

## Perkembangan Awal *Protocorm* Anggrek *Phalaenopsis amabilis* secara *In Vitro* setelah Penambahan Zat Pengatur Tumbuh $\alpha$ -Naphthaleneacetic Acid dan Thidiazuron

Eka Fitriana Candra Ningrum<sup>1</sup>, Ikhsanudin Nur Rosyidi<sup>1</sup>, Rizka Riliant Puspari<sup>1</sup> dan Endang Semiarti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Email : ikhsanudin.nur.r@mail.ugm.ac.id

### Abstract

*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume is one of nature orchids with a high commercial value. The orchid cultivation is difficult because the seeds are microscopic and don't have the endosperm, so it needs to be done with *in vitro* culture. This cultivation need medium that supports the growth of the orchids for example with the addition kind of plant growth regulator that is auxin and cytokinin. This study was aimed determining effect of the plant growth regulator of early development of *P. amabilis* orchid protocorm *in vitro* aspects of morphology and anatomy. Then protocorm sub cultured on medium with NAA and TDZ combinations at various concentrations and incubated in a room temperature. Protocorm orchid is then observed for 2 weeks which includes the percentage of growth, percentage protocorm the forming buds and absorbing hair. Making the anatomical preparations made by taking protocorm every week, stored in 70% alcohol solution and made preparations anatomy using Parafin method with safranin staining. The results showed the addition of NAA and TDZ protocorm growth reached 100%. The protocorm percentage of the forming buds as follows (0: 0, 0: 0.2, 0.5: 0, 0.5: 0.2, 1: 0 and 1: 0.2) ppm was 24%, 22%, 32%, 40%, 40% and 38% while the protocorm observed which form absorbing hair included 10%, 18%, 14%, 24%, 16% and 0%. The cell diameter ranged from  $39.2 \pm 0.47\mu\text{m}$ ,  $44.4 \pm 0.97\mu\text{m}$ ,  $39.08 \pm 0.5\mu\text{m}$ ,  $38.83 \pm 0.2\mu\text{m}$ ,  $39.5 \pm 0.39\mu\text{m}$  and  $39.75 \pm 0.28\mu\text{m}$ . Therefore we can conclude that the most optimal medium in *P. amabilis* orchid growing *in vitro* is medium NP with a combination of NAA and TDZ (0.2: 0.5) ppm.

**Key words** : anatomy, *in vitro* cultivation, morphology, *Phalaenopsis amabilis*

### Abstrak

*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume merupakan salah satu anggrek alam dengan nilai komersial yang tinggi. Budidaya anggrek ini cukup sulit dilakukan karena biji bersifat mikroskopis dan tidak memiliki endosperm, sehingga perlu dilakukan kultur *in vitro*. Dalam budidaya ini diperlukan medium pendukung pertumbuhan anggrek secara optimal misalnya dengan penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) dari golongan auksin dan sitokinin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ZPT tersebut terhadap perkembangan awal *protocorm* (pertumbuhan embrio anggrek) *P. amabilis* secara *in vitro* dari aspek morfologi dan anatomi. *Protocorm* disubkultur pada medium NP dengan kombinasi ZPT NAA dan TDZ pada berbagai konsentrasi dan diinkubasi pada suhu ruangan. Dilakukan pengamatan selama 2 minggu yang mencakup persentase pertumbuhan, persentase *protocorm* yang membentuk tunas dan *absorbing hair*. Pembuatan preparat anatomi dilakukan dengan mengambil *protocorm* setiap minggunya, disimpan dalam larutan alkohol 70% dan dibuat preparat anatomi menggunakan metode Parafin dengan pewarnaan safranin. Hasil penelitian menunjukkan pada penambahan NAA dan TDZ pertumbuhan *protocorm* mencapai 100%. Persentase *protocorm* yang membentuk tunas berturut turut (0:0,0,2:0, 0:0,5, 0,2:0,5, 0:1, dan 0,2:1) ppm adalah 24%, 22%, 32%, 40%, 40% dan 38% sedangkan untuk pengamatan *protocorm* yang membentuk *absorbing hair* sebesar 10%, 18%, 14%, 24%, 16%, dan 0%. Untuk diameter sel berukuran  $39.2 \pm 0.47\mu\text{m}$ ,  $44.4 \pm 0.97\mu\text{m}$ ,  $39.08 \pm 0.5\mu\text{m}$ ,  $38.83 \pm 0.2\mu\text{m}$ ,  $39.5 \pm 0.39\mu\text{m}$  dan  $39.75 \pm 0.28\mu\text{m}$ . Dapat disimpulkan bahwa medium yang paling optimal dalam pertumbuhan anggrek *P. amabilis* secara *in vitro* adalah medium NP dengan kombinasi NAA dan TDZ (0.2 : 0.5) ppm.

**Kata kunci** : anatomi, kultur *in vitro*, morfologi, *Phalaenopsis amabilis*

### Pendahuluan

Salah satu spesies tumbuhan dengan keanekaragaman yang tinggi di Indonesia adalah anggrek. Beberapa jenis anggrek mempunyai nilai komersial yang tinggi karena bentuk bunga yang indah, unik, dapat bertahan tahan lama, tidak mudah layu, dan memiliki waktu mekar yang lama sehingga banyak dicari untuk diperdagangkan (Chugh et al, 2009). Salah satu anggrek yang potensial untuk dikembangkan yaitu *Phalaenopsis amabilis*, yang ditetapkan sebagai satu dari tiga Bunga Nasional Indonesia. Berdasarkan

Keputusan Presiden No. 4 Tahun 1993, *P. amabilis* disebut sebagai Puspa Pesona Indonesia. Spesies ini memiliki kelopak berwarna putih, bentuk bunga yang eksotis serta bentuk bunga seperti kupu-kupu (*Phalaenos*) dan bentuk labellum yang khas seperti antena. Hal tersebut menyebabkan *P. amabilis* banyak dipilih sebagai induk silangan untuk menghasilkan hibrida-hibrida unggul terutama anggrek bulan putih di dunia. Namun, popularitas *P. amabilis* sebagai bunga asli Indonesia justru meredup karena keberadaannya di alam semakin sukar dijumpai

akibat eksploitasi yang berlebihan maupun kerusakan hutan. Kendala pengembangan anggrek ini di Indonesia antara lain terbatasnya bibit unggul, teknologi yang digunakan masih sederhana, dan kurangnya dukungan pemerintah. Oleh karena itu, diperlukan upaya budidaya yang lebih efektif dan efisien untuk meningkatkan produktivitas spesies anggrek ini di alam.

Budidaya yang telah dilakukan para peneliti anggrek adalah kultur jaringan secara *in vitro*. Kultur jaringan merupakan metode perbanyakan tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman dan ditumbuhkan dalam medium buatan serta dilakukan di tempat steril (Razdan, 2003). Metode ini sebagai alternatif untuk mendapatkan propagasi klon tanaman dalam waktu singkat dan jumlah besar. Kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan 3 cara, yaitu pembentukan tunas adventif, poliferasi tunas lateral dan embriogenesis somatic. Setiap tunas yang dihasilkan dapat dijadikan sebagai sumber eksplan untuk penggandaan tunas selanjutnya sehingga diperoleh tunas yang banyak dalam waktu yang relatif singkat (Kosmiatin et al, 2005).

Faktor-faktor penentu keberhasilan perkecambahan secara *in vitro* yaitu genotip tanaman, kondisi fisiologis tanaman, jenis dan kondisi medium, lingkungan kultur, dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Zhang et al, 2000). Senyawa-senyawa ZPT memiliki karakteristik yang sama seperti hormon tetapi diproduksi secara eksogen. Pertumbuhan dan morfogenesis secara *in vitro* diatur oleh hormon tanaman dan hormon eksogen. Pemberian hormon eksogen dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesa protein dan permeabilitas sel terhadap air, serta menurunkan tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel dan sel mengalami pertumbuhan (George dan Sherington, 1984). Hormon-hormon yang sering digunakan untuk kultur *in vitro* adalah auksin dan sitokinin, salah satunya  $\alpha$ -Naphthaleneacetic Acid (NAA) (Utami et al, 2007; Wijayani et al, 2007) dan Thidiazuron (TDZ) (Feng dan Chen, 2014). NAA merupakan golongan auksin yang berfungsi dalam induksi pemanjangan sel, dormansi apikal, penghambatan pucuk aksilar dan adventif, serta inisiasi pengakaran (Wattimena, 1992). TDZ merupakan golongan sitokinin yang bertugas dalam menstimulasi pembelahan sel dan multiplikasi tunas ketika tahap pembentukan struktur globular dan hati dalam proses embriogenesis (Lu, 1993).

Penelitian perkembangan awal protokorm pada *P. amabilis* sebelumnya pernah dilaporkan. Utami et al (2007) meneliti pengaruh NAA terhadap embriogenesis somatik anggrek bulan. Wijayani et al (2007) meneliti pengaruh NAA dan kinetin terhadap protokorm *Grammatophyllum*

*scriptum*. Feng dan Chen (2014) meneliti pengaruh TDZ terhadap embriogenesis *P. aphordite*. Quainoo dan Dwomo (2012) meneliti pengaruh kombinasi NAA dan TDZ terhadap berbagai jenis genotip embriogenesis coklat.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan kombinasi ZPT TDZ dan NAA secara *in vitro* terhadap perkembangan morfologi dan anatomi protokorm anggrek *P. amabilis* dan menentukan konsentrasi TDZ dan NAA yang paling optimum untuk meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan anggrek *P. amabilis* secara *in vitro*.

## Metode

Penelitian dilakukan selama dua bulan (26 Agustus – 25 September 2016) di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini menggunakan *protocorm* anggrek *P. amabilis* yang telah berumur 2 bulan. *Protocorm* diperoleh dari Windy Mose peneliti S2 Fakultas Biologi UGM.

Penggunaan medium dalam yang penelitian ini yaitu media NP dengan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan TDZ. Dicampurkan komponen media NP, sukrosa, dan akuades hingga 500 ml secara berurutan ke dalam erlenmeyer 500 ml dan *distirrer* sampai sukrosa larut. Medium dibagi rata dan ditambahkan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan TDZ (Tabel 1). Perlakuan medium diukur pHnya menggunakan indikator universal dan disesuaikan hingga pH larutan medium 5,2-6 dengan penambahan KOH 0,1 N atau HCl 0,1 N. Medium-medium tersebut ditambahkan agar dan dididihkan. Larutan medium disterilisasi menggunakan *autoclave* (121°C; 1 atm) selama 15 menit lalu dituang ke dalam petridish steril di dalam LAF dan dibiarkan beberapa menit hingga menjendal. Petridish ditutup dengan *seal plastic*.

Subkultur *protocorm* anggrek yang telah berumur 2 bulan dilakukan di dalam LAF. *Protocorm* ditanam dalam perlakuan medium dengan mengatur jarak antar eksplan yang ditanam dan diinkubasikan di dalam ruang inkubator. Pengamatan morfologi dilakukan setiap minggu selama 2 minggu untuk mengetahui pertumbuhan dan perkembangan *protocorm* anggrek.

Pembuatan preparat anatomi *protocorm* hasil induksi dengan penambahan kombinasi konsentrasi NAA dan TDZ (Tabel 1) selama 2 minggu menggunakan metode parafin dengan pewarnaan tunggal. Embrio somatik yang telah ditanam dalam perlakuan medium difiksasi dengan larutan FAA selama 24 jam. Embrio dicuci

berturut-turut dengan alkohol bertingkat mulai dari alkohol (70%; 80%; 95%; 100% I; 100% II) masing-masing selama 30 menit. Dealkoholisasi *protocorm* menggunakan campuran alkohol dan xilol dengan perbandingan 1:3, 1:1, 3:1 masing-masing selama 30 menit. Infiltrasi dilakukan dengan memasukkan embrio somatik ke dalam campuran xilol:parafin (1:9) dengan parafin murni 57°C selama 2x24 jam. Blok parafin dibuat setelah perendaman sampel selama 1 jam dan diiris menggunakan *rotary microtom* dengan ketebalan 10 µm. Irisan- direkatkan pada gelas benda yang sudah diolesi dengan campuran gliserin- albumin dan akuades, lalu dipanaskan dalam *hot plate*. Sebelum dilakukan pewarnaan, dilakukan deparafinisasi dengan cara berturut-turut preparat dimasukkan ke dalam xilol II, xilol I, alkohol/xilol (1:3), alkohol/xilol (1:1), alkohol/xilol (3:1), alkohol 100%, alkohol 100%, alkohol 95%, alkohol 80%, dan alkohol 70%, masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya, gelas benda dimasukkan dalam safranin 1% dalam alkohol 70% selama 24 jam. Preparat direndam dalam alkohol 70%, 80%, 95%, 100% I, 100% II, alkohol/xilol (3:1), alkohol/xilol (1:1), alkohol/xilol (1:3), serta xilol masing-masing selama 1 menit. Preparat ditetesi dengan balsam kanada dan dikeringkan. Preparat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dan Optilab.

Data yang diperoleh dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui pengaruh penambahan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan TDZ (Tabel 1) terhadap pertumbuhan dan perkembangan awal *protocorm* anggrek *P. amabilis* secara *in vitro*

yang telah berumur 2 bulan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu. Analisis secara morfologi dilakukan dengan melakukan pengamatan ukuran eksplan serta jumlah *protocorm* yang telah membentuk tunas dan *absorbing hair*. Kedua pengukuran digunakan untuk menentukan persentase pertumbuhan *protocorm* anggrek. Analisis secara anatomi dilakukan pengamatan berupa pengukuran panjang sel bagian tengah potongan melintang *protocorm*.

Tabel 1. Kombinasi Konsentrasi ZPT NAA dan TDZ

ZPT TDZ (ppm)	NAA (ppm)	
	0	0,2
0	N <sub>0</sub> T <sub>0</sub>	N <sub>0,2</sub> T <sub>0</sub>
0,5	N <sub>0</sub> T <sub>0,5</sub>	N <sub>0,2</sub> T <sub>0,5</sub>
1	N <sub>0</sub> T <sub>1</sub>	N <sub>0,2</sub> T <sub>1</sub>

Keterangan : NAA = Naptalene Acetic Acid (ppm), TDZ = Thidiazuron (ppm).

### Hasil Dan Pembahasan

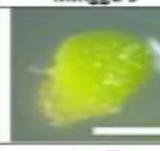
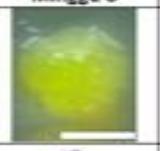
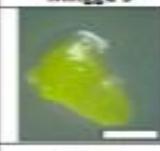
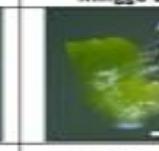
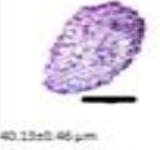
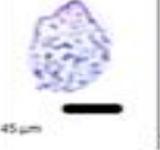
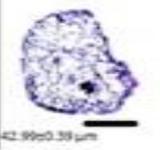
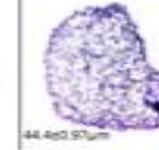
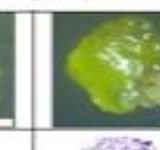
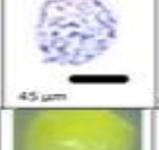
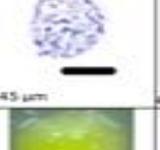
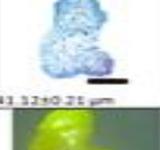
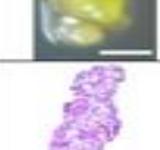
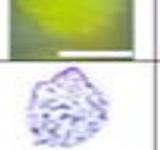
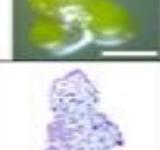
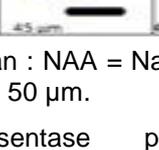
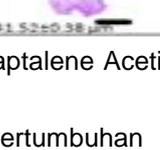
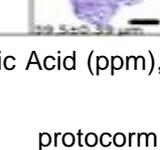
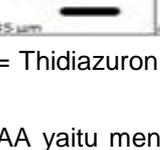
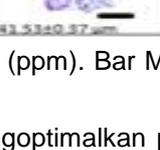
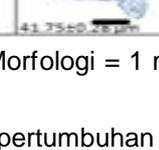
Hasil pengamatan morfologi dan anatomi *protocorm*, diperoleh perubahan morfologi dan anatomi embrio anggrek *P. amabilis* dengan variasi kombinasi konsentrasi NAA dan TDZ (Tabel 3) serta persentase pembentukan tunas dan *absorbing hair* pada *protocorm* (Tabel 4). Hasil persentase pertumbuhan tersebut dapat digunakan dalam menentukan konsentrasi NAA dan TDZ yang optimal untuk pertumbuhan embrio anggrek *P. amabilis*.

Tabel 2. Persentase Pertumbuhan Protokorm Anggrek *P.amabilis* pada medium dengan penambahan kombinasi NAA dan TDZ.

TDZ	NAA	0 ppm			0.2 ppm		
		Minggu 8	Minggu 9	Minggu 10	Minggu 8	Minggu 9	Minggu 10
0 ppm	0 ppm						
		(124/124)100%	(124/124)100%	(124/124)100%	(124/124)100%	(124/124)100%	(124/124)100%
		0.5 ppm	0.5 ppm				
(124/124)100%	(124/124)100%			(118/124)95.1%	(125/125)100%	(125/125)100%	(125/125)100%
1 ppm	1 ppm						
		(126/126)100%	(126/126)100%	(121/126)96%	(124/124)100%	(124/124)100%	(124/124)100%

Keterangan : NAA = Naptalene Acetic Acid (ppm), TDZ = Thidiazuron (ppm).

Tabel 3. Perkembangan Morfologi dan Anatomi Protocorm Anggrek *P.ambalis* secara In Vitro

NAA TDZ	0 ppm			0.2 ppm		
	Minggu 8	Minggu 9	Minggu 10	Minggu 8	Minggu 9	Minggu 10
0 ppm						
						
0.5 ppm						
						
1 ppm						
						

Keterangan : NAA = Naptalene Acetic Acid (ppm), TDZ = Thidiazuron (ppm). Bar Morfologi = 1 mm, Bar Anatomi = 50  $\mu$ m.

Persentase pertumbuhan protocorm anggrek *P. amabilis* dalam Tabel 2 pada minggu ke 8-10 hampir mencapai 100% di berbagai medium perlakuan dengan penambahan konsentrasi ZPT NAA dan TDZ kecuali pada medium dengan konsentrasi NAA:TDZ (0:0.5) ppm dan (0:1) ppm pada minggu ke-10. Hal ini disebabkan karena adanya kerusakan pada medium sehingga protocorm yang terdapat pada bagian tersebut tidak dapat mengalami pertumbuhan secara optimal.

Tabel 3 menunjukkan perkembangan morfologi dan anatomi protocorm anggrek *P. amabilis* dari minggu ke 8-10. Penambahan NAA dengan konsentrasi 0,2 ppm dapat mempercepat pertumbuhan melalui pembentukan *absorbing hair*. *Absorbing hair* merupakan struktur menyerupai rambut yang digunakan oleh eksplan untuk menyerap nutrisi yang ada di lingkungannya. *Absorbing hair* salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan dari eksplan, pada medium yang sesuai eksplan akan membentuk banyak *absorbing hair*. Konsentrasi NAA yang lebih tinggi pada eksplan akan membentuk lebih banyak *absorbing hair* sesuai dengan fungsi senyawa

NAA yaitu mengoptimalkan pertumbuhan dengan menginisiasi pembentukan RAM (*Root apical meristem*) atau yang biasa disebut sebagai calon akar. Namun, konsentrasi NAA yang terlalu tinggi justru menghambat pertumbuhan karena NAA bekerja pada konsentrasi yang rendah.

Penambahan TDZ dapat menambah ukuran protocorm melalui pembentukan tunas. TDZ merupakan salah satu golongan sitokinin yang banyak diteliti dibidang kultur jaringan untuk mempercepat pembelahan sel. Penambahan TDZ pada konsentrasi yang sesuai dapat meningkatkan proses pertumbuhan pada eksplan melalui pembentukan SAM (*Shoot apical meristem*) atau tunas. Berdasarkan hasil yang diperoleh (Tabel 3), penambahan TDZ dengan konsentrasi 0.5 ppm dapat menunjukkan persentase pembentukan tunas lebih tinggi dibanding kontrol dan konsentrasi lain. Hal ini disebabkan karena TDZ merupakan salah satu fitohormon yang dibutuhkan oleh tanaman dalam konsentrasi yang relatif rendah. Pada konsentrasi yang terlalu tinggi penambahan zat ini dapat menghambat pertumbuhan tanaman dan cenderung tidak berpengaruh.

Tabel 4. Persentase Protokorm Anggrek *P.amabilis* yang membentuk Tunas dan *Absorbing hair*

Medium	$\Sigma$ protokorm yang diamati	$\Sigma$ protokorm yang membentuk tunas	Persentase protokorm yang membentuk tunas	$\Sigma$ protokorm yang membentuk <i>absorbing hair</i>	Persentase protokorm yang membentuk <i>absorbing hair</i>
NP + N <sub>0</sub> + T <sub>0</sub>	50	12	24 %	5	10 %
NP + N <sub>0,2</sub> + T <sub>0</sub>	50	11	22 %	9	18 %
NP + N <sub>0</sub> + T <sub>0,5</sub>	50	16	32 %	7	14 %
NP + N <sub>0,2</sub> + T <sub>0,5</sub>	50	20	40 %	12	24 %
NP + N <sub>0</sub> + T <sub>1</sub>	50	20	40 %	8	16 %
NP + N <sub>0,2</sub> + T <sub>1</sub>	50	19	38 %	10	20 %

Keterangan : NP = New Phalaenopsis Medium, N=NAA, T=TDZ

Persentase pembentukan *absorbing hair* dan tunas paling baik terjadi pada konsentrasi NAA:TDZ (0,2 : 0,5) ppm disebabkan karena NAA dan TDZ bekerja secara sinergis dalam memacu pertumbuhan tanaman. Selain itu, konsentrasi TDZ yang optimum berperan penting dalam translokasi dan distribusi NAA serta diakumulasikan pada sel-sel yang memiliki totipotensi tinggi (Murch dan Saxena, 2001). Penambahan NAA tanpa TDZ hanya akan memicu pembentukan *absorbing hair*. Begitu pula penambahan TDZ tanpa NAA hanya akan memicu pembentukan SAM.

Penambahan NAA dilihat secara anatomi dapat meningkatkan ukuran sel, terutama pemanjangan sel pada konsentrasi rendah. NAA dapat meningkatkan plastisitas dinding sel sehingga sel akan mengalami pembentangan dengan lebih cepat ketika pertumbuhan berlangsung. NAA dapat menginisiasi pemanjangan sel dan memacu protein tertentu yang terdapat pada membran plasma sel tumbuhan untuk memompa ion H<sup>+</sup> ke dinding sel. Ion H<sup>+</sup> mengaktifkan enzim tertentu sehingga mampu memutus beberapa ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Sel tumbuhan akan memanjang akibat air yang masuk secara osmosis (Wattimena, 1988). Penambahan NAA sebesar 0,2 ppm menyebabkan ukuran sel menjadi lebih panjang pada pengamatan minggu ke-10 dibanding kontrol. Penambahan TDZ dapat meningkatkan pembelahan sel karena TDZ memiliki struktur menyerupai basa nukleotida adenin sebagai salah satu precursor pembelahan sel. Sel yang aktif membelah dicirikan dengan nukleus berukuran besar, sitoplasma berukuran kecil, banyak mengandung amilum, memiliki dinding primer dan lamela yang tipis dengan vakuola kecil.

Parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh ZPT NAA dan TDZ adalah melalui penyerapan zat warna safranin. Safranin merupakan senyawa *chloride* yang digunakan dalam pembuatan preparat anatomi maupun histologi organisme. Senyawa ini akan mewarnai

inti sel dari sampel yang akan diamati dengan memberikan warna merah. Sel yang aktif membelah akan menunjukkan penyerapan warna yang paling optimal dibandingkan sel yang lain. Hal ini disebabkan karena inti sel yang berukuran besar. Berdasarkan hasil pengamatan preparat anatomi yang telah dilakukan, adanya perbedaan penyerapan warna oleh sel pada bagian apikal, tengah dan basal. Pada medium NP tanpa perlakuan dan preparat anatomi minggu ke-8 sel memiliki intensitas warna yang sama karena sel baru disubkultur dan belum melakukan adaptasi dengan medium yang baru. Sel mulai menunjukkan adanya perbedaan intensitas warna mulai minggu ke-9 karena sel telah mengalami adaptasi dan telah mengalami pertumbuhan. Pada minggu ke-10 sel bagian basal terpulas lebih gelap dibandingkan sel disekitarnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada bagian tersebut sel aktif melakukan pembelahan dan diperkirakan sel selanjutnya akan membentuk RAM. Sedangkan pada konsentrasi NAA 0,2 ppm secara umum peningkatan intensitas warna baik pada sel apikal maupun sel basal di minggu ke-9 dan peningkatan intensitas warna paling baik terlihat pada kombinasi NAA dan TDZ (0,2 : 0,5) ppm karena sel terpulas paling jelas. Sedangkan untuk penambahan ZPT dari golongan TDZ secara umum dapat terlihat bahwa sel yang mempunyai intensitas warna yang paling baik yaitu sel apikal yang selanjutnya akan menjadi SAM.

## Simpulan

Penambahan kombinasi NAA dan TDZ dapat mempercepat proses pertumbuhan dan perkembangan protokorm anggrek. Kombinasi konsentrasi NAA dan TDZ yang paling optimal dalam meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan protokorm anggrek secara morfologi dan anatomi adalah 0,2 : 0,5 ppm

## Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc., Dr. rer. nat. Ari

## Daftar Referensi

- Bey, Y., Syafii, W., dan Sutrisna. 2006. Pengaruh Pemberian Giberilin (GA3) dan Air Kelapa Terhadap Perkecambahan Bahan Biji Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* BL) Secara *In vitro*. *Jurnal Biogenesis*. 2(2):41-46.
- Chugh. S., Guha, S., and Rao, I.U. 2009. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Sci Hortic*, 122(4): 507-520.
- Comber, J.B. 1990. *Orchids of Java*. Charoen Slip Press. Bangkok. pp. 219.
- Dressler, R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA.
- George, E.F and P.D. Sherrington, 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Ltd, England. 709 p
- Islam, M.O., Ichihashi. S., and Matsui, S. 1998. Control of growth and development of protocorm like body derived from callus by carbon sources in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnol* 15: 183–187.
- Iswanto, H. 2002. *Petunjuk Perawatan Anggrek*. Jakarta : Agromedia Pustaka.
- Lu, C., 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro Cell Dev. Biol.* 29 : 92-96.
- Puspitaningtyas, D.M. 2010. *Phalaenopsis amabilis*, Bunga Nasional Indonesia. <http://pai.or.id/artikel/6-spesies/6-phalaenopsis-amabilis-bunga-nasionalindonesia.html>. 7 September 2016.
- Indrianto, S.U., seluruh staf di laboratorium Bioteknologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, dan anggota BiOSC (Biology Orchid Study Club) yang telah membantu selama penelitian.
- Razdan, M.K. 2003. *Introduction to Plant Tissue Culture*. 2<sup>nd</sup> ed. Science Publishers, Inc. India. P: 71, 72.
- Semiarti, E., A. Indrianto, A. Purwantoro, S. Isminingsih, N. Suseno, T. Ishikawa, Y. Yoshioka, Y. Machida, and C. Machida. 2007. Agrobacterium mediated Transformation of The Wild Orchid Species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnol* 24 : 265-272.
- Sutater, T. dan D.S. Badriah. 1994. Koleksi dan Karakterisasi Anggrek *Phalaenopsis amabilis*. *Bull. Penel. Tan. Hias*. 2(1) : 57-65
- Sutrian, Y. 2004. *Pengantar Anatomi Tumbuh-Tumbuhan (Tentang Sel dan Jaringan)*. Rineka Cipta. Jakarta. Hal.22, 32.
- Wattimena G.A. 1988. Peranan kultur Jaringan dalam Mempertinggi Produksi Pertanian di Indonesia. Makalah pada Seminar Kultur Jaringan Tanaman FP. Unibraw, Malang, 24 hal.
- Wijayani Y, Solichatun, and W. Mudyantini. 2007. The Shoot Growth And Anatomical Structure Of Protocorm Like Body Of *Grammatophyllum Scriptum* (Lindl.) Bl. After Kinetin And NAA Application. *Bioteknologi* 4 (2): 33-40.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman; Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya*. Bumi Aksara, Jakarta.