

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Tahap 1 : Pengaruh Konsentrasi TDZ Terhadap Eksplan PLB *Vanda tricolor* secara *In vitro*

Pada Tahap 1, penelitian ini menggunakan eksplan PLB dari biji anggrek *Vanda tricolor* yang ditumbuhkan secara *in vitro* berumur 1,5 bulan. Keberhasilan penelitian kultur *in vitro* dipengaruhi oleh eksplan hidup, *browning* dan kontaminasi. Eksplan hidup dilihat dari keadaan eksplan yang berwarna hijau, terbentuknya kalus dan tunas baru. Eksplan yang mengalami *browning* yaitu terjadinya perubahan warna menjadi coklat yang dipengaruhi oleh senyawa fenol. Kontaminasi dicirikan dengan adanya koloni bakteri dan jamur yang terdapat di sekitar permukaan medium maupun permukaan eksplan. Hasil analisis persentase eksplan hidup, persentase *browning* dan persentase kontaminasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Kombinasi Eksplan PLB dan Konsentrasi TDZ terhadap Persentase Hidup (%), Persentase *Browning* (%) dan Persentase Kontaminasi (%) Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.

Perlakuan	Persentase Hidup (%)	Persentase <i>Browning</i> (%)	Persentase Kontaminasi (%)
PLB + 0 mg/l TDZ	100	0	0
PLB + 0,5 mg/l TDZ	80	20	0
PLB + 1 mg/l TDZ	100	0	0

1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan kemampuan suatu eksplan untuk tumbuh dan berkembang dalam kultur *in vitro*. Persentase eksplan hidup

menunjukkan bahwa eksplan mengalami respon pertumbuhan. Persentase eksplan hidup dipengaruhi oleh persentase kontaminasi dan persentase *browning*. Tujuan dilakukan pengamatan persentase eksplan hidup yaitu untuk mengetahui seberapa besar pengaruh sterilisasi eksplan pada saat penelitian.

Hasil analisis pada Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan PLB + 0 mg/l TDZ dan PLB + 1 mg/l TDZ mencapai 100%, sementara perlakuan PLB + 0,5 mg/l TDZ mencapai 80%. Persentase eksplan hidup lebih dari 50% dinyatakan tinggi, hal ini dapat dilihat bahwa perlakuan PLB disemua konsentrasi TDZ memiliki persentase eksplan hidup yang tinggi yaitu 80% - 100%.

Tingginya persentase eksplan hidup pada perlakuan PLB ini dipengaruhi beberapa faktor. Eksplan yang digunakan untuk penelitian ini merupakan eksplan yang sudah steril, diambil dari hasil kultur *in vitro* pada penelitian sebelumnya sehingga tingkat persentase eksplan kontaminasi rendah. Faktor lain yang mempengaruhi yaitu Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). ZPT berperan menginduksi pertumbuhan eksplan, sehingga eksplan dapat tumbuh dan berkembang lebih cepat. ZPT yang digunakan pada penelitian ini yaitu TDZ dan NAA. Kombinasi konsentrasi ZPT yang digunakan pada penelitian ini dapat merangsang pertumbuhan eksplan. TDZ yang berperan sebagai Sitokinin mampu menginduksi tunas, sementara NAA sebagai Auksin berperan merangsang pembelahan sel dan pembesaran sel yang terdapat pada pucuk tanaman dan menyebabkan tumbuhnya pucuk-pucuk baru. Selain itu, medium juga berpengaruh terhadap persentase eksplan hidup, komposisi yang terdapat pada medium berpengaruh untuk menjaga eksplan bertahan hidup di dalam medium. Abidin (1993) menyatakan bahwa

kemampuan hidup eksplan pada kultur *in vitro* sangat tergantung dari eksplan itu sendiri, jenis dan komposisi medium sangat mempengaruhi besarnya daya tahan eksplan untuk hidup pada medium tersebut. Medium yang digunakan pada penelitian ini yaitu medium VW.

Komposisi medium VW (lampiran III) merupakan komposisi medium yang paling umum digunakan dalam perbanyakan anggrek secara *in vitro*. Bey dkk. (2006) melaporkan bahwa penggunaan medium VW yang ditambahkan Zat Pengatur Tumbuh Giberelin dapat mempercepat pembentukan *Protocorm Like Bodies* (PLBs) pada tanaman anggrek. Unsur makro yang terkandung dalam medium VW seperti unsur *magnesium* sangat mendukung pertumbuhan eksplan. Wetherell (1982) menyatakan di dalam medium terkandung mineral, gula, vitamin dan hormon dengan perbandingan yang dibutuhkan secara tepat.

Kultur *in vitro* merupakan budidaya *heterotrof*, dimana sel tanaman tidak dapat melakukan proses fotosintesis untuk menghasilkan karbon seperti tanaman *autotrof*. Sumber karbon harus diperoleh dalam bentuk karbohidrat yang ditambahkan dari luar. Penambahan sumber karbon berupa gula (sukrosa), karena sukrosa membantu keberlangsungan aktivitas dan pertumbuhan kalus, juga sebagai sumber energi. Jika tidak ada sukrosa, maka aktivitas dan pertumbuhan kalus terhambat dan sel-sel tersebut akan mati (Campbell *et al.*, 2003).

2. Persentase Eksplan *Browning*

Pencoklatan atau *browning* merupakan perubahan warna yang terjadi pada eksplan, dari warna hijau menjadi coklat atau hitam. *Brwoning* timbul karena adanya senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan akibat pelukaan saat

pengirisan eksplan. Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dapat terhambat akibat dari *browning*. Pada Tabel 1 menunjukkan tidak terjadi pencoklatan atau *browning* pada perlakuan PLB + 0 mg/l TDZ dan PLB + 1 mg/l TDZ, tetapi pada perlakuan PLB + 0,5 mg/l TDZ terjadi pencoklatan pada minggu ke-4. Kemungkinan *browning* terjadi akibat penggunaan pinset masih dalam keadaan panas pada saat memindahkan PLB ke medium, sehingga PLB mengalami pelukaan dan senyawa fenol yang terkandung di dalam eksplan teroksidasi. Pertumbuhan eksplan yang mengalami *brwoning* akan terhambat, seperti pada perlakuan PLB + 0,5 mg/l TDZ. Dari 10 ulangan terdapat 2 ulangan yang mengalami *brwoning*, 2 ulangan tersebut tidak menunjukkan persentase eksplan bertunas.

3. Persentase Eksplan Kontaminasi

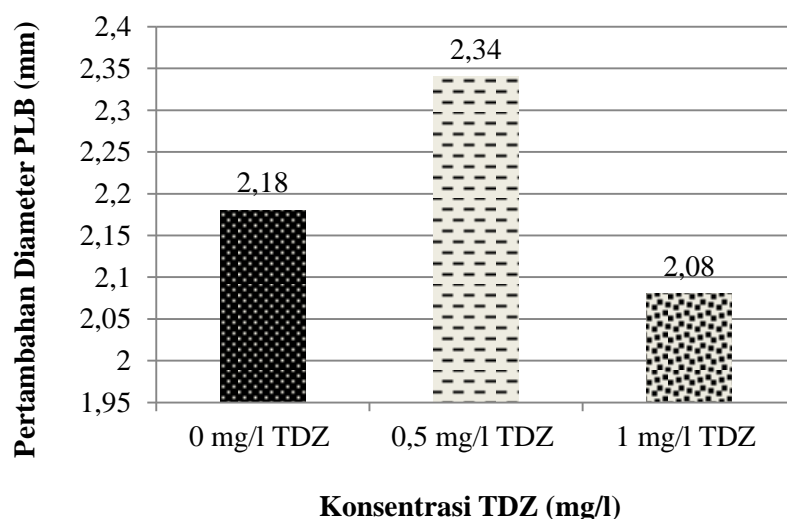
Pengamatan persentase kontaminasi bertujuan untuk mengetahui seberapa besar tingkat keberhasilan sterilisasi eksplan, alat dan medium. Semua kegiatan kultur *in vitro* harus terjaga kesterilannya, kurang maksimalnya sterilisasi mengakibatkan terjadinya kontaminasi pada eksplan maupun medium. Persentase kontaminasi dapat dilihat dari adanya bakteri dan jamur di permukaan media maupun menempel pada eksplan. Kontaminasi yang diakibatkan bakteri dicirikan dengan timbulnya lendir pada permukaan medium maupun di permukaan eksplan, sedangkan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur dicirikan dengan tumbuhnya hifa jamur pada permukaan medium maupun eksplan dengan warna putih keabuan, sehingga miselium jamur menyelimuti eksplan dan terjadi kematian pada eksplan. Hasil analisis persentase kontaminasi pada penelitian ini 0% pada semua

perlakuan, seperti yang terlihat pada Tabel 1. Hal ini menunjukkan bahwa metode sterilisasi efektif untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Metode sterilisasi diterapkan mulai dari awal sampai akhir kegiatan penelitian.

4. Pertambahan Diameter PLB

Pertambahan diameter merupakan salah satu parameter penting untuk mengetahui pengaruh ZPT, medium maupun eksplan terhadap pertumbuhan eksplan PLB dalam kegiatan kultur *in vitro*. Pada penelitian ini, pertambahan diameter PLB diketahui dengan cara pengurangan hasil pengukuran diameter PLB pada minggu 12 dikurangi hasil pengukuran minggu 1.

Hasil sidik ragam (lampiran V.a) pengamatan rerata pertumbuhan pada perlakuan PLB terhadap parameter diameter PLB menunjukkan tidak ada beda nyata, seperti yang disajikan pada Gambar 3.



Gambar 1. Pengaruh Konsentrasi TDZ terhadap Pertambahan Diameter Eksplan PLB Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.

Pada perlakuan PLB, rerata diameter eksplan pada Gambar 3 menunjukkan tidak ada beda nyata antar perlakuan dengan konsentrasi TDZ (0 mg/l TDZ; 0,5 mg/l TDZ dan 1 mg/l TDZ). Diameter relatif terbesar terjadi pada perlakuan PLB + 0,5 mg/l TDZ yaitu mencapai 2,34 mm, sementara diameter relatif terendah terjadi pada perlakuan PLB + 1 mg/l TDZ yaitu 2,08 mm.

Berdasarkan histogram Gambar 3, konsentrasi 0,5 mg/l TDZ cenderung lebih baik terhadap penambahan diameter PLB dibandingkan dengan konsentrasi 1 mg/l TDZ dan 0 mg/l TDZ. Hal ini disebabkan karena kombinasi 0,5 mg/l TDZ dengan NAA mampu mendorong pertumbuhan diameter karena NAA (Auksin) menyebabkan pembesaran sel, sehingga diameter PLB membesar. Pernyataan tersebut sesuai dengan Fibrianty (2013) yang menyatakan bahwa pembengkakan eksplan pada tanaman memberikan indikasi adanya pemanjangan atau pembesaran sel yang disebabkan adanya Auksin.

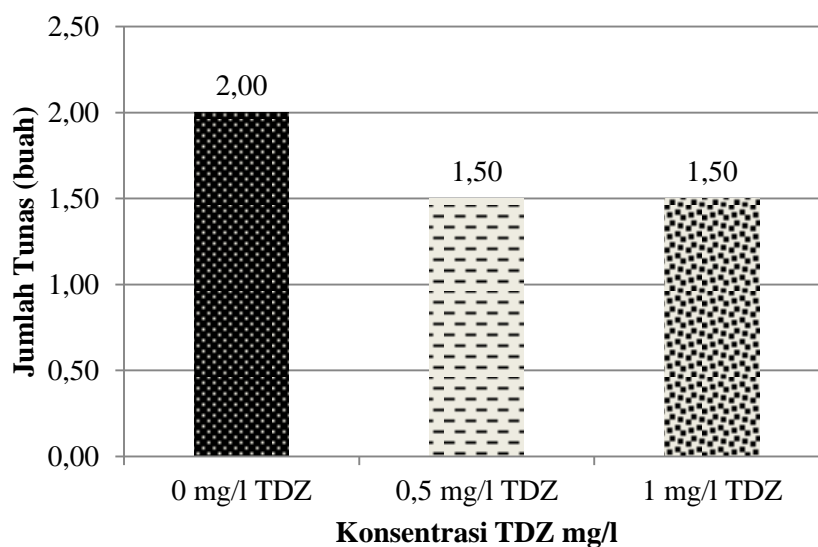
Sementara penambahan 1 mg/l TDZ yang dikombinasikan dengan NAA mendorong pembelahan sel yang diduga menyebabkan jumlah sel bertambah, tetapi pertumbuhannya tidak menyebabkan pembesaran diameter PLB sebesar perlakuan 0,5 mg/l TDZ. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Hoesen dkk. (2008), menyatakan dari nilai rerata ukuran diameter kalus PLB *D. lineale* teramati bahwa penambahan 0,1 hingga 0,5 mg/l TDZ pada media MS dapat meningkatkan ukuran diameter kalus dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi 1 mg/l TDZ.

5. Jumlah Tunas

Jumlah tunas merupakan salah satu faktor penting untuk menunjukkan keberhasilan tahapan multiplikasi dalam pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Dalam mikropropagasi, jumlah tunas sangat penting diamati karena semakin banyak tunas yang terbentuk akan berpeluang mendapatkan bibit yang banyak pula. Hasil sidik ragam (lampiran V.c) menunjukkan perlakuan kombinasi eksplan dan penambahan konsentrasi TDZ yang berbeda pada penelitian ini tidak ada beda nyata terhadap jumlah tunas selama 12 MST.

Perlakuan PLB + 0 mg/l TDZ dan PLB + 1 mg/l TDZ sudah terdapat tunas pada 1 MST, masing – masing 1 tunas per eksplan. Pertumbuhan jumlah tunas bertambah sampai akhir pengamatan 12 MST. Hal ini menunjukkan bahwa TDZ pada konsentrasi tertentu aktif berperan dalam penggandaan tunas sampai jangka waktu akhir pengamatan, meskipun jumlah tunas pada awal pengamatan masih rendah. Sementara perlakuan yang lain belum ada menunjukkan pertumbuhan tunas pada 1 MST. Davies (1995) menyatakan bahwa pemberian NAA pada media kultur menyebabkan pembelahan sel pada permulaan kultur berjalan lambat, akan tetapi populasi sel tetap dijaga dan kemudian jumlahnya ditingkatkan. Perbedaan jumlah pada tiap perlakuan dipengaruhi oleh TDZ dengan konsentrasi yang berbeda. Hal ini sesuai dengan pendapat Wattimena *et al.* (1992) bahwa kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi Zat Pengatur Tumbuh tertentu dalam konsentrasi tertentu. Satu molekul Zat Pengatur Tumbuh saja dapat mempengaruhi cara kerja enzim, maka beberapa molekul Zat Pengatur Tumbuh dapat menyebabkan perubahan -

perubahan fisiologis tanaman, karena enzim memegang peranan penting dalam setiap proses metabolisme (Wattimena, 1991). Winarsih dan Priyono (2000) menyatakan bahwa kombinasi perlakuan Sitokinin dan Auksin pada konsentrasi yang tepat dapat meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk.



Gambar 2. Pengaruh Kombinasi Eksplan PLB dan Konsentrasi TDZ terhadap Rerata Pertambahan Σ Tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.

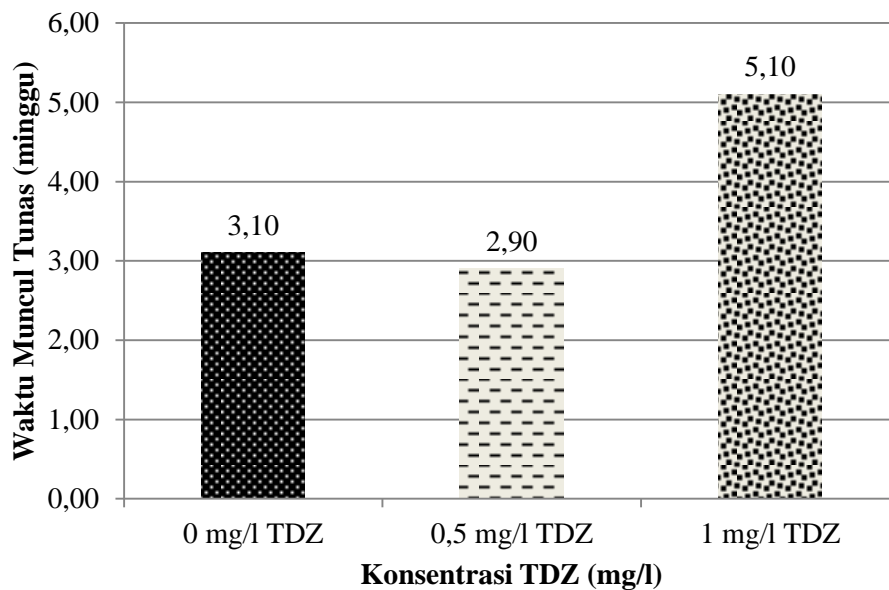
Pada histogram Gambar 4 menunjukkan bahwa perlakuan PLB + 0 mg/l TDZ cenderung lebih baik terhadap jumlah tunas dibandingkan dengan perlakuan PLB + 0,5 mg/l TDZ dan 1 mg/l TDZ. Perlakuan PLB + 0 mg/l TDZ cenderung lebih baik terhadap jumlah tunas, disebabkan kemungkinan sudah terdapat ZPT endogen yang telah mencukupi sehingga tanpa penambahan Sitokinin eksogen pun dapat dihasilkan tunas. Sementara perlakuan PLB + 0,5 mg/l TDZ dengan perlakuan PLB + 1 mg/l TDZ memiliki jumlah tunas sama. Hal ini diduga karena penambahan ZPT Sitokinin TDZ mampu menginduksi kemunculan tunas. Menurut pendapat Sari *et al.* (2015) bahwa *Thidiazuron* memiliki kemampuan

untuk menginduksi kemunculan tunas karena *Thidiazuron* mampu mendorong terjadinya perubahan Sitokinin *ribonukleotida* menjadi lebih aktif. Guo *et al.* (2011) menjelaskan bahwa *Thidiazuron* berperan menstimulasi produksi Sitokinin endogen sel. Selain itu, dikarenakan konsentrasi Sitokinin eksogen yang ditambahkan ke dalam media kultur lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi Auksin endogen yang dihasilkan oleh eksplan.

6. Waktu Muncul Tunas

Waktu muncul tunas merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan sejauh mana eksplan merespon terhadap perlakuan yang diberikan. Waktu muncul tunas diamati setiap minggu sampai 12 MST. Penentuannya dengan menghitung minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul tunas pertama. Tujuan pengamatan waktu muncul tunas yaitu mengetahui berapa lama waktu yang dibutuhkan eksplan untuk bertunas. Semakin cepat eksplan bertunas, maka semakin cepat pula eksplan membentuk individu baru.

Berdasarkan hasil sidik ragam (lampiran V.d), pada penelitian ini perlakuan kombinasi eksplan dan konsentrasi TDZ diketahui tidak ada beda nyata terhadap waktu muncul tunas *Vanda tricolor*. Hal ini diduga eksplan anggrek *Vanda tricolor* belum merespon ZPT (Sitokinin) yang ada pada medium. Hal tersebut dikarenakan waktu inkubasi yang pendek (12 MST). Sejalan dengan penelitian Latip *et al.* (2010) menyebutkan proliferasi *protocorm* anggrek *Phalaenopsis gigantia* asal kultur *in vitro* memerlukan waktu 6 - 12 MST bahkan lebih. Histogram waktu muncul tunas disajikan pada Gambar 5.



Gambar 3. Pengaruh Kombinasi Eksplan PLB dan Konsentrasi TDZ terhadap Rerata Waktu Muncul Tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.

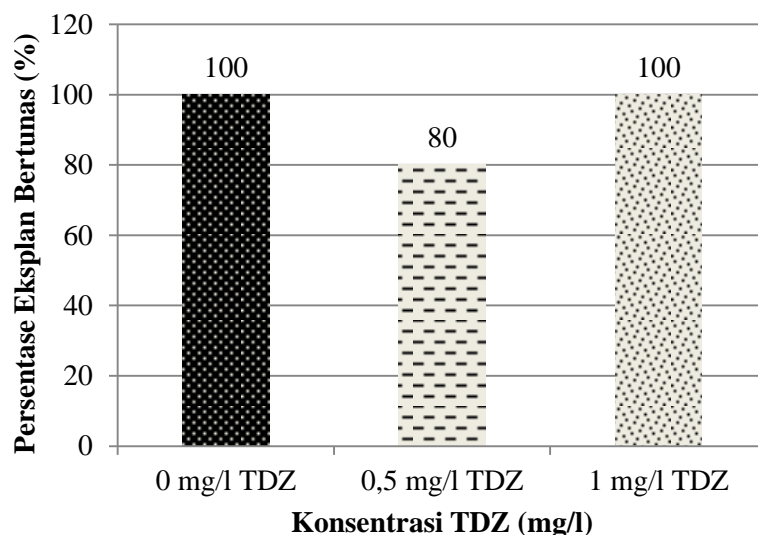
Berdasarkan histogram Gambar 5, rerata waktu muncul tunas tercepat pada perlakuan PLB + 0,5 mg/l TDZ yaitu 2,90 MST, kemudian disusul oleh perlakuan PLB + 0 mg/l TDZ dan PLB + 1 mg/l TDZ. Penambahan TDZ dapat menambah ukuran *protocorm* melalui pembentukan tunas. TDZ merupakan salah satu golongan Sitokinin 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 (lampiran V.d) dan Gambar 5, perlakuan PLB dengan penambahan konsentrasi 0,5 mg/l TDZ dapat mempercepat waktu muncul tunas lebih awal dibanding perlakuan 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

ZPT ini dapat menghambat pertumbuhan tanaman dan cenderung tidak berpengaruh. Murch dan Saxena (2001) menyatakan konsentrasi TDZ yang optimum berperan penting dalam translokasi dan distribusi NAA serta diakumulasikan pada sel-sel yang memiliki totipotensi tinggi.

7. Persentase Eksplan Bertunas

Persentase eksplan bertunas merupakan jumlah eksplan yang mampu menumbuhkan tunas pada tiap perlakuan dan dinyatakan dalam satuan persen. Semakin tinggi persentase eksplan bertunas maka semakin tinggi pula eksplan mampu melakukan regenerasi. Keberhasilan eksplan dalam melakukan regenerasi dipengaruhi oleh kombinasi Sitokinin dan Auksin yang dapat memperbaiki efisiensi regenerasi eksplan, tergantung pada konsentrasi yang ditambahkan. Hasil analisis persentase eksplan bertunas disajikan pada Gambar 6.



Gambar 4. Pengaruh Kombinasi Eksplan PLB dan Konsentrasi TDZ terhadap Persentase Eksplan Bertunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.

Berdasarkan histogram Gambar 6, persentase rerata eksplan bertunas yang paling tinggi pada perlakuan PLB + 0 mg/l TDZ dan perlakuan PLB + 1 mg/l TDZ yaitu 100%. Hal ini diduga karena adanya ZPT golongan Sitokinin seperti TDZ yang aktif dalam proses pembelahan sel dan memacu pertumbuhan tunas. Perlakuan 0 mg/l TDZ mampu menghasilkan persentase eksplan bertunas 100%. Hal ini diduga karena PLB awalnya sudah memiliki calon tunas dan PLB merupakan jaringan muda yang masih aktif membelah, sehingga dapat mendorong pertumbuhan dan perkembangan tunas.

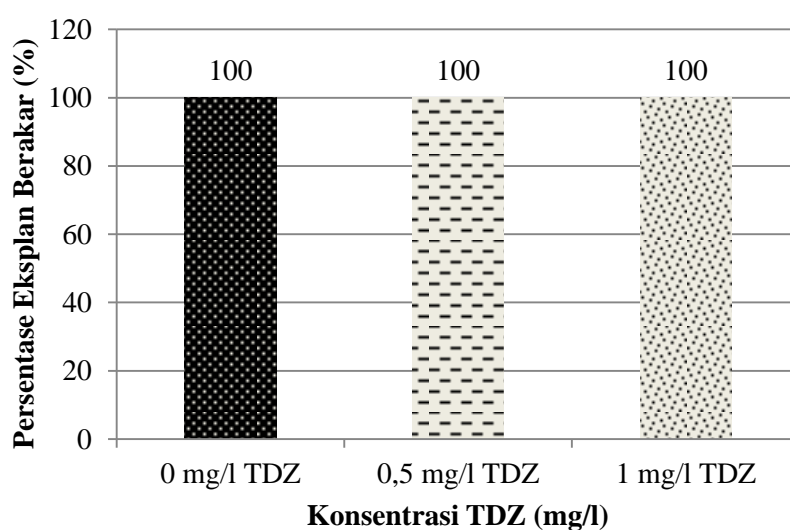
Faktor lain yang menyebabkan persentase eksplan bertunas tinggi yaitu karena eksplan PLB tidak mengalami kontaminasi maupun *browning*, sehingga eksplan mampu menyerap unsur hara dengan sempurna. Hal ini sesuai dengan pendapat Sabar (2013), yang menyatakan bahwa pembentukan tunas secara normal terjadi pada eksplan yang bebas dari kontaminasi dan *browning*. Secara normal tunas yang berkembang memiliki kandungan klorofil lebih tinggi yang disebabkan oleh penyerapan unsur hara yang sempurna.

8. Persentase Eksplan Berakar

Persentase eksplan berakar merupakan jumlah eksplan yang mampu menumbuhkan akar pada tiap perlakuan dan dinyatakan dalam satuan persen. Semakin tinggi persentase eksplan berakar maka penyerapan unsur hara pada eksplan anggrek *Vanda tricolor* akan semakin efektif.

Berdasarkan hasil analisis akhir pada minggu ke-12, persentase eksplan berakar pada perlakuan PLB mencapai 100% di semua konsentrasi TDZ. Hasil rerata persentase eksplan berakar disajikan pada Gambar 7. Hal ini menunjukkan

bahwa adanya pengaruh pemberian konsentrasi TDZ terhadap pembentukan akar. Adanya penambahan Auksin NAA pada medium memberikan pengaruh besar terhadap pembentukan akar, karena Auksin berperan untuk menginduksi akar. Ahmad *et al.* (2002) menyatakan bahwa media tanpa penambahan NAA tidak dapat menginduksi pembentukan akar pada tunas *Raufoivia serpentina*.



Gambar 5. Pengaruh Kombinasi Eksplan PLB dan Konsentrasi TDZ terhadap Rerata Persentase Eksplan Berakar Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.

Gambar 7 menunjukkan bahwa perlakuan PLB memiliki persentase berakar 100% pada semua konsentrasi TDZ. Pada penelitian ini belum dapat dihitung jumlah akar yang terbentuk, karena akar yang terbentuk belum sempurna. Menurut Untari dan Puspitaningtyas (2006), biji anggrek setelah berkecambah akan tumbuh akar namun akar yang tumbuh dengan sempurna dapat diamati pada umur planlet di atas 5 bulan terutama yang sudah disubkultur dan planlet yang siap untuk diaklimatisasi.

B. Tahap 2 : Pengaruh Konsentrasi TDZ Terhadap Eksplan Tunas *Vanda tricolor* secara *In vitro*

Pada Tahap 2, penelitian ini menggunakan eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* yang ditumbuhkan secara *in vitro* berumur 1 tahun. Keberhasilan penelitian kultur *in vitro* dipengaruhi oleh eksplan hidup, *browning* dan kontaminasi. Eksplan hidup dilihat dari keadaan eksplan yang berwarna hijau, terbentuknya kalus dan tunas baru. Eksplan yang mengalami *browning* yaitu terjadinya perubahan warna menjadi coklat yang dipengaruhi oleh senyawa fenol. Kontaminasi dicirikan dengan adanya koloni bakteri dan jamur yang terdapat di sekitar permukaan medium maupun permukaan eksplan. Hasil analisis persentase eksplan hidup, persentase *browning* dan persentase kontaminasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh Kombinasi Eksplan Tunas dan Konsentrasi TDZ terhadap Persentase Hidup (%), Persentase *Browning* (%) dan Persentase Kontaminasi (%) Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.

Perlakuan	Persentase Hidup (%)	Persentase <i>Browning</i> (%)	Persentase Kontaminasi (%)
Tunas + 0 mg/l TDZ	20	80	0
Tunas + 0,5 mg/l TDZ	10	90	0
Tunas + 1 mg/l TDZ	20	80	0

1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan kemampuan suatu eksplan untuk tumbuh dan berkembang dalam kultur *in vitro*. Persentase eksplan hidup menunjukkan bahwa eksplan mengalami respon pertumbuhan. Persentase eksplan

hidup dipengaruhi oleh persentase kontaminasi dan persentase *browning*. Tujuan dilakukan pengamatan persentase eksplan hidup yaitu untuk mengetahui seberapa besar pengaruh sterilisasi eksplan pada saat penelitian.

Perlakuan yang menggunakan eksplan tunas memiliki persentase eksplan hidup rendah. Pada perlakuan tunas + 0 mg/l TDZ persentase eksplan hidup 20%, tunas + 0,5 mg/l TDZ persentase eksplan hidup 10% dan perlakuan tunas + 1 mg/l TDZ persentase eksplan hidup 20%. Rendahnya persentase eksplan hidup pada perlakuan tunas bukan disebabkan oleh kontaminasi, melainkan disebabkan oleh pencoklatan (*browning*). Eksplan tunas mengalami *browning*, sehingga mengakibatkan pertumbuhan terhambat dan lama-kelamaan eksplan mati. *Browning* terjadi karena senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh eksplan bereaksi dengan oksigen sehingga terjadi oksidasi yang mengakibatkan pencoklatan atau *browning* pada permukaan eksplan akibat adanya luka saat pengirisan eksplan sebelum tanam. Beberapa macam tanaman khususnya tanaman tropika mempunyai kandungan senyawa fenol yang tinggi yang teroksidasi ketika sel dilukai atau terjadi *senescens*, akibatnya jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau kehitaman dan gagal tumbuh (George and Sherrington, 1984).

2. Persentase Eksplan *Browning*

Pencoklatan atau *browning* merupakan perubahan warna yang terjadi pada eksplan, dari warna hijau menjadi coklat atau hitam seperti pada Gambar 8. *Brwoning* timbul karena adanya senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan akibat luka saat pengirisan eksplan. Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dapat terhambat akibat dari *browning*.



Gambar 6. Eksplan Tunas *Vanda tricolor* yang mengalami *Browning* pada 12 MST.

Perlakuan tunas terjadi pencoklatan pada konsentrasi 0 mg/l TDZ di minggu ke-6 dan ke-7. Diikuti dengan konsentrasi 0,5 mg/l TDZ pada minggu ke-4, 6 dan 7. Konsentrasi 1 mg/l TDZ juga terjadi pencoklatan di minggu ke-1, 4 dan 7. Penyebab perlakuan tunas *browning* yaitu, karena eksplan mengalami pelukaan akibat irisan. Pelukaan menyebabkan senyawa fenol dikeluarkan oleh eksplan bereaksi dengan oksigen sehingga terjadi oksidasi yang mengakibatkan pencoklatan atau *browning* pada permukaan eksplan. Selain itu, eksplan tunas memiliki kandungan fenolik yang tinggi sehingga menyebabkan terjadinya *browning* pada eksplan. Hal ini sejalan dengan pernyataan Dwiyani dkk. (2012) yang menyatakan bahwa seringkali terjadi pencoklatan atau *browning* dengan intensitas yang tinggi pada eksplan karena kandungan fenolik yang relatif tinggi pada jaringan tanaman sehingga memicu terjadinya pencoklatan tersebut. Awal pencoklatan terjadi mulai dari pucuk bekas irisan dan kemudian merambat ke

seluruh bagian eksplan, seperti yang terlihat pada gambar 3. Akibat dari pencoklatan tersebut yaitu pertumbuhan dan perkembangan eksplan menjadi terhambat dan lama-kelamaan eksplan mati. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hutami (2008), dimana pencoklatan merupakan peristiwa alamiah yang bisa terjadi pada sistem biologi, yaitu proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat pengaruh fisik dan biokimia.

3. Persentase Eksplan Kontaminasi

Pengamatan persentase kontaminasi bertujuan untuk mengetahui seberapa besar tingkat keberhasilan sterilisasi eksplan, alat dan medium. Semua kegiatan kultur *in vitro* harus terjaga kesterilannya, kurang maksimalnya sterilisasi mengakibatkan terjadinya kontaminasi pada eksplan maupun medium. Persentase kontaminasi dapat dilihat dari adanya bakteri dan jamur di permukaan media maupun menempel pada eksplan. Kontaminasi yang diakibatkan bakteri dicirikan dengan timbulnya lendir pada permukaan medium maupun di permukaan eksplan, sedangkan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur dicirikan dengan tumbuhnya hifa jamur pada permukaan medium maupun eksplan dengan warna putih keabu-abuan, sehingga miselium jamur menyelimuti eksplan dan terjadi kematian pada eksplan. Hasil analisis persentase kontaminasi pada penelitian ini 0% pada semua perlakuan, seperti yang terlihat pada Tabel 2. Hal ini menunjukkan bahwa metode sterilisasi efektif untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Metode sterilisasi diterapkan mulai dari awal sampai akhir kegiatan penelitian.

4. Pertumbuhan Tunas

Dalam mikropropagasi, pertumbuhan tunas ditunjukkan oleh penambahan jumlah tunas, tinggi tunas dan tumbuhnya akar. Namun demikian, hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi eksplan dan penambahan konsentrasi TDZ yang berbeda pada penelitian ini tidak berhasil menumbuhkan tunas maupun akar selama 12 MST. Hal ini diduga karena adanya senyawa fenolik yang teroksidasi dan mengakibatkan *browning* pada eksplan, sehingga menghambat pertumbuhan tunas. Daisy dkk. (1994) menyatakan bahwa pencoklatan merupakan hasil oksidasi dari senyawa fenolik dan menyebabkan kematian jaringan. Senyawa fenolik tersebut dikeluarkan oleh eksplan akibat dari adanya pelukaan pada eksplan.

Berdasarkan hasil penelitian dengan perlakuan medium dan parameter yang sama, dapat dibandingkan bahwa eksplan PLB dapat tumbuh pada semua medium perlakuan. Ditunjukkan oleh penambahan diameter PLB, jumlah tunas dan pertumbuhan akar yang tumbuh pada PLB. Hal ini karena eksplan PLB yang digunakan masih muda berumur 1,5 bulan, senyawa fenol yang terkandung sedikit sehingga persentase terjadinya *browning* rendah. Selain itu, PLB sudah memiliki calon tunas dan calon akar.

Sementara eksplan Tunas tidak menunjukkan penambahan tinggi tunas maupun jumlah tunas serta pertumbuhan akar. Hal ini karena eksplan Tunas yang digunakan berumur 1 tahun, senyawa fenol yang terkandung lebih banyak dibandingkan eksplan PLB, sehingga rentan terhadap *browning* yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan.