

Keragaan dan Karakter Fase Pertumbuhan In Vitro Putatif Mutan Anggrek Hitam Kalbar Hasil Induksi Mutasi Secara Kimia

Performance and Characteristics of the In Vitro Growth Phase Putative Mutant Black Orchid in West Kalimantan Results of Chemical Induction of Mutations

Asnawati dan Agustina Listiawati

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian
Universitas Tanjungpura
email : asnawati@faperta.untan.ac.id

Abstract

Putatif mutants of West Kalimantan black orchids obtained through mutation activities need to be evaluated for their growth character and performance early, starting from the vegetative phase at the in vitro stage. This study aims to determine the performance and character of the in vitro putatif growth phase of West Kalimantan black orchid mutants. The research was carried out at the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agriculture, Tanjungpura University from April-October 2023. The experiment was conducted using Complete Randomized Design. As a treatment were 6 in vitro bud clones of black anggrek (5 putatif mutant clones derived from 5 EMS concentration levels and 1 wild type plant clone as kontrol). The clones are K (as kontrol plant) and M, N, O, P and Q clones each resulting from EMS concentration 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1.00 and 1.25%. The treatment was repeated 5 times and each repetition consisted of 5 samples, resulting in a total of 150 experimental units. Variabels observed include: Changes in plant weight, time of emergence of shoots, time of emergence of roots, increase in the number of leaves, number of shoots and number of roots. The results of the study showed that the mutant mutant M clone had the best fertility compared to other clones and control plants. There was a difference in vitro growth phase characteristics in all mutant clones of black orchids compared to control plants, except that the clone O still showed the same growth characteristics as the control plants.

Keywords : Black orchid, In vitro, Performance, Putatif Mutant, Vegetative growth

Abstrak

Putatif mutan anggrek hitam Kalimantan Barat yang diperoleh melalui kegiatan mutasi perlu dievaluasi keragaan dan karakter pertumbuhannya sejak dini, yang dimulai dari fase vegetative pada tahap in vitro. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaan dan karakter fase pertumbuhan in vitro putatif mutan anggrek hitam Kalbar. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura dari bulan April-Oktober 2023. Percobaan dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Sebagai perlakuan adalah 6 klon tunas in vitro anggrek hitam (5 klon putatif mutan yang berasal dari 5 taraf konsentrasi EMS dan 1 klon tanaman wild type sebagai kontrol). Klon-klon tersebut adalah K (sebagai tanaman kontrol) dan klon M, N, O, P dan Q yang masing-masing dihasilkan dari konsentrasi EMS 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 dan 1,25%. Perlakuan diulang sebanyak 5 kali dan tiap ulangan terdiri dari 5 sampel, sehingga keseluruhan terdapat 150 unit percobaan. Variabel yang diamati meliputi : Perubahan bobot tanaman, waktu

muncul tunas, waktu muncul akar, penambahan jumlah daun, jumlah tunas dan jumlah akar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa putatif mutan klon M memiliki keragaan yang terbaik dibanding klon-klon lainnya maupun tanaman kontrol. Terdapat perbedaan karakter fase pertumbuhan *in vitro* pada semua klon putatif mutan anggrek hitam dibanding tanaman kontrol, kecuali klon O masih menunjukkan karakter pertumbuhan yang sama dengan tanaman kontrol.

Kata Kunci : Anggrek hitam, In vitro, Keragaan, Pertumbuhan vegetatif, Putatif Mutan

PENDAHULUAN

Tanaman anggrek termasuk dalam famili *Orchidaceae* yang merupakan salah satu keluarga tanaman bunga-bunga yang paling besar. Karakteristik anggrek yang unik menjadi daya tarik tersendiri, sehingga banyak diminati oleh konsumen, termasuk anggrek hitam. Tanaman anggrek hitam memerlukan kondisi kelembaban yang cukup tinggi untuk pertumbuhan yang optimal (Maimunah dan Syahbudin 2020). Selain memiliki keindahan, anggrek hitam juga memiliki kehususan tertentu sebagai tanaman endemik di suatu daerah sehingga rentang keragaman genetiknya sempit, termasuk anggrek hitam Kalimantan Barat (Kalbar). Oleh karena itu, sangat perlu untuk melakukan upaya-upaya untuk meningkatkan keragaman karakteristik dari anggrek hitam tersebut, salah satunya melalui kegiatan mutasi.

Perubahan genetik yang terjadi akibat adanya mutasi bukanlah disebabkan oleh perubahan rekombinasi, melainkan terjadi secara acak berupa eliminasi, penambahan gen-gen tertentu pada tempat tidak seharusnya, sehingga kejadiannya *unpredictable* (Lestari, 2016). Hal ini berbeda dengan pemuliaan melalui persilangan, pemuliaan mutasi dapat digunakan untuk memperoleh varietas

unggul dengan memperbaiki beberapa sifat yang diinginkan, tanpa mengubah sebagian besar sifat baiknya.

Kegiatan mutasi dapat dilakukan secara kimia menggunakan bahan kimia tertentu seperti *ethyl metano sulfonate* (EMS) maupun secara fisik melalui radiasi. Selanjutnya individu-individu baru yang diduga telah mengalami mutasi perlu dilakukan evaluasi untuk mengidentifikasi perubahan yang terjadi. Secara dini evaluasi dapat dilakukan ditingkat *in vitro* pada fase vegetatif untuk menilai keragaan pertumbuhan atau performa putatif mutan yang dihasilkan, misalnya perubahan karakter morfologinya.

Identifikasi morfologi adalah proses yang digunakan untuk mengetahui karakter fenotip dari suatu tanaman. Identifikasi ini dapat dilakukan melalui proses karakterisasi pada tanaman yang telah diperlakukan dengan EMS tersebut. Karakterisasi membantu dalam memahami perbedaan morfologi yang dimiliki tanaman. Walaupun banyak pendekatan yang dipakai dalam sistem klasifikasi, namun semuanya berpangkal pada karakter morfologi (Brando & Darmawan, 2019).

Karakterisasi secara morfologi dapat dilakukan dengan mengamati karakter-karakter morfologi yang ditunjukkan oleh tanaman sejak fase vegetatif, bahkan saat

tanaman masih didalam botol atau secara *in vitro* (Hartati dan Darsana. 2015). Kegiatan ini akan banyak menghemat waktu, terutama untuk tanaman-tanaman yang secara genetik memang pertumbuhannya lambat, seperti pada tanaman anggrek termasuk anggrek hitam. Karakterisasi anggrek dilakukan dengan mengamati ciri morfologi yang terdapat pada masing-masing anggrek dengan menggunakan panduan karakterisasi tanaman hias dari Komisi Nasional Plasma Nutfah (2004). Karakterisasi berdasarkan karakter morfologi (daun, batang, umbi, buah, akar) dapat menentukan jenis pemanfaatan dari tanaman yang dikarakterisasi. Beberapa varian hasil induksi mutasi melalui perendaman dalam EMS mengalami perubahan morfologi daun, yaitu berbentuk kipas, memanjang, dan perubahan lainnya pada *pseudobulb* dan performa pertumbuhannya (Tran, *et al* 2022). Hasil keragaan dan karakterisasi salah satunya dapat digunakan untuk mendiskripsikan keragaman sifat atau karakter morfologi pada mutan-mutan yang dihasilkan.

Beberapa varian hasil induksi mutasi melalui perendaman dalam EMS mengalami perubahan morfologi daun, yaitu berbentuk kipas, memanjang, dan perubahan lainnya pada *pseudobulb* dan performa pertumbuhannya (Tran, *et al* 2022). Hasil keragaan dan karakterisasi salah satunya dapat digunakan untuk mendiskripsikan keragaman sifat atau karakter morfologi pada mutan-mutan yang dihasilkan.

Dari penelitian yang dilakukan sebelumnya, dengan menginduksi mutasi pada anggrek hitam Kalbar menggunakan beberapa konsentrasi EMS, sudah

dihasilkan tanaman-tanaman yang diduga sudah mengalami perubahan (putative mutan). Untuk itu perlu dilakukan evaluasi awal berupa penilaian keragaan fase pertumbuhan vegetatifnya dimulai pada fase *in vitro*. Pengamatan dapat dilakukan dengan menilai keragaan dan karakter morfologi dari tanaman putatif mutan tersebut. Berdasarkan uraian tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaan dan karakter fase pertumbuhan *in vitro* putatif mutan Anggrek Hitam Kalbar.

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah: *laminar air flow cabinet*, *autoclave*, *pH meter*, timbangan analitik, hot plate, magnetic stirrer, botol kultur, *glass ware*, dissection set, dan peralatan lain yang mendukung penelitian

Bahan yang digunakan adalah tunas *in vitro* putatif mutan anggrek hitam, komposisi bahan media *Murashige and Skoog* (MS), ZPT (BAP & NAA), KOH dan HCL, *detergen*, bayclin, *aluminium foil*, spritus, alkohol 70 % dan 96 %, sukrosa, *agar-agar*, aquades steril, *betadine*, *tissue*, karet gelang, plastik tahan panas, masker, sarung tangan, dan lain-lain.

Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura Pontianak. Pelaksanaan penelitian berlangsung dari bulan April sampai dengan Oktober 2023.

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap satu faktor, yang terdiri dari 6 klon hasil penelitian

sebelumnya. klon-klon yang dimaksud adalah sebagai berikut : K, M, N, O P dan Q (hasil dari perlakuan EMS 0%, 0,25%, 0,5%,0,75% 1,25%). Perlakuan diulang sebanyak 5 kali dan masing-masing ulangan terdiri dari 5 individu sebagai sampel. Keseluruhan terdapat 150 satuan percobaan.

Pelaksanaan penelitian diawali dengan proses sterilisasi lingkungan kerja umum (ruang kutur) dan pada lingkungan spesifik *laminar air flow cabinet* (LAFC). Permukaan meja kerja pada LAFC selalu dibersihkan dengan alcohol 70%, kemudian diberikan cahaya dengan lampu ultra violet (UV) selama 1 jam sebelum bekerja. Demikian pula dengan peralatan dissection set selalu disterilkan dengan autoclave selama 1 jam sebelum digunakan, dan direndam dalam larutan alcohol 96% selama bekerja dalam laminar. Apabila kegiatan telah selesai dilakukan maka LAFC dibersihkan kembali menggunakan alcohol 70%.

Sterilisasi alat dan media yang digunakan dimulai dengan pencucian peralatan sampai bersih menggunakan *detergen* dan *disinfektan* lalu dibilas dan ditiriskan sampai kering. Aquades disterilisasi dengan cara dimasukkan ke dalam wadah botol yang ditutup dengan penyumbat botol serta plastik tahan panas lalu dikencangkan dengan karet gelang begitu pula dengan media. Sterilisasi alat dan aquades menggunakan *autoclave* membutuhkan waktu selama 60 menit sedangkan media membutuhkan waktu 15 menit dengan suhu 121° C pada tekanan 17,5 *psi*.

Selanjutnya adalah pembuatan media yang digunakan untuk menumbuhkan eksplan. Media dasar yang digunakan

adalah media Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan sukrosa 30 g/l. Cara yang dilakukan untuk memudahkan pembuatan media MS adalah dengan membuat larutan stok seperti hara makro, yaitu Stok A (NH_4NO_3), stok B (KNO_3), stok C ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), stok D, ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dan (KH_2PO_4), stok E ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Stok hara mikro, yaitu stok F ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dan 1 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). selain itu, dibuat juga stok vitamin (Tiamin HCl, Piridoksin HCl, Asam Nikotinat, dan Glisin), stok Myo-inositol dan stok hormon (NAA dan BAP). Khusus stok besi (Fe) dibungkus dengan alumunium foil. stok vitamin yang terdiri dari serta Myoinositol. Semua larutan stok diberi label tanggal pembuatan dan jumlah yang diperlukan untuk setiap liter media.

Media tumbuh dibuat dengan mencampur larutan larutan stok, vitamin, Myo-inositol dan hormon kedalam gelas piala sesuai dengan ketentuan masing-masing kemudian ditambahkan dengan aquadest steril sampai mendekati volume yang diinginkan, dan kemudian pH diukur dengan pH meter. Bila media terlalu basa maka ditambahkan HCl 1 N dan bila terlalu asam ditambahkan KOH 1 N sehingga didapatkan pH 5,8. Setelah itu ditambah aquadest steril sampai volume yang diinginkan, selanjutnya tambahkan agar-agar sebagai pematat sebanyak 7g/liter, dan sukrosa 30 gram/liter dan ditambah 0,1 ppm NAA dan 0,5 ppm BAP.

Media dimasak diatas pemanas dan untuk melarutkan agar digunakan pengaduk atau magnetik stirer. Selama pemanasan media diaduk secara teratur sampai larutan mendidih dan terlihat

jernih. Selanjutnya media yang masih panas dituangkan kedalam botol-botol kultur yang sudah steril, masing masing 25 ml/botol. Botol -botol tersebut ditutup dengan plastik tahan panas dan diikat menggunakan karet gelang. Selanjutnya disterilkan ke dalam *autoclave* dengan tekanan 17,5 *psi* dengan suhu 121°C selama 20 menit.

Penanaman tunas *in vitro* dilakukan dengan cara tunas *in vitro* dari masing-masing klon dipisah-pisahkan per individu sehingga menjadi satu tunas saja, kemudian ditanam pada media yang sudah disiapkan. Tunas yang digunakan adalah tunas yang seragam dengan jumlah daun 5 lembar. Botol-botol yang telah ditanami eksplan ditempatkan pada rak kultur atau rak tumbuh yang diberi cahaya lampu TL 40 watt. Penyinaran dilakukan selama 16 jam/hari dengan suhu ruangan diatur hingga mencapai suhu antara 24-25%. Peletakan botol-botol kultur tersebut disesuaikan dengan denah penelitian yang sudah dibuat untuk RAL sebelumnya

Eksplan yang sudah ditanam pada media akan dipelihara pada ruang *thermostatic* dengan pengaturan suhu 23 °C dan fotoperiodesitas 16 jam gelap dan 8 jam terang. Setiap individu akan diamati pertumbuhan dan perkembangannya dan akan dicatatkan sesuai variabel yang diamati. Variabel yang akan diamati dalam penelitian ini adalah Pertambahan bobot tanaman (g), Pertambahan jumlah daun (helai), Waktu terbentuk tunas (minggu), Jumlah tunas, Waktu munculnya akar, Jumlah Akar.

Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diberikan, maka data pengamatan semua variabel akan diuji dengan Analysis of Variance (ANOVA). Jika hasil ANOVA berpengaruh nyata maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf 5% untuk mengetahui perbedaan antar taraf perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan terhadap variabel-variabel pertumbuhan tanaman putatif mutan anggrek hitam dilakukan setiap hari, namun pencatatan hasil dilakukan setiap minggu. Data hasil pengamatan selanjutnya dianalisis keragamannya menggunakan RAL. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa klon-klon putatif mutan berpengaruh nyata terhadap keragaan tanaman yang dihasilkan yaitu pada variabel pertambahan jumlah daun, bobot tanaman, jumlah tunas dan jumlah akar. Klon-klon putatif mutan berpengaruh tidak nyata pada pengamatan waktu muncul tunas dan akar Untuk melihat perbedaan keragaan antar klon tersebut, maka dilakukan uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) 5% pada variabel pertambahan jumlah daun, bobot tanaman, jumlah tunas dan jumlah akar. Hasil DMRT 5 % terhadap variabel pengamatan pertumbuhan klon-klon putatif mutan anggrek hitam disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Keragaan pertumbuhan putatif mutan anggrek hitam Kalbar

konsentrasi EMS (%)	Rerata			
	Pertambahan Jumlah daun	Bobot Tanaman	Jumlah Tunas	Jumlah Akar
K	3,250 b	1,081 c	1,889 a	1,778 a
M	3,621 a	1,181a	1,556 ab	1,333 b
N	3,352 b	1,134 b	1, 222 bc	1,222 b
O	2,592 b	1,056 cd	1,000 c	1,111 b
P	2,388 cd	1,0267 d	1,000 c	1,000 b
Q	2,221 d	1,0211 d	1,000 c	1,000 b

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji DMRT 5%

Tabel 2. Deskripsi klon-klon putatif mutan Anggrek hitam Kalbar

Bagian Tanaman	Perlakuan					
	Kontrol (K)	Klon (M)	Klon (N)	Klon (O)	Klon (P)	Klon (Q)
ukuran	sedang	Kecil	kecil	sedang	sedang	sedang
Bentuk pertumbuhan	sympodial	sympodial	sympodial	sympodial	Monopodial memanjat	sympodial
Panjang Daun	sedang	Sedang	Sedang	Sedang	pendek	Pendek
Lebar Daun	sedang	sempit	sempit	sedang	sedang	sedang
Bentuk daun	pita	pita	pita	pita	pita	pita
Bentuk ujung daun	lancip	Meruncing	Meruncing	lancip	lancip	lancip
Simetri daun	simetris	simetris	simetris	simetris	simetris	simetris
Susunan daun	Tergulung bersama	Tergulung bersama	Tergulung bersama	Tergulung bersama	Tergulung bersama	Tergulung bersama

Keragaan klon putatif mutan diukur melalui variabel pertumbuhan jumlah daun, bobot tanaman, jumlah tunas dan jumlah akar, serta kecepatan waktu muncul tunas dan akar. Performa kecepatan muncul tunas dan akar relatif sama pada semua klon putatif mutan dengan tanaman kontrol.

Tabel 1 menunjukkan bahwa untuk pertumbuhan jumlah daun dan bobot

tanaman, klon N putatif mutan menghasilkan pertumbuhan jumlah daun tertinggi dan berbeda nyata dengan konsentrasi lainnya termasuk tanaman kontrol. Sebaliknya untuk jumlah akar dan jumlah tunas tanaman kontrol (K) menghasilkan tunas dan akar yang terbanyak dan berbeda nyata dengan semua klon putatif mutan (klon M, N, O, P dan Q). Perbedaan tersebut merupakan

akibat dari perbedaan konsentrasi EMS yang diberikan untuk menginduksi mutasi pada tunas *in vitro* anggrek hitam pada percobaan sebelumnya.

Percepatan pembentukan daun dan tunas pada klon M putatif mutan dibandingkan tanaman kontrol dan klon lainnya menunjukkan mutasi yang terjadi bersifat positif bagi tanaman. Sebaliknya, pada klon N, O, P dan Q cenderung terjadi perlambatan pertumbuhan seiring dengan meningkatnya konsentrasi EMS yang mereka terima sebelumnya, selama proses induksi mutasi. Hal ini juga ditunjukkan dari terjadinya penurunan bobot tanaman, walaupun tanaman menambah daun baru. Menurut Priyono & Agung (2002), mutasi menyebabkan terjadinya perubahan struktur nukleotida pada bagian tanaman akibat pemberian mutagen kimia (EMS) sehingga turut pula merubah system fisiologi pada tanaman. Ditambahkan Purwati *et al* (2008), adanya penurunan bobot massa tanaman, padahal terjadi pertumbuhan, dapat disebabkan adanya perubahan struktur jaringan penyusun organ (daun), sehingga merubah ketebalan daun, akar, dan seterusnya.

Menurut Nurhayani (2017) EMS yang bersifat sebagai agen pengkelat dapat menyebabkan terjadinya mutasi titik, sehingga mereduksi sifat fertisasi, penghambatan kemampuan jaringan membentuk tunas dan pada akhirnya mengalami kematian. Sebelumnya, Qosim, *et al* (2015) telah mengatakan bahwa setiap sel meristem yang terdapat dalam eksplan yang digunakan mempunyai potensi untuk membentuk tunas baru, namun pemberian mutagen kimia EMS dapat menyebabkan perubahan fisiologis dari sel-sel tersebut yang perubahannya bergantung dari

sensitivitas sel-sel meristem penyusun eksplan tersebut yang menimbulkan perubahan potensi sel di dalam jaringan eksplan untuk meregenerasikan tunas sehingga menimbulkan perbedaan respons eksplan.

Seperti yang dikemukakan Qosim, *et al* (2017) bahwa kematian sel tanaman akibat mutagen kimia EMS dapat terjadi secara langsung, yaitu kerusakan DNA atau akibat tidak langsung, yaitu adanya pengaruh toksik sehingga mengakibatkan sel tidak mampu meregenerasi membentuk tunas. Diduga pengaruh perlakuan konsentrasi EMS yang diberikan yang sudah menyebabkan kerusakan pada jaringan eksplan yang dapat menyebabkan perubahan susunan nukleotida walaupun dalam skala kecil.

Konsentrasi yang terlalu tinggi dalam penggunaan EMS pada eksplan dapat mempengaruhi regenerasi sel dan dapat menyebabkan kematian sel. Letalitas yang terjadi akibat pekatnya larutan EMS yang diserap oleh eksplan sehingga menyebabkan regenerasi tunas mengalami penurunan. Menurut Bhagwat & Duncan (1998) dalam pemuliaan mutasi pada umumnya frekuensi mutasi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi mutagen kimia. Handayati, *et al* (2007) mengatakan bahwa dari hasil penelitian pada beberapa jenis tanaman menunjukkan metode regenerasi yang telah ada belum tentu dapat diaplikasikan pada jenis lainnya walaupun dalam spesies yang sama.

Tabel 2, menunjukkan terjadi perubahan karakter pertumbuhan pada klon M dan N ukuran pertumbuhan tanaman menjadi kategori kecil, sementara klon P tipe pertumbuhannya menjadi monopodial memanjat. Untuk karakter daun, terjadi

perubahan Panjang daun menjadi memendek pada klon P dan Q, serta lebar daun menjadi menyempit dan ujung daun menjadi meruncing pada klon M dan N. pada karakter bentuk daun, simetri daun dan susunan daun tidak terjadi perubahan pada semua klon. Perubahan morfologi yang terjadi pada klon-klon putatif mutan ini menunjukkan sudah terjadi perubahan struktur gen pada putatif mutan anggrek hitam akibat terjadinya mutasi yang disebabkan oleh mutagen EMS.

Perubahan karakter pertumbuhan morfologi ini perlu waktu yang panjang untuk membuktikan fenomena yang berlangsung apakah bersifat menetap atau dapat balik. Menurut Van Harten, 1998, penggunaan EMS pada konsentrasi yang rendah banyak digunakan untuk menstimulasi perubahan fisiologi dan mungkin juga morfologi dari tanaman anggrek dan meningkatkan deferensiasi sel. Menurut Purwati, *et al* (2008), konsentrasi EMS yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan toksisitas pada tanaman akibat dari terhambatnya pembelahan sel tanaman yang dapat menyebabkan letalitas pada tanaman dan terhambatnya pembentukan tunas tanaman.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa putatif mutan klon M memiliki keragaan yang terbaik dibanding klon-klon lainnya maupun tanaman kontrol. Terdapat perbedaan karakter fase pertumbuhan *in vitro* pada semua klon putatif mutan anggrek hitam dibanding tanaman kontrol, kecuali klon O masih menunjukkan karakter pertumbuhan yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

- Baghwat, B., dan E.J. Duncan. 1998. "Mutation breeding of Highgate (*Musa acuminata*, AAA) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using gamma irradiation." *Jurnal Euphytica*, Edisi 101 hlm. 143-150. DOI:10.1007/BF00042311
- Brando Renzo Marganda Purba dan Darmawan Saptadi. 2019. Karakterisasi Beberapa Jenis Anggrek Berdasarkan Karakter Morfologi. *Jurnal Produksi Tanaman* Vol. 7 No. 7, Juli 2019: 1258–1263 ISSN: 2527-8452. DOI:10.21776/ub.protan.2023.010.01.01
- Handayati, W.D., I. Mariska, R. Purnamaningsih, dan Darliah. 2007. Peningkatan keragaman genetik mawar mini melalui kultur *in vitro* dan iradiasi sinar gamma. *Jurnal Berita Biologi*, 5(4):365-371. DOI: 10.14203/beritabiologi.v2i1i1.4090
- Hartati. S dan L. Darsana. 2015. Karakterisasi Anggrek Alam secara Morfologi dalam Rangka Pelestarian Plasma Nutfah. *Jurnal Agronomi Indonesia*. 43 (2): 133-139. DOI: 10.24831/ija.v5i1i1.45161
- Lestari EG. 2016. Pemuliaan Tanaman Melalui Induksi Mutasi Dan Kultur *In Vitro*. Jakarta. IAARD PRESS
- Maimunah, S. dan Syahbudin, A. 2020. *Anggrek Hutan Kerangas*

- Kalimantan Tengah. Palangka Raya: FPK Universitas Muhammadiyah Palangka Raya.
- Nurhayani, S. 2017. Pengaruh Konsentrasi dan Durasi Perendaman Ethyl Methane Sulphonate (EMS) Terhadap Pertumbuhan Bambusa balcooa Roxb. Dan Bambusa beecheyana Munro Melalui Kultur In Vitro. *Jurnal Mathematical and Fundamental Science*. 6(2):139-148. DOI: 10.5614/j.math.fund.sci.
- Purwati, RD., Sudjindro, KE., Sudarsono. 2008. Keragaman Genetika Varian Abaka Yang Diinduksi Dengan Ethyl Methane Sulphonate (EMS). *Jurnal Littri*. Vo14(1):16-24. DOI: 10.21082/littri.v23n2.2017.72-82
- Priyono & Agung, SW 2002, Respon regenerasi in vitro eksplan sisik mikro Kerk Lily (*Lilium longiflorum*) terhadap Ethyl Methane Sulfonate (EMS). *Jurnal. Ilmu Dasar*. vol. 3, no. 2, hlm. 74-79. DOI: 10.19184/jid.v24i1.16792
- Purwati, RD., Sudjindro, KE., Sudarsono. 2008. Keragaman Genetika Varian Abaka Yang Diinduksi Dengan Ethyl Methane Sulphonate (EMS). *Jurnal Littri*. Vo14(1):16-24. DOI:[10.21082/jlittri.v14n1.2008.16-24](https://doi.org/10.21082/jlittri.v14n1.2008.16-24)
- Qosim, WA., Istifadah, N., Yunitasari. 2012. Pengaruh Mutagen Etil Metan Sulfonat Terhadap Kapasitas Regenerasi Tunas Hibrida Phalaenopsis In Vitro. *Jurnal Hort*. 22(4):360-365. DOI: 10.29244/jhi.14.1.33-39
- Qosim, WA., Yuwariah, Y., Hamdani., Rachmadi, M., Perdani, SM., 2015. Pengaruh Mutagen Etil Metan Sulfonat terhadap Regenerasi Tunas Pada Dua Genotip Manggis Asal Purwakarta dan Pandeglang. *Jurnal Hort Ind*. 25(1):9-14. DOI: 10.29244/jhi.14.1.33-39
- Tran T K P, Minh H P, Thi Huong T, Sasanti W, Viet T H. 2022. Investigation Of The Genetic Diversity of Jewel Orchid In Vietnam Using RAPD and ISSR markers. *Jurnal BIODIVERSITAS* Volume 23, No 9: hal 4816-4825. DOI: 10.13057/biodiv/d160101
- Van Harten AM. 1998. *Mutation Breeding. Theory and Practical Application*. UK : Press Syndicate of the Univ of Cambridge.