

**PENGARUH KOMBINASI EKSPLAN DAN KONSENTRASI
THIDIAZURON TERHADAP PERTUMBUHAN ANGGREK *Vanda tricolor*
SECARA *IN VITRO***

*The Effect Of Explan Combination And Thidiazuron Concentration On Vanda
tricolor Orchid Growth In Vitro*

Dwi Nurdiansyah

Dr. Ir. Innaka Ageng Rineksane, S.P., MP. / Ir. Agung Astuti, M.Si.

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian

ABSTRACT

This study aims to determine the best explant combination and Thidiazuron concentration on Vanda tricolor orchid growth. This research was conducted at the In vitro Culture Laboratory of the Faculty of Agriculture, University of Muhammadiyah Yogyakarta, from February to May 2018. The research was carried out using a single factor experiment method. The treatments tested were prepared in a Completely Randomized Design (RAL). Each treatment consists of 10 replications so that a total of 30 units. All treatments were added 0.5 mg / l NAA, 0.2 g / l activated charcoal and 0.5 ml / l Plant Preservative Mixture (PPM). The treatments tested included: PLB + 0 mg / l TDZ; PLB + 0.5 mg / l TDZ; PLB + 1 mg / l TDZ; Shoots + 0 mg / l TDZ; Shoots + 0.5 mg / l TDZ; Shoots + 1 mg / l TDZ. The concentration of 0.5 mg / l TDZ is the concentration that provides the best growth of PLB in vitro.

Keywords : Orchid Vanda tricolor; Protocorm Like Bodies (PLB); Shoots; Thidiazuron.

A. PENDAHULUAN

Anggrek *Vanda tricolor* merupakan tanaman hias yang mempunyai ciri-ciri berbunga putih dengan bercak totol ungu kemerahan. Anggrek *Vanda tricolor* sendiri merupakan jenis anggrek epifit (menempel pada batang pohon) yang dulunya banyak tumbuh di daerah lereng Selatan Gunung Merapi Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Daerah lereng Selatan Gunung Merapi merupakan tempat yang cocok untuk habitat anggrek *Vanda tricolor* karena daerah tersebut memiliki vegetasi yang mendukung pertumbuhan anggrek *Vanda tricolor* seperti pohon dadap, angkana dan pohon tahunan lainnya (Metusala, 2006). Saat ini populasi anggrek *Vanda tricolor* hampir punah keberadaannya di lereng Selatan Gunung Merapi akibat bencana semburan awan panas pada tahun 2006 yang telah menghancurkan 80% habitat asli anggrek ini. Rusaknya kawasan lereng Merapi menyebabkan lambatnya pertumbuhan dan perkembangbiakan anggrek *Vanda tricolor*. Bahkan pihak masyarakat sekitar lereng Merapi membuka pintu bagi siapa saja yang ingin menanam dan mengembangkan anggrek *Vanda tricolor* di lereng Selatan Merapi (Republika, 2003).

Oleh karena itu, perlu dilakukan perbanyakan anggrek *Vanda tricolor* dengan teknik budidaya yang efektif dalam mempercepat pertumbuhan dan perkembangbiakannya untuk konservasi. Metode perbanyakan secara *in vitro* sangat penting untuk konservasi tumbuhan yang langka dan terancam punah, contohnya seperti anggrek *Vanda tricolor* (Maridass *et al.*, 2010). Perbanyakan anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro* telah banyak dilakukan oleh penelitian sebelumnya, seperti penelitian yang dilakukan oleh Dwiyani (2013) secara *in vitro* menyatakan bahwa penggunaan eksplan batang dan medium tanpa sukrosa dapat memberi hasil yang lebih baik pada pembentukan kalus secara kuantitatif maupun kualitatif. Perbanyakan anggrek secara *in vitro* umumnya menggunakan biji, namun hasil yang diperoleh tidak seragam dan menghasilkan bunga yang beragam (Arditti, 1992). Penelitian Riska dkk. (2013), menyebutkan bahwa rata-rata persentase pertumbuhan dan perkembangan biji anggrek *D. Laxiflorum* berkisar antara 2,48% - 75,66% secara *in vitro*. *Protocorm Like Body* (PLB) adalah tanda biji berkecambah dan berbentuk bulatan yang siap membentuk pucuk dan akar sebagai awal perkecambahan pada biji yang tidak memiliki *endosperm* (Bey *et al.*, 2006).

Penelitian Park *et al.* (2002) menyebutkan bahwa media kultur jaringan dengan menggunakan pupuk NPK (20-20-20) ditambah 2 gram/l pepton dan ditambah arang aktif optimal untuk perbanyakan PLB *Phalaenopsis* hibrida dan mampu memberikan respon yang positif pada perkecambahan biji anggrek *Paraphalaenopsis serpentilingua* (Puspitaningtyas *et al.*, 2006). Penelitian ini akan mengkaji pengaruh jenis eksplan PLB dan tunas terhadap pertumbuhan anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro* menggunakan medium *Vacin and Went* (VW) serta penambahan kombinasi Zat Pengatur Tumbuh sitokinin *Thidiazuron* (TDZ) dengan Auksin NAA. Kombinasi Sitokinin dengan Auksin umumnya digunakan untuk inisiasi kalus dan PLBs (Huan *et al.*, 2004). Park *et al.* (2002) dan Sujjaritthurakarn *et al.* (2011) melaporkan Sitokinin TDZ lebih efektif

menginduksi PLBs dibanding BA dan Zeatin masing-masing pada anggrek *Doritaenopsis* dan *Dendrobium*.

Permasalahan (1) Apakah saling berpengaruh jenis eksplan dengan penambahan TDZ - NAA terhadap induksi kalus anggrek *Vanda tricolor*; (2) Jenis eksplan anggrek *Vanda tricolor* manakah yang pertumbuhannya terbaik jika ditumbuhkan atau dikembangkan secara *in vitro*; (3) Berapa konsentrasi TDZ - NAA yang bisa menstimulasi anggrek *Vanda tricolor*.

Hasil penelitian secara *in vitro* menggunakan eksplan daun anggrek *Vanda tricolor* dewasa yang dilakukan oleh Rineksane dan Sukarjan (2015) menunjukkan persentase eksplan berkalus mencapai 7% pada perlakuan NDM + 0 mg/l TDZ kalus tumbuh 2 MST dan NDM + 0,5 mg/l TDZ kalus tumbuh 6 MST (Minggu Setelah Tanam). Persentase kalus yang dihasilkan tergolong rendah, untuk itu perlu diteliti macam eksplan lainnya dan ditambahkan kombinasi Sitokinin dengan auksin dalam perlakuan agar dapat meningkatkan persentase kalus. Penggunaan kombinasi antara Sitokinin dengan Auksin akan meningkatkan proses induksi kalus (Kartika dkk., 2013).

Hasil penelitian Setiawati dkk. (2016) menggunakan eksplan tunas anggrek secara *in vitro* menyebutkan rata-rata jumlah tunas tertinggi yaitu 14 tunas terdapat pada perlakuan BAP 3 ppm + ekstrak tomat dan rata-rata panjang tunas tertinggi yaitu 2,06 cm pada perlakuan BAP 2 ppm + ekstrak tomat. Penelitian Popy dkk. (2016) menyebutkan kombinasi NAA 1,0 ppm dan BAP 0,5 ppm pada medium $\frac{1}{2}$ MS terbaik menginduksi PLBs dari eksplan batang *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*. Penelitian Chen dan Chang (2006) yang menyatakan bahwa kombinasi NAA 0.01 mg/l dan TDZ 0,03 mg/l efektif menginduksi terbentuknya PLBs dari eksplan daun *Phalaenopsis amabilis*. Diduga jenis eksplan tunas merupakan jenis eksplan yang memberikan respon paling baik terhadap pertumbuhan anggrek *Vanda tricolor* dengan penambahan kombinasi Zat Pengatur Tumbuh antara *Thidiazuron* (TDZ) 1 mg/l dengan NAA 0,5 mg/l. Diduga jenis eksplan tunas merupakan jenis eksplan yang memberikan respon paling baik terhadap pertumbuhan anggrek *Vanda tricolor* dengan penambahan kombinasi Zat Pengatur Tumbuh antara *Thidiazuron* (TDZ) 1 mg/l dengan NAA 0,5 mg/l.

Tujuan penelitian : (1) Menentukan konsentrasi *Thidiazuron* yang terbaik terhadap pertumbuhan eksplan PLB *Vanda tricolor*. (2) Menentukan konsentrasi *Thidiazuron* yang terbaik terhadap pertumbuhan eksplan Tunas *Vanda tricolor*.

B. TATA CARA PENELITIAN

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Februari sampai Mei 2018.

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *glassware*, *dissecting kits*, pH meter, pembagi media, *autoklaf*, neraca analitik, *scalpel*, *stirer*, *milipore*, pipet tetes, sendok, bunsen, cawan timbang, *petridish*, *erlenmeyer*, botol kultur dan *Laminar Air Flow Cabinet*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari eksplan PLB umur 1,5 bulan dan tunas anggrek *Vanda tricolor in vitro* umur 1 tahun, medium *Vacin and Went* (VW), Zat Pengatur Tumbuh *Thidiazuron* (TDZ), *Napthalene Acetic Acid* (NAA), sukrosa, *Phytigel* (agar), Alkohol, arang aktif, *Plant Preservatif Mixture* (PPM), *aluminium foil*, kertas payung, karet, HCl, KOH, *plastic wrap*, spirtus dan aquadest steril.

Metode Penelitian ini terdiri dari 2 tahap, yaitu :

- a) Tahap 1 : Pengaruh konsentrasi TDZ terhadap eksplan PLB *Vanda tricolor* secara *in vitro*.

Penelitian dilaksanakan menggunakan metode percobaan faktor tunggal 3 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan eksplan PLB. Tiap 3 perlakuan terdiri dari 10 ulangan sehingga total 30 unit, semua perlakuan ditambahkan 0,5 mg/l NAA, 0,2 g/l arang aktif dan 0,5 ml/l *Plant Preservative Mixture* (PPM). Perlakuan yang diuji meliputi : PLB + 0 mg/l TDZ; PLB + 0,5 mg/l TDZ; PLB + 1 mg/l TDZ.

- b) Tahap 2 : Pengaruh konsentrasi TDZ terhadap eksplan Tunas *Vanda tricolor* secara *in vitro*.

Penelitian dilaksanakan menggunakan metode percobaan faktor tunggal 3 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan eksplan tuans. Tiap 3 perlakuan terdiri dari 10 ulangan sehingga total 30 unit, semua perlakuan ditambahkan 0,5 mg/l NAA, 0,2 g/l arang aktif dan 0,5 ml/l *Plant Preservative Mixture* (PPM). Perlakuan yang diuji meliputi : Tunas + 0 mg/l TDZ; Tunas + 0,5 mg/l TDZ; Tunas + 1 mg/l TDZ.

Pelaksanaan Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu mulai dari sterilisasi alat, pembuatan medium, persiapan ZPT (TDZ+NAA), persiapan media pertumbuhan, persiapan eksplan, inokulasi dan pemeliharaan. Adapun penjelasan tahapan tersebut, yaitu : **Sterilisasi alat.** Sterilisasi basah bertekanan dilakukan dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus dengan kertas payung dalam *autoklaf* pada suhu 121°C bertekanan 1 atm selama 30 menit. Sterilisasi bakar menggunakan lampu bunsen yang dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF). Cara yang digunakan yaitu dengan dicelupkan dahulu alat yang digunakan dalam Alkohol 70%, kemudian dibakar pada lampu spritus. **Persiapan ZPT.** Persiapan pembuatan stok TDZ dan NAA yaitu masing-masing ZPT ditimbang 0,01 gram dan ditambahkan beberapa tetes KOH, kemudian ditambahkan aquadest steril sampai mencapai 100 ml. Rumus kebutuhan untuk setiap ulangan disajikan pada (lampiran E.1). **Pembuatan medium.** Medium VW dibuat sebanyak 1200 ml untuk 6 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing-masing perlakuan digunakan 10 botol kultur, sehingga terdapat 60 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml larutan medium VW. Tabel perhitungan medium VW disajikan pada (lampiran tabel A.1). **Persiapan eksplan.** Eksplan PLB diambil satu persatu dari koleksi anggrek botol menggunakan *scalpel* dan ditanam kembali pada masing-masing botol kultur sesuai perlakuan. Masing-masing botol kultur berisi 1 PLB eksplan anggrek. Eksplan tunas yang digunakan yaitu tunas yang paling muda pada bagian tengah. Sebelum ditanam, eksplan tunas terlebih dahulu direndam *clorox* 5% selama 5 menit agar lebih steril, kemudian dibilas dengan aquadest steril sebanyak tiga kali. Bagian pucuk tunas

dipotong dan bagian pangkal tunas juga dipotong dengan menyisakan sedikit akar. Barulah kemudian eksplan ditanam pada masing-masing botol kultur yang berisi medium sesuai dengan perlakuan. **Inokulasi.** Inokulasi dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang terlebih dahulu disterilkan dengan menyemprotkan Alkohol 70% dan dikeringkan menggunakan tisu yang kemudian disterilisasi kembali menggunakan lampu UV yang dinyalakan 1 jam sebelum digunakan. *Blower* dinyalakan di dalam LAF 10 menit setelah lampu UV mati sebelum LAF digunakan. Setelah LAF siap digunakan, Eksplan PLB dan tunas anggrek *Vanda tricolor* diinokulasi. Setiap botol kultur diinokulasi 1 eksplan anggrek dan ditutup dengan *aluminium foil* secara rapat dan bagian luar dilapisi plastik *wrap* dan dilabel. **Pemeliharaan.** Pemeliharaan dilakukan selama dua bulan terhitung setelah penanaman. Rak-rak yang berada di ruang inkubasi dibersihkan dengan menyemprot Alkohol 70%.

Variabel Pengamatan dilakukan selama 12 Minggu dengan berbagai variabel pertumbuhan. Parameter pengamatan dilihat dari kedua eksplan yang di kulturkan, adapun variabel pertumbuhan yang diamati, sebagai berikut :

1. **Persentase eksplan hidup.** Pengamatan dilakukan dengan cara melihat eksplan yang hidup (eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan atau *browning* >80%) diamati setiap seminggu sekali selama 12 minggu. Rumus perhitungan persentase eksplan hidup disajikan pada (lampiran E.2).
2. **Persentase *browning*.** Eksplan yang mengalami *browning* ditunjukkan dengan warna kecoklatan >50% pada eksplan. Rumus perhitungan disajikan pada (lampiran E.3).
3. **Persentase kontaminasi.** Eksplan yang terkontaminasi diamati setiap seminggu sekali selama 12 minggu. Eksplan dikatakan terkontaminasi apabila terdapat jamur atau bakteri pada eksplan atau medium kultur tersebut. Rumus perhitungan disajikan pada (lampiran E.4).
4. **Pertambahan diameter PLB.** Pengamatan dilakukan dengan mengukur eksplan PLB menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm). Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali dari sudut yang berbeda, kemudian dirata-rata. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu, kemudian dihitung selisih diameter eksplan. Rumus selisih disajikan pada (lampiran E.5).
5. **Tinggi tunas.** Pengamatan yang dilakukan dengan mengukur tinggi eksplan tunas saja mulai dari permukaan medium sampai ujung daun dengan satuan sentimeter (cm). Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali dari sudut yang berbeda, kemudian dirata-rata. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu.
6. **Jumlah tunas.** Pengamatan dilakukan satu minggu sekali selama 12 minggu dengan mengamati jumlah tunas yang tumbuh pada masing-masing eksplan. Tunas yang diamati yaitu tunas yang sudah memiliki bakal daun atau yang sudah memiliki tinggi 2 mm.
7. **Waktu muncul tunas.** Pengamatan dilakukan satu minggu sekali selama 12 minggu dengan mengamati tunas baru yang tumbuh pada masing-masing eksplan. Waktu muncul tunas yang diamati ialah benjolan berwarna hijau yang terdapat pada eksplan.
8. **Persentase eksplan bertunas.** Persentase eksplan bertunas dihitung setiap minggu selama 12 minggu. Perhitungan dilakukan dengan melihat pertambahan

tunas baru pada masing-masing eksplan dan dinyatakan dalam persen. Rumus disajikan pada (lampiran E.6).

9. **Persentase eksplan berakar.** Persentase eksplan berakar dihitung setelah selesai pengamatan. Perhitungan dilakukan dengan melihat jumlah eksplan yang berakar pada hari terakhir pengamatan dan dinyatakan dalam persen. Rumus disajikan pada (lampiran E.7).

Analisis data hasil pengamatan diolah dengan software *Statistical Analysis System* (SAS). Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam *General Linier Model* (GLM). Jika hasil menunjukkan signifikansi pada taraf $\alpha = 5\%$, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Jarak berganda DMRT (*Duncan Multiple Range Tes*) pada taraf $\alpha = 5\%$ untuk mengetahui perlakuan yang berbeda nyata atau tidak berbeda nyata. Hasil analisis ditampilkan dalam bentuk tabel, histogram dan gambar.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

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 (lampiran A.4).

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 (lampiran A.4) 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 A.3) 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 (lampiran A.4). 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 C.1) pengamatan rerata pertumbuhan pada perlakuan PLB terhadap parameter diameter PLB menunjukkan tidak ada beda nyata, seperti yang disajikan pada (Gambar B.1). Pada perlakuan PLB, rerata diameter eksplan pada (Gambar B.1) 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 B.1), konsentrasi 0,5 mg/l TDZ cenderung lebih baik terhadap pertambahan 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 pertambahan 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 pertambahannya 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 C.2) 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.

Pada histogram (Gambar B.2) 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 C.3), 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 B.3).

Berdasarkan histogram (Gambar B.3), 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 C.3) dan (Gambar B.3), 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.

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 B.4).

Berdasarkan histogram (Gambar B.4), 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 B.5). 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 *Raufolesia serpentina*.

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 (lampiran A.5).

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 pelukaan 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 B.6). *Brwoning* timbul karena adanya senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan akibat pelukaan saat pengirisan eksplan. Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dapat terhambat akibat dari *browning*.

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 B.6). 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 (lampiran A.5). 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.

D. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan : (1) Konsentrasi 0,5 mg/l TDZ merupakan konsentrasi terbaik terhadap pertumbuhan eksplan PLB secara *in vitro*. (2) Semua konsentrasi TDZ tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplan Tunas secara *in vitro*, sehingga tidak ada konsentrasi terbaik terhadap pertumbuhan eksplan Tunas secara *in vitro*.

Saran : Kombinasi konsentrasi TDZ pada penelitian ini tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplan Tunas secara *in vitro*. Maka perlu dilakukan uji lanjut untuk menentukan konsentrasi TDZ yang cocok untuk merespon pertumbuhan eksplan Tunas secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1993. *Dasar-dasar pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh*. Angkasa. Bandung. 85 hal.
- Ahmad, S., Amin, M.N., Azad, M.A.K., dan Mosaddik, M.A. 2002. Micropropagation and Plant Regeneration of *Rauwolfia serpentine* by Tissue Culture Technique. *Journal of Biological Sciences* 5(1): 75-79. Asian Network for Scientific Information. Pakistan.
- Arditti, J. 1992. *Fundamental of Orchid Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. USA. Pp. 550-557.
- Bey, Y., W. Syafii, dan Sutrisna. 2006. Pengaruh Pemberian Giberelin (GA3) dan Air Kelapa terhadap Perkecambahan Bahan Biji Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* BL) secara *In Vitro*. *Jurnal Biogenesis*. 2 (2): 41-46.
- Bey, Y., W. Syafii, dan N. Ngatifah. 2006. Pengaruh Pemberian Giberelin pada media *Vacint dan Went* terhadap perkecambahan Biji Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* BL) secara *In Vitro*. *Jurnal Biogenesis*. 14 (1): 15-21.
- Campbell, N.A, J.B. Reece and L.G. Mitchell. 2003. Biologi. Alih Bahasa : L. Rahayu, E.I.M Adil, N Anita, Andri, W.F Wibowo, W. Manalu. Penerbit Erlangga. Jakarta. 56-57 hal.
- Chen, J.T. and W.C. Chang, 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biol Plant*, 50: 169-173.
- Chen, J.T, W.C. Chang. 2004. Induction of repetitive embryogenesis from seed derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa Shimadzu. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 40: 290-293.
- Daisy, P., S. Hendaryono, dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta. 15 hal.
- Davies, P.J. 1995. "Plant Hormones, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology." In A.D. Krikorian (Ed.) *Hormones in Tissue Culture and Micropropagation*. Kluwer Publishing. Dordest. Pp: 774-793.
- Dwiyani, R., Purwanto, A. Indrianto, A., dan Semiarti, E. 2012. Konservasi Anggrek Alam Indonesia *Vanda tricolor* Lindl. Varietas Suavis Melalui Kultur Embrio Secara In-Vitro. *Jurnal Bumi Lestari*, 12 (1) : 93 – 98.

- Dwiyani, R. 2013. Mikropropagasi anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali yang membawa gen *KNOTTED 1-LIKE Arabidopsis thaliana* (*KNAT1*). Disertasi. Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 18 (2): 73-76.
- Fibrianty, E. 2013. Induksi Protocorm-Like Bodies (Plbs) dan Karakterisasi Molekuler Populasi F2 Anggrek *Phalaenopsis*. TESIS Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor Bogor. P: 15.
- George, E.F. and P.D. Sherrington 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Hand Book and Directory of Comercial Laboratories*. Eastern Press, Reading, Berks. England. p. 9-449.
- George, E.F. and P.D. Sherrington 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Comercial Laboratories*. Exegetics Ltd., Everslay. Bsingtoke. England. 709 p.
- Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu LL, Wei YH (2011) Thiadiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *Afr J Biotechnol* 10:8984-9000. doi: 10.5897/AJB11.636.
- Hoesen, D. S. H, Witjaksono, dan Sukamto LA. 2008. Induksi Kalus dan Organogenesis Kultur *In vitro Dendrobium lineale Rolfe*. *Berita Biologi* 9(3). 333-341 hlm.
- Huan LVT, Takamura T, Tanaka M, 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid*. *Plant Sci.*: 1443-1449.
- Husni, A. 1997. “Perbanyakan dan Penyimpanan Tanaman Inggu Melalui Kultur Jaringan”. *Buletin Plasma Nutfah* 2(1). Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor. Bogor. 4 (2): 33-40.
- Hutami, S. 2008. Ulasan ‘Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan’. *AgroBiogen*, 4 (2): 83- 88.
- Kartika,L,. P. Kianto, A,.L.M. Ekawati, P,. 2013. Kecepatan Induksi Kalus Dan Kandungan Eugenol Sirih Merah (*Piper crocatum ruiz and pav.*) Yang Diperlakukan Menggunakan Varietas Jenis dan Konsentrasi Auksin. e-jurnal Universitas Atma Jaya Yogyakarta. <http://e-journal.uajy.ac.id/4836/1/naskah%20jurnal.pdf> akses 2 Juni 2017.
- Latip, M.A., R. Datin, Z.A. Murdad, Aziz, I. Ting L, HuiL, Malar, Govindasamy, and R. Ripin. 2010. Effects of - benzyladenine and thidiazuron on proliferation of *Phalaenopsis gigantea* protocorms. *Asia Pacific. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 18(1): 217-220.

- Maridass, M., R. Mahesh, G. Raju, A. Benniamin, and K. Muthucellian. 2010. *In vitro* Propagation of *Dendrobium nanum* Through Rhizome Bud Culture. *International Journal of Biotechnology*. 1 (2) : 50-54.
- Metusala, D. 2006. Melirik Konservasi Anggrek *Vanda tricolor* di Merapi. <http://www.anggrek.org/melirik-konservasi-anggrek-vanda-tricolor-di-merapi-2.html>. Diakses tanggal 22 Mei 2017.
- Park SY, Yeung EC, Chakrabarty D, Paek KY, 2002. An efficient direct induction of *protocorm-like bodies* from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Cell Biol and Morphogenesis* 21 : 46-51.
- Park, S.Y., H.N. Murthy, K.Y. Paek. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk derived leaves. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 38 : 119.
- Popy, H. H, Chandra W. S. B dan W. Dian Safitri. 2016. INDUKSI PROTOCORM-LIKE BODIES (PLBs) *Vanda tricolor* Lindl. var. *Pallida*. Proceeding Seminar Nasional Biodiversitas VI, Surabaya 3 September 2016. hal: 177.
- Puspitaningtyas, D.M., S. Mursidawati, dan S. Wijayanti. 2006. Studi *fertilitas Paraphalaenopsis serpetilingua* J. J. Smith. *Biodiversitas* 7(3): 237-241.
- Republika. 2003. *Anggrek khas lereng merapi terancam punah*. <http://www.republika.co.id/berita/nasional/daerah/15/02/03/nj6qlj-anggrek-khas-lereng-merapi-terancam-punah>. Diakses tanggal 22 Mei 2017.
- Rineksane, I. A dan M. Sukarjan. 2015. Regenerasi Anggrek *Vanda tricolor* Pasca Erupsi Merapi Melalui Kultur *In vitro*. http://repository.upy.ac.id/428/1/1P13_Innaka%20Ageng%20378-384.pdf. Diakses tanggal 22 Mei 2017.
- Riska, A., Tutik, N. dan Siti, N. 2013. Pengaruh Jenis dan Kombinasi Vitamin Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith Secara *In Vitro*. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits* 1 (1) : 1-6.
- Sabar S.N. 2013. Pengaruh Teknik Sterilisasi Terhadap Keberhasilan Inisiasi Eksplan *Paulownia (Paolownia elongata sy. Hu)* Secara *In vitro*. Skripsi Departemen Silvikultur Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. 202 hal.

- Sari DI, Suwirnen, Nasir N (2015) Pengaruh konsentrasi thidiazuron (TDZ) dan arang aktif pada sub kultur tunas pisang kepok hijau (*Musa paradisiaca* L.). Online J Natural Sci 4:280-289.
- Setiawati, T., M. Nurzaman, E.S. Rosmiati, G.G. Pitaloka. 2016. Pertumbuhan Tunas Anggrek *Dendrobium* SP. Menggunakan Kombinasi *Benzyl Amino Purin* (BAP) Dengan Ekstrak Bahan Organik Pada Media *Vacin and Went* (VW). Jurnal Pro-Life. 3 (3)
- Sujjaritthurakarn P, Kanchananpoom K, 2011. Efficient direct protocorm-like bodies induction of dwarf *Dendrobium* using Thidiazuron. *Not. Sci. Biol.* 3 (4) : 88-92.
- Untari, R. dan M.P Dwi. 2006. Pengaruh Bahan Organik dan NAA terhadap Pertumbuhan Anggrek Hitam (*Co-elygyne pandurata* Lindl.) dalam Kultur in Vitro. *Biodiversitas.* 7 (3): 344-348.
- Wattimena, G.A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. PAU Bioteknologi Tanaman. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Bogor. 4 (2): 33-40.
- Wattimena, G.A., Gunawan, L.W., Matjik, N.A., Syamsudin, E., Wendi, N.M.A., dan Gunawan, A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi Tanaman. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Bogor. 4 (2): 33-40.
- Wetherell, D. F. 1982. *Pengantar Propagasi Tanaman Secara In Vitro*. Semarang : IKIP Semarang Press. Diakses tanggal 18 April 2018.
- Winarsih, S dan Priyono. 2000. "Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh terhadap Pembentukan dan Pengakaran Tunas Mikro pada Asparagus secara *In Vitro*." *J. Hort.* 10 (1): 11 - 17.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

A. Lampiran Tabel :

1. Perhitungan Komponen Pembuatan Medium VW (200 ml) dengan Penambahan ZPT.

Perlakuan	Komponen Medium						
	VW	Sukrosa	NAA	PPM	Phytigel	Arang aktif	TDZ
P + 0 mg/l TDZ	0,334 gram	6 gram	1 ml	0,1 ml	0,6 gram	0,04 gram	0 ml
P + 0,5 mg/l TDZ	0,334 gram	6 gram	1 ml	0,1 ml	0,6 gram	0,04 gram	1 ml
P + 1 mg/l TDZ	0,334 gram	6 gram	1 ml	0,1 ml	0,6 gram	0,04 gram	2 ml
T + 0 mg/l TDZ	0,334 gram	6 gram	1 ml	0,1 ml	0,6 gram	0,04 gram	0 ml
T + 0,5 mg/l TDZ	0,334 gram	6 gram	1 ml	0,1 ml	0,6 gram	0,04 gram	1 ml
T + 1 mg/l TDZ	0,334 gram	6 gram	1 ml	0,1 ml	0,6 gram	0,04 gram	2 ml

2. Layout Penelitian

P1 (1)	T2 (3)	P2 (9)	T2 (8)	T2 (4)	T3 (6)	T3 (4)	P3 (1)	P1 (5)	T3 (2)
P1 (2)	P2 (2)	P1 (3)	T1 (1)	P3 (5)	T1 (2)	P2 (5)	T3 (5)	P3 (2)	T1 (6)
P3 (8)	T1 (7)	T1 (4)	P3 (6)	T2 (1)	P3 (7)	P1 (9)	T2 (2)	P1 (8)	P1 (4)
T3 (10)	P3 (4)	T1 (9)	P1 (6)	T3 (7)	T2 (9)	T3 (3)	P1 (10)	P3 (10)	T3 (1)
T2 (7)	P2 (1)	T1 (3)	P3 (3)	P2 (3)	T3 (8)	P2 (7)	P1 (7)	P2 (6)	P2 (8)
P2 (4)	T1 (5)	T1 (8)	T2 (10)	T2 (6)	P2 (10)	T1 (10)	P3 (9)	T3 (9)	T2 (5)

3. Tabel Kandungan Medium VW

Unsur	Komponen	mg/l
Makro	Ca ₃ (PO ₄) ₂	200
	KNO ₃	525
	KH ₂ PO ₄	250
	(NH ₄) ₂ . SO ₄	500
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	250
Mikro	MnSO ₄ 4 H ₂ O	7,5
	Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃ 2H ₂ O	28

Sumber: George & Sherington 1984

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

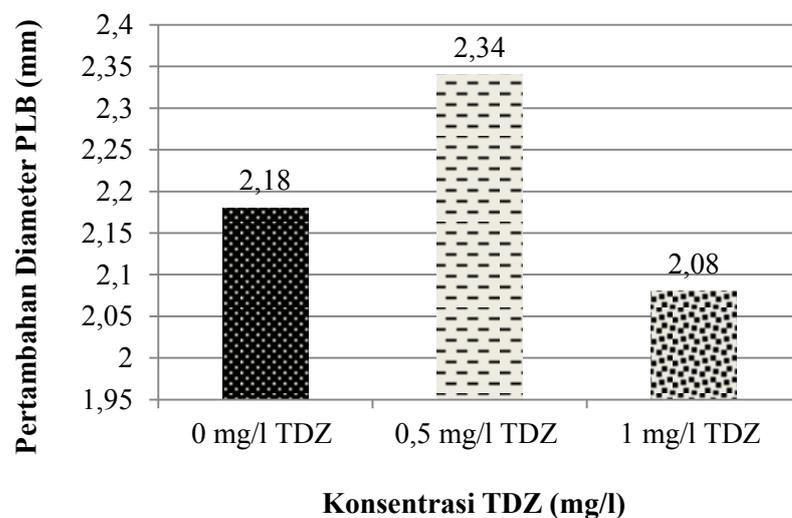
Perlakuan	Persentase Hidup (%)	Persentase <i>Browning</i> (%)	Persentase Kontaminasi (%)
PLB + 0 mg/l TDZ	100	0	0
PLB + 0,5 mg/l TDZ	80	20	0
PLB + 1 mg/l TDZ	100	0	0

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

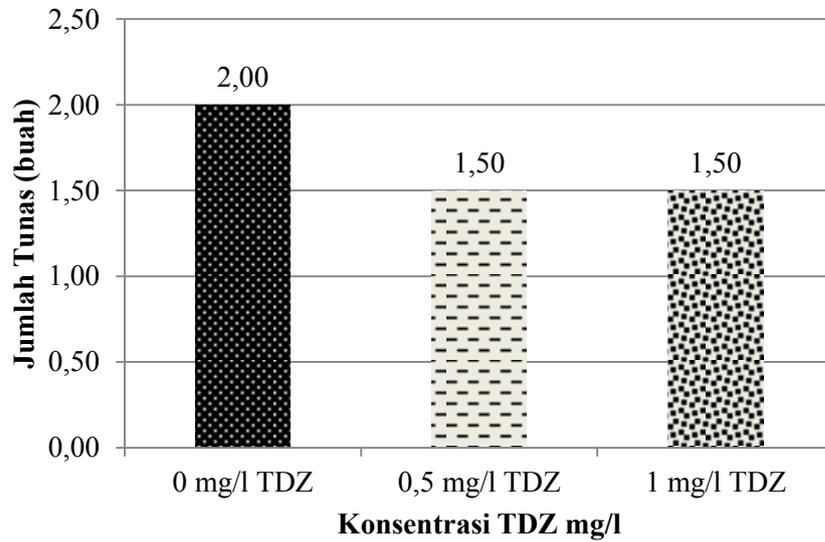
Perlakuan	Persentase Hidup (%)	Persentase <i>Browning</i> (%)	Persentase Kontaminasi (%)
Tunas + 0 mg/l TDZ	20	80	0
Tunas + 0,5 mg/l TDZ	10	90	0
Tunas + 1 mg/l TDZ	20	80	0

B. Lampiran Gambar :

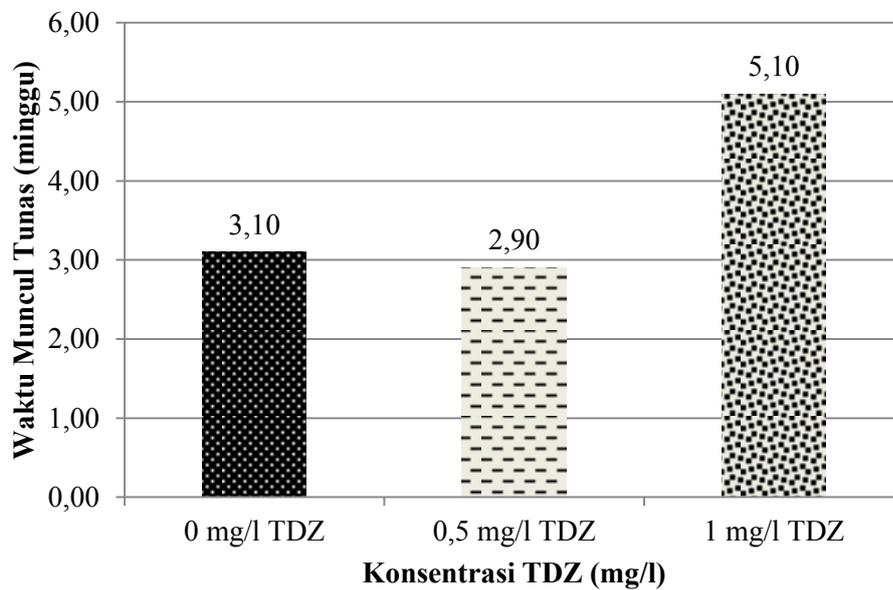
1. Pengaruh Konsentrasi TDZ terhadap Pertambahan Diameter Eksplan PLB Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.



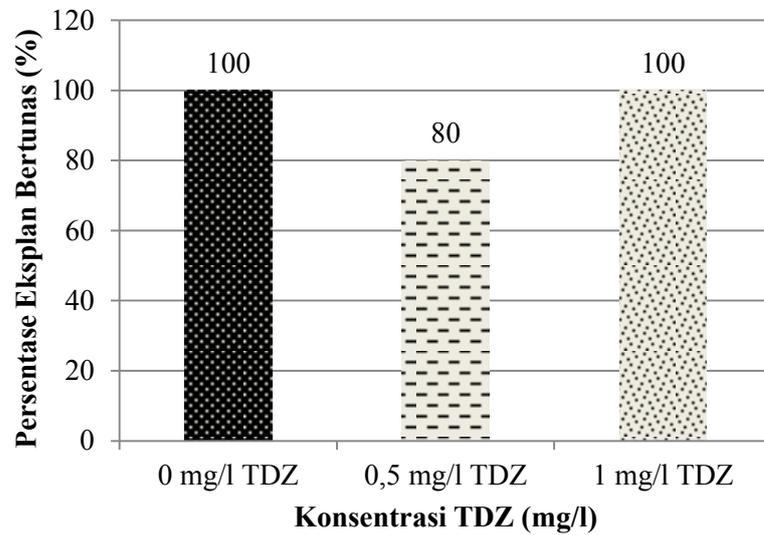
2. Pengaruh Kombinasi Eksplan PLB dan Konsentrasi TDZ terhadap Rerata Pertambahan Σ Tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.



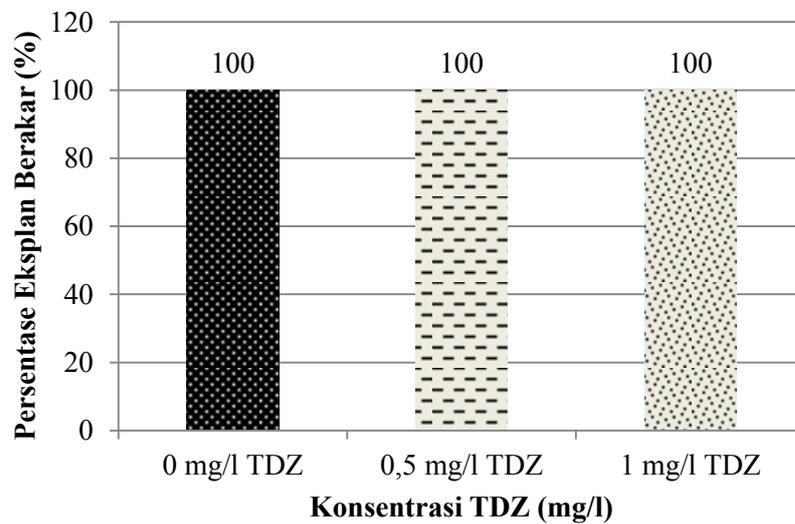
3. Pengaruh Kombinasi Eksplan PLB dan Konsentrasi TDZ terhadap Rerata Waktu Muncul Tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 12 MST.



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



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



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



C. Lampiran sidik ragam (ANOVA)

1. Diameter PLB

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	Pr>F
Model	2	0,34400000	0,17200000	0,21	0,8113ns
Perlakuan	2	0,34400000	0,17200000	0,21	0,8113ns
Galat	27	22,03600000	0,81614815		
Total	29	22,38000000			

Keterangan :

ns : tidak ada beda nyata

s : ada beda nyata

2. Tinggi Tunas

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	Pr>F
Model	2	0,05000000	0,02500000	0,38	0,6894ns
Perlakuan	2	0,05000000	0,02500000	0,38	0,6894ns
Galat	27	1,79000000	0,06629630		
Total	29	1,84000000			

Keterangan :

ns : tidak ada beda nyata

s : ada beda nyata

3. Jumlah Tunas

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	Pr>F
Model	2	1,66666667	0,83333333	0,64	0,5336ns
Perlakuan	2	1,66666667	0,83333333	0,64	0,5336ns
Galat	27	35,00000000	1,29629630		
Total	29	36,66666667			

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	Pr>F
Model	2	0,00000000	0,00000000	0,00	0,00
Perlakuan	2	0,00000000	0,00000000	0,00	0,00
Galat	27	0,00000000	0,00000000		
Total	29	0,00000000			

Keterangan :

ns : tidak ada beda nyata

s : ada beda nyata

4. Waktu Muncul Tunas

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	Pr>F
Model	2	29,60000000	14,80000000	2,37	0,1128ns
Perlakuan	2	29,60000000	14,80000000	2,37	0,1128ns
Galat	27	168,70000000	6,2481481		
Total	29	198,30000000			

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	Pr>F
Model	2	0,00000000	0,00000000	0,00	0,00
Perlakuan	2	0,00000000	0,00000000	0,00	0,00
Galat	27	0,00000000	0,00000000		
Total	29	0,00000000			

Keterangan :

ns : tidak ada beda nyata

s : ada beda nyata

D. Lampiran Persiapan ZPT dan Medium VW



P1



Media VW + 1 ml NAA + 0,1 PPM + 0,04 arang aktif + aquadest hingga volume larutan menjadi 200 ml + 0 ml TDZ, kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).



P2



Media VW + 1 ml NAA + 0,1 PPM + 0,04 arang aktif + aquadest hingga volume larutan menjadi 199 ml + 1 ml TDZ, kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).



P3



Media VW + 1 ml NAA + 0,1 PPM + 0,04 arang aktif + aquadest hingga volume larutan menjadi 198 ml + 2 ml TDZ, kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).



T1



Media VW + 1 ml NAA + 0,1 PPM + 0,04 arang aktif + aquadest hingga volume larutan menjadi 200 ml + 0 ml TDZ, kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).



T2



Media VW + 1 ml NAA + 0,1 PPM + 0,04 arang aktif + aquadest hingga volume larutan menjadi 199 ml + 1 ml TDZ, kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).



T3



Media VW + 1 ml NAA + 0,1 PPM + 0,04 arang aktif + aquadest hingga volume larutan menjadi 198 ml + 2 ml TDZ, kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

E. Lampiran Rumus perhitungan

1. *Kebutuhan ZPT* = $\frac{\text{Total larutan setiap ulangan (ml)}}{1000 \text{ ml aquadest}} \times \text{ZPT (ml)}$
2. *Persentase eksplan hidup (%)* = $\frac{\Sigma \text{eksplan hidup}}{\Sigma \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$
3. *Persentase eksplan browning (%)* = $\frac{\Sigma \text{eksplan browning}}{\Sigma \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$
4. *Persentase eksplan kontaminasi (%)* = $\frac{\Sigma \text{eksplan terkontaminasi}}{\Sigma \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$
5. *Selisih diameter eksplan* = Diameter PLB 8 MST – Diameter PLB 1 MST
6. *Persentase eksplan bertunas (%)* = $\frac{\Sigma \text{eksplan bertunas}}{\Sigma \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$
7. *Persentase eksplan berakar (%)* = $\frac{\Sigma \text{eksplan berakar}}{\Sigma \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$