

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Sejarah, Morfologi dan Sistematika Anggrek Bulan

Anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) adalah salah satu bunga nasional Indonesia. Indonesia sendiri memiliki tiga bunga nasional yang ditetapkan melalui Keputusan Presiden Nomor 4/1993, yaitu bunga melati (*Jasminum sambac*) sebagai puspa bangsa, bunga padma raksasa (*Rafflesia arnoldii*) sebagai puspa langka, dan bunga anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis*) sebagai puspa pesona (Puspitaningtyas, 2010). Menurut Rukmana (2008), kedudukan tanaman anggrek bulan dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut :

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Orchidales
Suku	: Orchidaceae
Marga	: <i>Phalaenopsis</i>
Jenis	: <i>Phalaenopsis amabilis</i>

Sejarah ditemukannya tanaman anggrek bulan terjadi pada abad ke-17. Rumphius disebut sebagai orang yang pertama kali menemukan spesies anggrek bulan di Ambon pada tahun 1750, yang kemudian diberi nama *Epidendrum albummajus*. Pada tahun 1753, Linnaeus memberikan nama *Epidendrum amabilis* pada spesies anggrek bulan di Nusakambangan, yang kemudian diberi nama *Phalaenopsis amabilis*. Sejak saat itu sampai sekarang, anggrek bulan dikategorikan dalam genus *Phalaenopsis* (Rukmana, 2008).

Anggrek bulan adalah salah satu spesies dari genus *Phalaenopsis* yang dianggap cukup penting karena peranannya sebagai induk dapat menghasilkan berbagai keturunan atau hibrida. Keistimewaan lainnya adalah mampu berbunga sepanjang tahun dengan masa rata-rata berbunga selama satu bulan (Iswanto, 2008). Anggrek bulan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman Anggrek Bulan (Dokumen Pribadi)

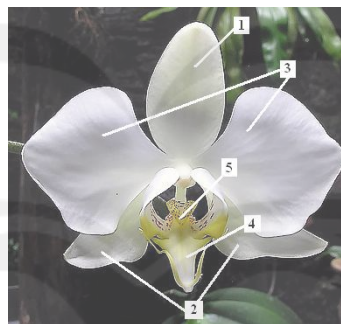
Anggrek bulan termasuk anggrek epifit monopodial yang tumbuh menjuntai. Batangnya sangat pendek dan terbungkus oleh seludang daun. Daunnya berjumlah kurang dari lima helai, berwarna hijau, tebal, berdaging, berbentuk lonjong bulat telur sungsang atau jorong, melebar di bagian ujungnya, berujung tumpul, atau sedikit meruncing, dengan panjang 20-30 cm dan lebar 5-8 cm. Daun anggrek bulan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Daun Anggrek Bulan (Dokumen Pribadi)

Bunga anggrek bulan tersusun dalam tandan dan kadang-kadang bercabang dengan panjang karangan bunga mencapai 50 cm yang tumbuh menjuntai. Setiap tangkai mendukung 10-12 kuntum bunga dengan daun penumpu 5 mm berbentuk segitiga, bunganya cukup harum dan waktu mekarnya lama. Perhiasan bunga tersusun membulat dengan diameter 6-10 cm atau lebih dan mahkotanya bertumpang tindih dengan kelopak tersusun membundar (Puspitaningtyas, 2010).

Warna bunga putih bersih dengan sedikit variasi kuning dan bintik kemerahan di bibir bunga. Bibir kedua cuping samping tegak melebar dan bagian tepi depannya berwarna kuning dengan garis kemerahan. Buah berbentuk bulat lonjong, berukuran 7,5 x 1,3 cm (Puspitaningtyas, 2010). Bunga anggrek bulan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Bunga Anggrek Bulan (Dokumen Pribadi)

Keterangan : 1 = *sepal dorsale*, 2 = *sepal latelaria*, 3 = *petal latelaria*, 4 = *labellum*, 5 = *column*

Akar anggrek bulan berbentuk bulat memanjang serta berdaging, bercabang, berwarna putih dan hijau di bagian ujungnya (Puspitaningtyas, 2010). Menurut Rukmana (2008), akar tanaman anggrek bulan terdiri dari dua macam yaitu akar lekat dan akar udara. Akar lekat berfungsi untuk melekat dan menahan keseluruhan tanaman agar tetap berada pada posisinya, sedangkan akar udara

berperan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman karena berkemampuan menyerap unsur hara.

B. Syarat Pertumbuhan Anggrek Bulan

Anggrek bulan dapat tumbuh di dataran rendah sampai pegunungan dan umumnya hidup pada ketinggian 50-600 m dpl, juga dapat berkembang dengan baik pada ketinggian 700-1.100 m dpl. Anggrek ini tumbuh epifit atau menempel di pohon yang cukup rindang dan menyukai tempat yang teduh serta lembab, terutama di hutan basah dengan curah hujan 1.500-2.000 mm/tahun. Walau tumbuh di daerah tropis, anggrek ini membutuhkan sedikit cahaya matahari (12.000-20.000 lux) sebagai penunjang hidupnya karena tidak tahan terhadap sengatan matahari langsung. Kelembaban udara yang diperlukan rata-rata 70-80% dengan suhu udara hangat di bawah 29°C (Puspitaningtyas, 2010).

Anggrek bulan memiliki karakter tumbuh monopodial, sehingga tidak menghasilkan anakan ke samping. Dalam hal ini, perbanyakan *Phalaenopsis* akan lebih efektif dilakukan secara generatif daripada vegetatif. Proses perkecambahan biji dilakukan di laboratorium, yaitu dalam medium agar buatan yang dilakukan secara steril (Puspitaningtyas, 2010).

C. Embriogenesis Somatik dan Manfaatnya

Salah satu teknik *in vitro* yang dapat digunakan untuk penggandaan bibit bermutu dalam jumlah banyak adalah embriogenesis somatik (Purnamaningsih, 2002). Menurut William dan Maheswara (1986), embriogenesis somatik merupakan suatu proses perkembangan sel-sel somatik (baik haploid maupun

diploid) membentuk tumbuhan baru melalui tahapan perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet.

Menurut Wiendi dkk. (1991), embrio somatik dapat terbentuk melalui dua jalur, yaitu secara langsung dan tidak langsung (melewati fase kalus). Embriogenesis somatik langsung ialah proses perkembangan embrio yang terjadi secara langsung pada potongan eksplan tanpa melalui fusi gamet dan terjadi pada eksplan yang masih muda (George dan Sherrington, 1984). Embriogenesis tidak langsung ialah proses perkembangan embrio melalui pembentukan kalus yang berasal dari akar, tangkai daun, tangkai bunga, daun, batang, atau embrio zigot yang mampu membentuk kalus embriogenik (Chawla, 2000). Menurut Dublin (1981) dan Ramos dkk. (1993), embriogenesis langsung memerlukan waktu lebih singkat untuk menghasilkan *plantlet* dan kemungkinan terjadinya penyimpangan akibat keragaman somaklonal lebih kecil dibandingkan embriogenesis tidak langsung.

Embriogenesis mempunyai beberapa tahap spesifik, yaitu induksi sel dan kalus embriogenik, pendewasaan, perkecambahan, dan *hardening*. Pada tahap induksi kalus embriogenik dilakukan isolasi eksplan dan penanaman eksplan pada medium tumbuh yang mengandung auksin dengan konsentrasi tinggi atau yang mempunyai daya aktivitas yang kuat. Tahap pendewasaan adalah tahap perkembangan dari struktur globular membentuk kotiledon dan primordia akar. Pada tahap ini sering digunakan auksin pada konsentrasi rendah (Bhojwani dan Razdan, 1989).

Tahap perkecambahan adalah fase saat embrio somatik membentuk tunas dan akar. Pada medium perkecambahan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan sangat rendah atau bahkan tidak diberikan sama sekali. Tahap *hardening*, yaitu tahap aklimatisasi bibit embrio somatik dari kondisi *in vitro* ke lingkungan baru di rumah kaca dengan penurunan kelembaban dan peningkatan intensitas cahaya (Purnamaningsih, 2002).

Menurut Mariska (1996), regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik memberikan banyak keuntungan, antara lain: waktu perbanyak cepat, pencapaian hasil dalam mendukung program perbaikan tanaman cepat, dan jumlah bibit yang dihasilkan tidak terbatas jumlahnya. Menurut Zulkarnain (2009), suatu keuntungan yang nyata dari embriogenesis somatik adalah embrio-embrio somatik yang dihasilkan bersifat bipolar, yakni memiliki ujung-ujung akar dan pucuk yang diperlukan untuk pertumbuhan tanaman lengkap. Pada organogenesis, perkembangan pucuk dan akar sering terjadi secara terpisah dan sangat tergantung pada perubahan medium.

Cara embriogenesis somatik banyak mendapat perhatian karena jumlah propagula yang dihasilkan tidak terbatas dan dapat diperoleh dalam waktu yang singkat. Selain itu untuk mendukung program pemuliaan tanaman melalui rekayasa genetika, penggunaan embrio somatik dapat mempercepat keberhasilan peluang transformasi yang tinggi karena embrio somatik dapat berasal dari satu sel somatik. Untuk penyimpanan jangka pendek maupun jangka panjang, embrio somatik dianggap merupakan bahan tanaman yang ideal untuk disimpan karena bila diregenerasikan dapat membentuk bibit somatik (Purnamaningsih, 2002).

D. Kalus

Kalus adalah suatu kumpulan sel *amorphous* yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus. Pembentukan kalus pada jaringan luka dipacu oleh zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen (Dodds dan Roberts, 1983). Secara *in vivo*, kalus pada umumnya terbentuk pada bekas-bekas luka akibat serangan infeksi mikroorganisme seperti *Agrobacterium tumefaciens*, gigitan atau tusukan serangga dan nematoda. Kalus juga dapat terbentuk sebagai akibat stress (George dan Sherrington, 1984).

Sel-sel penyusun kalus berupa sel parenkim yang mempunyai ikatan yang renggang dengan sel-sel lain. Dalam kultur jaringan, kalus dapat dihasilkan dari potongan organ yang telah steril, di dalam medium yang mengandung auksin dan kadang-kadang juga sitokinin. Organ tersebut dapat berupa kambium vaskular, parenkim cadangan makanan, perisikel, kotiledon, mesofil daun, dan jaringan provaskular (George dan Sherrington, 1984).

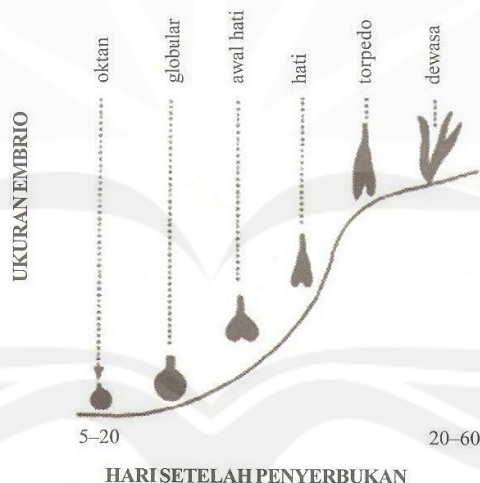
Kalus mempunyai pertumbuhan yang abnormal dan berpotensi untuk berkembang menjadi akar, tunas, dan embrioid yang dapat membentuk *plantlet* (George dan Sherrington, 1984). Beberapa kalus ada yang mengalami pembentukan lignifikasi (penebalan dengan zat kayu) sehingga kalus tersebut mempunyai tekstur yang keras dan kompak. Namun ada kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi fragmen-fragmen yang kecil, kalus yang demikian dikenal dengan kalus remah (*friable*).

Warna kalus tergantung dari jenis sumber eksplan itu diambil, seperti warna kekuning-kuningan, putih, hijau, atau kuning kejingga-jinggaan.

Kemampuan pembentuk kalus dari jaringan tergantung dari umur fisiologis dari jaringan pada waktu diisolasi, musim pada waktu bahan tanaman diisolasi, bagian tanaman yang dipakai dan jenis tanaman (George dan Sherrington, 1984).

E. Embrio Somatik

Sel-sel kalus yang berubah bentuk menyerupai embrio dinamakan embrio somatik (Ammirato, 1992). Embrio somatik adalah embrio yang bukan berasal dari zigot, tetapi dari sel tubuh tanaman. Embrio somatik biasanya berasal dari sel tunggal yang kompeten dan berkembang membentuk fase globular, hati, torpedo, dan akhirnya menjadi embrio somatik dewasa yang siap dikecambahkan membentuk *plantlet* / tanaman utuh (Pardal dkk., 2001).



Gambar 4. Tahapan Pembentukan Embrio Zigotik Selama Embriogenesis
(Sumber : Zulkarnain, 2009)

Embrio somatik tumbuh dan berkembang melewati tahapan-tahapan yang sama seperti embrio zigotik yang berkembang dari penyatuan gamet jantan dan gamet betina. Tahapan pembentukan embrio zigotik dapat dilihat pada Gambar 4 adalah oktan, globular, awal hati, hati, torpedo, dan embrio dewasa (Zulkarnain, 2009). Pada penelitian yang dilakukan Utami dkk. (2009), NAA dengan

konsentrasi 2 mg/L, 3 mg/L, dan 4 mg/L dapat membentuk kalus hijau kekuningan dengan embrio somatik fase globular pada permukaan kalus sedangkan perlakuan dengan 0,1 mg/L dan 1 mg/L tidak membentuk embrio.

F. Faktor Yang Mempengaruhi Pembentukan Embrio Somatik

Menurut Purnamaningsih (2002), faktor yang mempengaruhi pembentukan embrio somatik adalah:

1. Jenis eksplan

Penggunaan eksplan yang bersifat meristematik umumnya memberikan keberhasilan pembentukan embrio somatik yang lebih tinggi. Eksplan yang digunakan dapat berupa aksis embrio zigotik muda dan dewasa, kotiledon, mata tunas, epikotil maupun hipokotil. Eksplan yang digunakan dapat berbeda tergantung jenis tanaman dan tahap perkembangan dari eksplan.

2. Sumber nitrogen

Embriogenesis somatik mengalami proses perkembangan morfologi seperti yang terjadi pada embrio zigotik. Faktor yang penting dalam induksi dan perkembangan embriogenesis somatik adalah komposisi nutrisi pada medium kultur. Nitrogen merupakan faktor utama dalam memacu morfogenesis secara *in vitro*. Inisiasi dan pendewasaan embrio somatik memerlukan keseimbangan yang tepat antara NH_4^+ dan NO_3^- . Konsentrasi NO_3^- yang terlalu tinggi akan meningkatkan pH medium sehingga kalus tidak dapat membentuk embrio somatik.

3. Gula

Gula merupakan salah satu komponen organik yang harus diberikan ke dalam medium tumbuh. Gula berfungsi di samping sebagai sumber karbon, juga berguna untuk mempertahankan tekanan osmotik medium. Menurut Percy dkk. (2000), umumnya produksi embrio meningkat pada medium yang tekanan osmotiknya tinggi.

4. Zat pengatur tumbuh

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa organik yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan kultur. Promotor yang digunakan antara lain auksin (2,4-D, 3,5-T, picloram, dan NAA), sitokinin (BA, kinetin, dan adenine sulfat), GA₃, dan inhibitor ABA. Konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan tergantung pada tahap perkembangan yang terjadi.

G. Eksplan

Eksplan yaitu bagian tanaman yang dijadikan bahan inokulum awal yang ditanam dalam medium, yang akan menunjukkan pertumbuhan perkembangan tertentu (Gunawan, 1987). Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan sebaiknya merupakan bagian yang mempunyai sel aktif membelah, berasal dari tanaman induk yang sehat dan berkualitas tinggi. Meskipun pada prinsipnya semua sel dapat ditumbuhkan, tetapi sebaiknya eksplan dipilih dari bagian tanaman yang masih muda, yaitu daun muda, ujung akar, ujung batang, keping biji atau tunas (Ambarwati, 1992).

Menurut George dan Sherrington (1984), ukuran eksplan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan eksplan *in vitro*. Apabila eksplan terlalu kecil menyebabkan ketahanan eksplan yang kurang baik dalam kultur dan apabila eksplan terlalu besar, akan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme.

Menurut Santosa dan Nursandi (2003), bahan yang umum digunakan untuk kultur jaringan adalah :

1. Sel, biasanya ditanam dalam bentuk suspensi dengan kepadatan tertentu.
2. Protoplas, biasanya dalam bentuk suspensi dengan kepadatan yang telah ditentukan. Mesofil daun, teras batang dan kalus merupakan bagian yang umum digunakan sebagai sumber protoplas.
3. Jaringan meristem, jaringan tanaman yang terdapat pada daerah-daerah pertumbuhan. Ciri jaringan ini adalah tersusun oleh sekelompok sel yang aktif membelah sehingga belum ada spesialisasi bentuk dan fungsi dari sel-sel penyusunnya.
4. Kalus, merupakan massa sel yang bersifat meristematis dan belum terdeferensiasi. Kalus umumnya berwarna krem pucat atau putih, berbutir halus, remah dan bersifat hidup.
5. Organ, paling umum digunakan meliputi akar, batang, daun, biji, tunas, embrio, anther, kepala sari dan lain-lain.

Penggunaan daun anggrek *Phalaenopsis amabilis* sebagai eksplan dalam embriogenesis somatik telah dilakukan oleh Rianawati dkk. (2009) dan Utami dkk. (2009). Daun anggrek tersebut diambil *plantlet* hasil perkecambahan secara *in vitro*. Menurut Arditi dan Ernst (1994), daun *plantlet* hasil perkecambahan atau

induksi tunas secara *in vitro* tidak memerlukan proses sterilisasi karena sudah dalam keadaan steril.

H. Medium Tanam Kultur Jaringan

Medium Ichihashi New Phalaenopsis (NP) mengandung makronutrien dan mikronutrien yang diuraikan oleh Ichihashi (1992), dimodifikasi untuk mengandung NH_4NO_3 sebanyak 82,0 mg. Menurut Narayanaswamy (1990), untuk inisiasi embriogenesis somatik diperlukan konsentrasi garam (KNO_3 dan NH_4NO_3) yang tinggi. Komposisi medium NP dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Medium New Phalaenopsis (NP)

Bahan	Berat (mg)
NH_4NO_3	82,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	303,9
<i>Boric acid</i>	3,1
<i>Calcium nitrate</i>	637,6
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0125
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0125
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
<i>Magnesium nitrate</i>	256,4
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	11,2
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,125
KI	0,415
KNO_3	424,0
KH_2PO_4	426,7
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,3
<i>Gellan Gum, CultureGel-Biotech</i>	3.000
<i>Glycine</i>	2
<i>Myo-Inositol</i>	100
<i>Nicotinic acid</i>	0,5
<i>Pyridoxine HCl</i>	0,5
<i>Sucrose</i>	20.000
<i>Thiamine HCl</i>	0,1

(Sumber : MBC Cell Korea)

Menurut George (1993), untuk menghasilkan pro-embrio, pertumbuhan dan perkembangan sel-sel embriogenik membutuhkan medium yang mengandung

nitrogen reduksi dan oksidasi. Kandungan ammonium (NH_4^+) yang cukup tinggi dapat mendukung proses diferensiasi embrio somatik untuk tumbuh dan berkembang menjadi *plantlet* normal, karena konsentrasi ammonium dalam medium kultur dapat memengaruhi asam amino dan sintesis protein serta diferensiasi embrio somatik (George, 1993). Menurut Krikorian (1995) dan Adkins dkk. (2002), nitrogen reduksi (ammonium) dibutuhkan mulai dari pra-globular hingga terbentuk embrio somatik.

I. Zat Pengatur Tumbuh

Fitohormon adalah senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi secara endogen. Senyawa tersebut berperan merangsang dan meningkatkan pertumbuhan serta perkembangan sel, jaringan, dan organ tanaman menuju arah diferensiasi tertentu. Senyawa-senyawa lain yang memiliki karakteristik yang sama dengan hormon tetapi diproduksi secara eksogen, dikenal sebagai zat pengatur tumbuh. Macam-macam zat pengatur tumbuh yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat, dan etilen (Zulkarnain, 2009).

Menurut George dan Sherington (1984), pertumbuhan dan morfogenesis secara *in vitro* diatur oleh interaksi dan keseimbangan antara hormon tanaman yang ditambahkan pada medium (hormon eksogen) dan hormon tanaman yang dihasilkan sendiri oleh sel yang dikulturkan (hormon endogen). Menurut Hendaryono dan Wijayanti (1994), pemberian hormon eksogen akan menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesa protein dan permeabilitas sel terhadap air, serta melunakkan dinding sel yang diikuti dengan menurunnya tekanan dinding

sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel dan sel akan membesar dan memanjang.

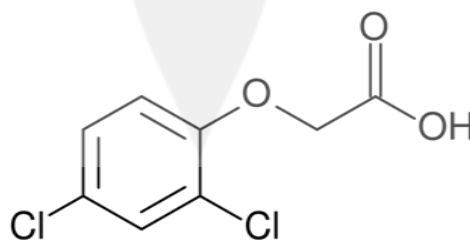
Dalam kultur jaringan, auksin berperan dalam pembentukan kalus, klorofil, morfogenesis akar, tunas serta embriogenesis (Wattimena, 1992). Menurut Gardner dkk. (1991), hormon yang biasa digunakan untuk induksi kalus adalah golongan auksin seperti 2,4-D dan NAA. Menurut Salisbury dan Ross (1995), mekanisme yang dikenal sebagai hipotesis pertumbuhan asam menyatakan bahwa auksin menyebabkan sel penerima pada potongan eksplan mengeluarkan H^+ ke dinding sel primer yang mengelilinginya dan menurunkan pH sehingga terjadi pengenduran dinding dan pertumbuhan yang cepat. pH rendah ini diduga bekerja dengan cara mengaktifkan beberapa enzim perusak dinding sel, yang tidak aktif pada pH tinggi. Enzim tersebut diduga memutuskan ikatan pada polisakarida dinding, sehingga memungkinkan dinding lebih mudah meregang.

Umumnya spesies tanaman membutuhkan konsentrasi auksin yang tinggi (biasanya 2,4-D) untuk induksi embriogenesis somatik sedangkan sitokinin tidak dibutuhkan, tetapi pada spesies tertentu dari tanaman monokotil dibutuhkan sitokinin (Laublin dkk., 1991). Menurut Schiavone dan Cooke (1987), auksin mempunyai peranan besar dalam proses diferensiasi sel menjadi embrio somatik. Menurut Gray (2005), auksin dibutuhkan dalam menginduksi pembentukan sel embrionik dengan menginisiasi aktivitas *differential gene* dan memanipulasi sekumpulan gen untuk meningkatkan populasi sel embrionik melalui pembelahan sel secara berulang-ulang, serta menstimulasi terjadinya diferensiasi sel dan terjadinya embrio.

Menurut Ammirato (1982), konsentrasi optimal dari zat pengatur tumbuh untuk embrio somatik berbeda-beda dan sifatnya spesifik untuk setiap genotip tanaman. Pada tahap pembentukan struktur globular dan hati dalam embriogenesis somatik sering digunakan zat pengatur tumbuh sitokinin seperti benzyladenin (BA) atau yang mempunyai peran fisiologis yang sama yaitu thidiazuron (Husni dkk., 1997) atau 2,4-D, dan NAA apabila embrio somatik melalui fase kalus (Hutami dkk., 2002). Hasil penelitian Utami dkk. (2009), menunjukkan bahwa NAA 2 mg/L adalah konsentrasi yang optimum untuk induksi kalus embriogenik dan inisiasi embrio somatik dari eksplan pangkal daun anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume.

J. Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetat)

Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan golongan auksin yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik pada sereal dan berperan untuk memacu hipermetilasi pada DNA agar pembelahan sel selalu dalam fase mitosis sehingga pembentukan kalus menjadi maksimal (Menneses dkk., 2005). Kalus embriogenik dapat diinduksi dengan adanya 2,4-D pada basal medium (Phillips dkk., 1995). Struktur kimia zat pengatur tumbuh 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur Kimia ZPT 2,4-D (Sumber : Abidin, 1985)

ZPT 2,4-D mempunyai sifat yang stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim yang dikeluarkan oleh sel atau saat pemanasan pada proses sterilisasi, tersedia, murah dan efektif memacu pembentukan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Menurut Guerra dan Handri (1998), konsentrasi 2,4-D yang tinggi dalam medium induksi kalus dapat menghambat perkecambahan embrio somatik. Pada suatu dosis tertentu asam 2,4-D dapat membuat mutasi (Suryowinoto, 1996).

Pemakaian zat pengatur tumbuh asam 2,4-D biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu yang singkat antara 2-4 minggu karena merupakan auksin kuat, artinya auksin ini tidak dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Menurut Wattimena (1992), 2,4-D mempunyai sifat fitotoksisitas yang tinggi sehingga dapat bersifat herbisida. Menurut Zulkarnain (2009), 2,4-D dapat meningkatkan peluang terjadinya mutasi genetik dan menghambat fotosintesis pada tanaman yang diregenerasikan.

K. Air Kelapa

Air kelapa merupakan endosperma cair buah kelapa dan sering digunakan dalam kultur jaringan tanaman anggrek. Air kelapa dilaporkan mengandung senyawa-senyawa kompleks yang berperan sebagai faktor pertumbuhan tanaman mencakup vitamin, asam amino, dan sitokinin. Konsentrasi air kelapa yang biasa dipakai untuk medium kultur jaringan adalah antara 10 - 15%/Liter atau setara dengan 100 -150 ml/Liter, dapat juga sampai 200 ml/Liter (Hendaryono dan Wijayanti, 1994).

Senyawa N-difenil urea yang terdapat dalam air kelapa dilaporkan mempunyai fungsi fisiologis yang sama dengan sitokinin, yaitu berperan dalam pembelahan sel selama proses regenerasi jaringan tanaman (Roostika dkk., 2009). Zeatin merupakan sitokinin alami yang terdapat dalam tanaman. Biosintesis zeatin terutama di ujung akar dan dalam biji yang sedang berkembang (Wattimena dkk., 1992).

L. Hipotesis

1. Zat pengatur tumbuh 2,4-D sebanyak 2 mg/L merupakan konsentrasi paling baik untuk induksi kalus embriogenik dan inisiasi embrio somatik anggrek bulan.
2. Hasil morfologi dan fase embrio somatik dari induksi kalus embriogenik dan inisiasi embrio somatik anggrek bulan yaitu warna kalus embriogenik hijau kekuningan, bertekstur remah dan embrio tipe globular.