurut Salisbury dan Frank (1995) media tanam juga dapat mempengaruhi pertumbuhan akar baik secara morfologis maupun anatomis. Umur eksplan yang lebih muda juga dapat menginduksi pertumbuhan akar yang lebih optimal.

Waktu muncul tunas pertama

Pada *Test of Between-Subjects Effects*, nilai signifikansi pada variabel tunas pertama lebih besar dari 0,05 yakni 0,484. Maka dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh media yang digunakan terhadap munculnya tunas pertama secara signifikan. Kemunculan tunas yaitu ketika PLB telah membentuk satu hingga dua calon daun dengan lamina yang jelas (Dorusposari, 2003). Regenerasi sel tanaman pada tahap inisiasi menandakan eksplan berkembang salah satunya dengan kemunculan tunas (Gambar 7).

Tunas akan berkembang menjadi calon batang dan daun hingga tumbuh menjadi plantlet. Semakin cepat tunas terbentuk maka semakin cepat nutrisi yang diserap eksplan sehingga mempercepat pembentukan individu baru, karena sumber nutrisi eksplan hanya ada di dalam media. Nutrisi yang tersedia merupakan faktor utama dalam menunjang perkembangan eksplan untuk membentuk tanaman baru.

Panjang akar

Pada *Test of Between-Subjects Effects*, nilai signifikansi pada variabel panjang akar lebih besar dari 0,05 yakni 0,164. Maka dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh media yang digunakan terhadap panjang akar secara signifikan. Media dasar MS yang kaya akan unsur hara makro dan mikro berperan penting dalam pertumbuhan kultur sel eksplan serta merangsang pertumbuhan akar sebagai sumber nutrisi (Gunawan, 1992). Proses pembelahan sel pada meristem ujung akar menyebabkan pertambahan panjang akar yang selanjutnya diikuti oleh proses pemanjangan dan pembesaran sel (Gambar 9). Panjang akar berpengaruh untuk penyerapan nutrisi pada media terutama pada teknik media padat karena media padat bersifat statis sehingga panjangnya akar dapat berpengaruh pada penyerapan nutrisi. Selain itu akar yang panjang dapat memudahkan tanaman pada proses aklimatisasi yang mengharuskan akar menjadi penopang tanaman, karena akar panjang dapat membuat tanaman lebih kokoh (Purnamasari, 2024).

Waktu muncul akar baru

Nilai signifikansi antara teknik media Padat- *Thin liquid film* 0,000 (<0,05) yang berarti ada perbedaan signifikan antara teknik media Padat- *Thin liquid film* berdasarkan munculnya akar baru. Sedangkan nilai signifikansi antara media Padat-*Double-layer* dan *Thin liquid film -Double-layer* yaitu 0,113 dan 0,409 (>0,05) yang berarti bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara media Padat-*Double-layer* dan *Thin liquid film -Double-layer* berdasarkan munculnya akar baru. Proses keluarnya akar ditentukan impermeabilitas kulit batang terhadap air untuk menyerap kandungan nutrisi (Hadi, 2023).

Teknik media padat, *thin liquid film*, maupun *double-layer* tidak memiliki pengaruh terhadap waktu muncul akar pertama (Gambar 11). Namun pada saat muncul akar baru memiliki pengaruh antara munculnya akar baru pada teknik padat dan teknik *thin liquid film*. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan media cair dalam melakukan regenerasi tanaman lebih cepat dibandingkan dengan media padat.

Pertambahan berat

Nilai signifikansi antara teknik media Padat- *Thin liquid film* 0,031 (<0,05) yang berarti ada perbedaan signifikan antara teknik media Padat- *Thin liquid film* berdasarkan pertambahan berat eksplan. Sedangkan nilai signifikansi antara media Padat-*Double-layer* dan *Thin liquid film -Double-layer* yaitu 0,093 dan 1,000 (>0,05) yang berarti bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara media Padat-*Double-layer* dan *Thin liquid film-Double-layer* berdasarkan pertambahan berat PLB.

Berdasarkan hasil pertumbuhan tanaman setelah 60 HST pada teknik media padat (Gambar 13a) dan *double-layer* (Gambar 13b) menunjukkan bahwa tanaman lebih banyak menghasilkan akar dan daun yang relatif besar dibandingkan dengan teknik media *thin liquid film* (Gambar 13c). Sedangkan teknik media *thin liquid film* lebih banyak menghasilkan embrio. Menurut Sivakumar dkk., (2005) menjelaskan bahwa transport mineral pada membran plasma yang bertanggungjawab dalam pertumbuhan dan produksi biomassa dapat ditingkatkan dengan optimalisasi unsur mineral dalam media cair. Penelitian yang dilakukan oleh Adelberg (2005) pada mikropropagasi tanaman *Hosta* sp. pada media MS cair memiliki berat basah yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman *Hosta* sp. yang ditanam pada media MS padat. Berat bersih merupakan salah satu bukti bahwa eksplan mengalami pertumbuhan dan perkembangan dengan baik.

Warna Embrio

Perlakuan teknik media padat yaitu menggunakan teknik media padat menghasilkan satu warna yaitu Kuning-Hijau 144C. sedangkan pada teknik media *thin liquid film* menghasilkan tiga variasi warna yaitu Kuning-Hijau 150A, Kuning-Hijau 144C, dan Kuning-Hijau 144B. Pada perlakuan teknik media *double-layer* menghasilkan satu warna yaitu Hijau-141C.

Berdasarkan data yang telah diperoleh, diketahui secara garis besar embrio yang terbentuk dalam penelitian ini berwarna hijau. Dengan spesifikasi hijau muda dan hijau tua (Gambar 14). Menurut Ningrum dan Mayta (2022) Embrio yang hijau menandakan kaya akan nutrisi. Sel muda yang bersifat meristematik yang mengalami pembelahan terus menerus dalam periode waktu yang lama akan akan menunjukkan warna hijau muda (Fleming, 2006). Oleh karena itu pada penelitian ini warna embrio hijau muda merupakan indikator embrio yang baik dan akan mengalami multiplikasi lebih optimal dibandingkan dengan embrio berwarna hijau tua (Fleming, 2006).

Warna Daun

Pada perlakuan kontrol yaitu menggunakan teknik media padat menghasilkan tiga variasi warna yaitu Hijau-141B, Hijau-143A, dan Hijau-143B. Sedangkan pada teknik media *thin liquid film* menghasilkan empat variasi warna yaitu Hijau-141B, Hijau-143A, Kuning-Hijau N144C dan Kuning-Hijau 144B. Pada perlakuan teknik media *double-layer* menghasilkan satu warna yaitu Hijau-141B.

Sebagian besar daun yang terbentuk dalam penelitian ini berwarna hijau, dengan spesifikasi hijau muda dan hijau tua (Gambar 15). Klorofil menyebabkan warna hijau yang terdapat pada daun. Klorofil sebagai penyerap cahaya berupa pigmen yang berwarna hijau yang berperan dalam fotosintesis (Wirmasari dan Mayta, 2019). Semakin hijau warna daun maka semakin tinggi kandungan klorofilnya (Dharmadewi, 2020). Oleh karena itu, semakin hijau warna daun menunjukkan bahwa tanaman tersebut berphotosintesis dengan baik. Kadar klorofil dan warna hijau juga dapat dipengaruhi oleh cahaya, air, suhu, karbohidrat, gula, serta unsur-unsur hara seperti N, Mg dan Fe (Wicaksono dkk., 2017).

Pengamatan Mikroskopik

Pembentukan embriogenesis melalui beberapa tahapan yaitu fase globular, fase hati, fase torpedo dan fase planlet. Tahap globular dicirikan dengan terbentuknya bulatan yang khas dan berwarna putih kekuningan pada permukaan eksplan (Gambar 16a). Sel terus membelah secara bertahap membentuk embrio bentuk hati (Gambar 16b). Fase torpedo ditandai dengan adanya sel meristem pada bagian tengah yang merupakan pusat pertumbuhan (Gambar 16c), pada fase ini karakterisasi polarisasi terlihat dengan jelas. Fase selanjutnya kotiledon yang terbentuk terus memanjang dan bagian ujung akar mulai terbentuk (Gambar 16a), embrio berkecambah untuk membentuk planlet (Yan dkk., 2020).

Menurut Mose dkk. (2017) yang tahap perkembangan selama perkecambahan bibit anggrek *Phalaenopsis amabilis* terdiri dari enam tahap: tahap pertama adalah embrio dengan warna kuning (Gambar 17a), tahap kedua adalah embrio berubah menjadi hijau dalam minggu pertama atau kedua (Gambar 17b), kemudian tahap ketiga adalah bentuk embrio struktur bipolar (dapat dibedakan antara lebih gelap dan lebih terang) pada minggu ketiga dan keempat (Gambar 17c). Pada embrio tahap keempat mulai membentuk daun primordial dalam embrio yang lebih gelap pada minggu keempat (Gambar 17e). Pada tahap kelima, protocorm sudah memiliki dua daun pada minggu ketujuh dan pada tahap keenam protocorm memiliki tiga daun minggu ke-11 sampai dengan minggu ke-12.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pada teknik media *thin liquid film* memiliki waktu muncul embrio somatik baru tercepat pada 14 HST, rerata pertambahan berat tertinggi 1621 mg, variasi warna embrio terbanyak Kuning-Hijau 150A, Kuning-Hijau 144C, dan Kuning-Hijau 144B dan variasi warna daun terbanyak Hijau-141B, Hijau-143A, Kuning-Hijau N144C dan Kuning-Hijau 144B dibandingkan dengan teknik media *double-layer* dan padat.

Namun teknik media padat, *thin liquid film* dan *double layer* tidak berpengaruh signifikan terhadap waktu muncul akar pertama dengan rerata 17 HST, 25 HST, dan 22 HST, tunas pertama dengan rerata 36 HST, 42 HST, dan 48 HST, dan panjang akar dengan nilai rerata 5,6 cm, 6,75 cm dan 10,5 cm. Teknik media *thin liquid film* merupakan teknik media terbaik untuk pertumbuhan dan perkembangan PLB *Dendrobium* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada program *Matching Fund* Kedaireka tahun 2022 dari Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adelberg, J. 2005. Efficiency in thin-film liquid system for Hosta micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81(3) : 359–368. <https://doi.org/10.1007/S11240-004-6657-Y>
- Ascough, G. D., dan C. W. Fennell. 2004. The regulation of plant growth and development in liquid culture. In *South African Journal of Botany* 70(2): 181–190. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30234-9](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30234-9)
- Avila, A. D. L., S. M. Pereyra., dan J. A. Argüello. 1996. Potato micropropagation: Growth of cultivars in solid and liquid media. *Potato Research* 39(2): 253–258. <https://doi.org/10.1007/bf02360916>

- Chimdessa, E. 2020. Composition and Preparation of Plant Tissue Culture Medium. *Journal of Tissue Culture and Bioengineering*. <https://doi.org/10.29011/26886502.000020>
- Debergh, P., J. De Riek., dan D. Matthys. 1994. Nutrient supply and growth of plants in culture. In *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0790-7_5
- Demirkaya, B., dan N. Çömlekçioğlu. 2021. Effects of Biotin and Ascorbic Acid Applications on Haploid Embryo Induction in Semisolid and Double Layer Nutrient Media in Pepper (*Capsicum annuum L.*) Anther Culture. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*. 5(2) : 191–196. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2021.2.8>
- Dharmadewi, A. A. I. M. 2020. Analisis Kandungan Klorofil Pada Beberapa Jenis Sayuran Hijau Sebagai Alternatif Bahan Dasar Food Suplement. *Emasains : Jurnal Edukasi Matematika Dan Sains* 9(2): 171–176. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.4299383>
- Dorusposari, B. 2003. Pengaruh Zat Tumbuh Kinetin dan Napthaline Acetic Acid Terhadap Pembentukan dan Perkembangan Mersitem Ujung Batang inaan Anggrek Hibrida Phalaenopsis: Star Rio" Secara In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Biologi UGM Yogyakarta.
- Etienne, H., dan M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69(3): 215–231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465/METRICS>
- Fleming, A. 2006. Metabolic aspects of organogenesis in the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany* 57(9): 1863–1870. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERJ178>
- Gunawan, L. . 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tanaman*. PAU Bioteknologi Tanaman IPB. Bogor.
- Hadi, M. S., T. Rahayu., G. E. Jayanti., dan D. Agisimanto. 2023. Kajian Akar Kadaka sebagai Media Tanam dengan Pengaruhvariasi Konsentrasi Indole Butyric Acid terhadap Pertumbuhan Anggrek *Dendrobium canaliculatum*. *Jurnal Ilmiah SAINS ALAMI (Known Nature)* 6 (1): 32–39. <https://www.researchgate.net/publication/373908092>
- Hartmann, H. T., D. E. Kester., F. T. Davies Jr., dan R. L. Geneve. 2013. *Plant Propagation Principles and Practices* Pearson New International Edition. IEEE.
- Jain, S.M., dan P.K. Gupta. 1995. Protocol for Somatik Embryogenesis in Woody Plants. *Springer, the Netherlands* 321–343.
- Jayasankar, S., B. R. Bondada., Z. Li., dan D. J. Gray. 2003. Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatik embryos from solid- and liquid-culture-derived proembryogenic masses. *American Journal of Botany* 90(7): 973–979. <https://doi.org/10.3732/AJB.90.7.973>
- Kriswanto, B. 2020. Pengaruh Media dan Perbandingan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh pada Regenerasi Anggrek *Phalaenopsis* sp. melalui Pembentukan Embrio Somatik. In *Digital Repository Universitas Jember*. Program Studi Magister Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember 2020. <https://repository.unej.ac.id/xmlui/handle/123456789/100430>
- Mahmoud, O., dan M. Kosar. 2013. Regeneration and histological of plants derived from leaf explants in vitro culture of strawberry. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)* 5: 943–950.
- Mose, W., A. Indrianto., A. Purwantoro., dan E. Semiarti. 2017. The Influence of Thidiazuron on Direct Somatik Embryo Formation from Various Types of Explant in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Orchid. *HAYATI Journal of Biosciences* 24(4): 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.11.005>

- Ningrum, F., dan N. Mayta. 2022. Pemberian air rebusan kentang pada media Murashige Skoog terhadap pertumbuhan protokorm anggrek sendu (*Grammatophyllum stapeliiflorum*) secara *in vitro*. *Jurnal Ilmiah Pertanian* 19(1): 19–28. <https://doi.org/10.31849/jip.v19i1.8514>
- Purnamasari, V., T. Rahayu., G. E. Jayanti., dan D. Agisimanto. 2024. Pengaruh Jenis Media Tanam dan Penambahan Nanobubbles O₂ terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek *Dendrobium burana Green × Ong Ang Ai Boon* secara *in Vitro*. *Jurnal ILMU DASAR* 25 (1): 49–58. <https://jid.jurnal.unej.ac.id/index.php/JID/article/view/41376>
- Raemakers, C.J.M., E. Jacobsen., dan R.G.F. Visser. 1995. Secondary Somatik Embryogenesis and Application in Plant Breeding. *Euphytica*. 81: 93-107. <https://doi.org/10.1007/BF00022463>
- Rahayu, T., G.E. Jayanti., dan A. Hayati. 2023. Induksi Nanobubbles (NBs) untuk Pertumbuhan Anggrek *Dendrobium Imelda Marina Masagung × Bumi Menangis*. *Metamorfosa:Journal of Biological Sciences* 10(1): 126-132. <https://jurnal.unpad.ac.id/metamorfosa/article/view/45678>
- Rahayu, E. S., U. Anggraito., dan S. F. Dwisada, S. F. 2015. Kultur Fotoautotrofik : Solusi Mikropropagasi Tumbuhan Berkayu. *MIPA Unnes Press.* 78- 89. http://lib.unnes.ac.id/23442/1/Monograf_-_Enni_2015.pdf.
- Rahmah, S., T. Rahayu., dan A. Hayati. 2018. Kajian Penambahan Bahan Organik Pada Media Tanam VW Pada Organogenesis Anggrek *Dendrobium* Secara *In Vitro*. *Jurnal SAINS ALAMI (Known Nature)* 1(1): 93–103. <https://doi.org/10.33474/j.sa.v1i1.1392>
- Rahmi, I., I. Suliansyah., dan T. Bustamam. 2010. Pengaruh Pemberian Beberapa Konsentrasi BAP dan NAA Terhadap Multiplikasi Tunas Pucuk Jeruk Kanci (*Citrus sp.*) Secara *In Vitro*. *Jerami* 3(3): 210–219. <https://scholar.google.com/scholar?cluster=1234567890>
- Salisbury, B. Frank dan C. W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Penerbit ITB.
- Santoso, E., T. Rahayu., dan A. Hayati. 2020. Pengaruh Air Kelapa (Cocos nucifera L) dengan Medium VW terhadap Pertumbuhan Protocorm Anggrek secara *in vitro* The effect of coconut water (Cocos nucifera L) with VW medium on the Phalaenopsis sp protocorm growth in vitro. *Jurnal Ilmiah SAINS ALAMI (Known Nature)* 3: 37–43. <https://knownnat.unisma.ac.id/index.php/knownnat/article/view/7208/6639>
- Sivakumar, G., K. W. Yu., E. J. Hahn., dan K. Y. Paek. 2005. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. *Current Science* 89(4): 641–649. <https://www.currentscience.ac.in/Volumes/89/04/0641.pdf>
- Wicaksono, F. Y., A. F. Putri., Y. Yuwariah, Y. Maxiselly., dan T. Nurmala. 2017. Respons tanaman gandum akibat pemberian sitokinin berbagai konsentrasi dan waktu aplikasi di dataran medium Jatinangor. *Kultivasi* 16(2). <https://jurnal.unpad.ac.id/kultivasi/article/view/13805>
- Wijayani, Y., Solichatun., dan W. Mudyantini. 2007. Pertumbuhan Tunas dan Struktur Anatomi Protocorm Like Body Anggrek *Grammatophyllum scriptum* dengan Pemberian Kinetin dan NAA. *Bioteknologi* 4(2): 33–40. <https://doi.org/10.13057/biotek/c040201>
- Wirmasari, R., dan N. Mayta. 2019. Respons Pertumbuhan Protocorm Anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* (Teijsm dan Binn.) J.J.Sm. Secara *In Vitro* pada Beberapa Komposisi Media. *Jurnal Biologi Universitas Andalas* 7 (2). <https://biologi.fmpa.unand.ac.id/jbiounand/article/view/123>
- Yan, R., C. Wang., J. Wang., R. Nie., dan H. Sun. 2020. High-efficiency somatik embryogenesis techniques for different hybrids of cut lilies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 143(1): 145–157. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01904-4>