

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Persentase Eksplan Hidup, Kontaminasi, *Browning* dan Vitrifikasi

Persentase eksplan hidup, kontaminasi, *browning* dan vitrifikasi merupakan gambaran tingkat keberhasilan dalam kultur *in vitro*. Persentase eksplan hidup menandakan kemampuan eksplan dalam beradaptasi dan bertahan hidup pada medium tumbuh. Dalam hal ini persentase eksplan hidup dapat menandakan kecocokan eksplan pada medium yang diberikan. Hal ini dikarenakan komposisi medium sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

Persentase eksplan hidup, dipengaruhi oleh persentase eksplan kontaminasi, persentase eksplan *browning* dan persentase eksplan vitrifikasi. Kontaminasi, *browning* dan vitrifikasi yang terjadi pada eksplan dapat menyebabkan eksplan mati, karena pertumbuhan eksplan menjadi terhambat. Hasil persentase eksplan hidup, kontaminasi, *browning* dan vitrifikasi disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh komposisi medium NDM + (TDZ, air kelapa, ekstrak pisang dan ekstrak tomat) terhadap persentase eksplan hidup, kontaminasi, *browning* dan vitrifikasi *Vanda tricolor* pada 8 MST.

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)	Persentas Eksplan Kontaminasi (%)	Persentase Eksplan <i>Browning</i> (%)	Persentase Eksplan Vitrifikasi (%)
NDM + TDZ 0,5 ml/L	40	6,7	20	33,3
NDM + Air Kelapa 150 ml/L	53	0,0	20	27,0
NDM + Air Kelapa 150 ml/L+ Ekstrak Pisang 150 g/L	67	0,0	33	0,0
NDM + Air kelapa 150 ml/L+ Ekstrak Tomat ml/L	53	0,0	47	0,0

1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan jumlah eksplan yang mampu beradaptasi pada medium tumbuh yang ditandai dengan adanya pertumbuhan dan perkembangan pada eksplan tersebut. Persentase eksplan hidup diamati untuk menghitung jumlah eksplan yang dapat bertahan hidup pada medium perlakuan yang diberikan. Kriteria eksplan dapat dikatakan hidup apabila eksplan berwarna hijau atau hijau muda, tidak mengalami kontaminasi, *browning* dan vitrifikasi. Persentase eksplan hidup disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2, dapat diketahui bahwa pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L+ ekstrak pisang 150 g/L menunjukkan persentase eksplan hidup tertinggi yaitu 67%. Hal ini dikarenakan pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L+ ekstrak pisang 150 g/L, rata-rata eksplan dapat tumbuh dengan baik yang ditandai dengan pertumbuhan tinggi tunas, pertumbuhan daun, munculnya akar dan munculnya tunas. Sementara itu persentase eksplan hidup terendah terdapat pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L dengan persentase 40%. Pada perlakuan tersebut eksplan banyak yang mengalami vitrifikasi dan *browning* serta kontaminasi, sehingga hal tersebut menjadi kendala dalam pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Terjadinya vitrifikasi, *browning* dan kontaminasi berpengaruh terhadap rendahnya persentase eksplan hidup pada multiplikasi anggrek *Vanda tricolor*.

Pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L, dengan persentase hidup yang tinggi menunjukkan bahwa eksplan dapat beradaptasi pada medium tersebut. Hal ini ditunjukkan dengan adanya

pertumbuhan dan perkembangan yang terjadi pada eksplan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) penambahan zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium untuk pertumbuhan dan diferensiasi. Kandungan auksin dalam ekstrak pisang berguna untuk pembelahan sel dan diferensiasi akar, sementara itu sitokinin pada air kelapa berperan untuk pembesaran sel dan diferensiasi tunas (Abbas, 2011).

2. Persentase Eksplan Kontaminasi

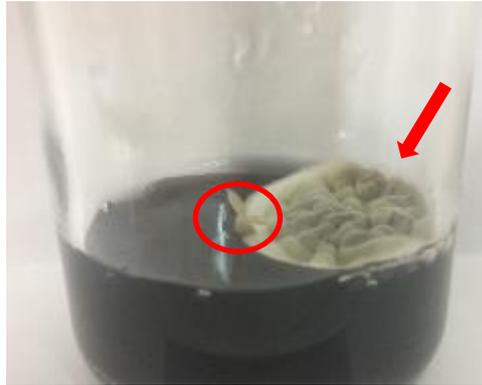
Kontaminasi merupakan salah satu masalah yang umum terjadi dalam kegiatan kultur *in vitro*. Jenis kontaminan dapat berupa cendawan, bakteri atau keduanya. Eksplan dan medium tumbuh merupakan komponen yang rentan terkontaminasi oleh mikroorganisme. Menurut Gunawan (1995), medium tumbuh kultur jaringan merupakan medium yang sangat menguntungkan bagi cendawan dan bakteri. Mikroorganisme tersebut dapat tumbuh dengan cepat dan akan menutupi bagian permukaan medium dan eksplan yang ditanam. Disamping itu mikroorganisme dapat menyerang eksplan melalui luka-luka akibat pemotongan, bahkan beberapa jenis mikroorganisme melepaskan senyawa beracun ke dalam medium kultur sehingga dapat menyebabkan kematian jaringan pada eksplan. Persentase eksplan kontaminasi disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2, kontaminasi hanya terjadi pada perlakuan NDM + TDZ 0.5 ml/L dengan persentase 6,7 %. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kontaminasi disebabkan oleh cendawan yang tumbuh pada medium (Gambar 1) dan ditandai dengan adanya *miselium* jamur berwarna putih keabu-abuan pada permukaan medium. Kontaminan tersebut diduga bukan berasal dari eksplan yang

digunakan, karena tunas angrek *Vanda tricolor* yang digunakan sebagai eksplan merupakan tunas yang sudah steril. Kontaminan diduga berasal dari proses pemberian ZPT (Thidiazuron) yang baru ditambahkan setelah sterilisasi medium di autoklaf.

Penambahan TDZ dilakukan dengan menggunakan jarum suntik dan *millipore*. Hal ini memungkinkan sumber kontaminan baru dapat masuk ke dalam medium pada saat penambahan ZPT lewat alat-alat yang digunakan seperti jarum suntik dan *miliipore*. Sementara itu, medium tidak disterilisasi kembali di autoklaf. Menurut Daud *et al.*, (2012). Mikroba dapat hadir dari dalam eksplan itu sendiri atau dapat muncul kembali pada saat penanganan proses sterilisasi yang tidak efektif, kondisi di dalam laboratorium yang kurang higienis, peralatan yang laboratorium termasuk peneliti.

Pada penelitian ini seluruh medium perlakuan ditambahkan PPM (*Plant Preservative Mixture*) yang berfungsi untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme, sehingga dapat dipastikan sumber kontaminan bukan berasal dari medium yang digunakan. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terjadi kontaminasi pada perlakuan NDM + Air kelapa 150 ml/L, NDM + Air kelapa 150 ml/L + Ekstrak Pisang 150 g/L dan NDM + Air kelapa 150 ml/L + Ekstrak Tomat 150 ml/L. Pada perlakuan tersebut tidak terdapat penambahan ZPT setelah tahap sterilisasi sehingga mikroorganisme berpeluang kecil untuk masuk ke dalam medium. Eksplan terkontaminasi cendawan pada 5 MST pada gambar 1.



Keterangan : Panah merah menunjukkan cendawan pada medium dan lingkaran merah menunjukkan eksplan yang terkontaminasi.

Gambar 1. Eksplan *Vanda tricolor* terkontaminasi cendawan pada 5 MST,

Pada Gambar 1, terlihat bahwa cendawan menutupi setengah dari permukaan medium. Pertumbuhan eksplan menjadi terganggu dengan kehadiran cendawan tersebut, sehingga menyebabkan eksplan mati. Dalam hal ini, Mikroba bersaing dengan eksplan untuk mendapatkan nutrisi yang dibutuhkan eksplan untuk tumbuh dan berkembang. Kehadiran mikroba mengakibatkan peningkatan angka kematian pada eksplan, penurunan pertumbuhan dan berkurangnya proliferasi tunas (Oyebanji *et al.*, 2009).

3. Persentase Eksplan *Browning*

Browning merupakan peristiwa terjadinya pecoklatan atau penghitaman pada eksplan setelah tahap inokulasi atau isolasi yang selanjutnya dapat menghambat pertumbuhan eksplan, sehingga terjadi kemunduran fisiologis pada eksplan dan tidak jarang dapat menyebabkan eksplan mati. *Browning* atau pencoklatan terjadi karena adanya oksidasi senyawa fenolik yang dihasilkan jaringan tanaman. Oksidasi senyawa fenolik tersebut dapat bersifat toksik bagi

tanaman sehingga menyebabkan pertumbuhan tanaman menjadi terhambat (Santoso dan Nursandi, 2002). Persentase eksplan *browning* pada Tabel 2.

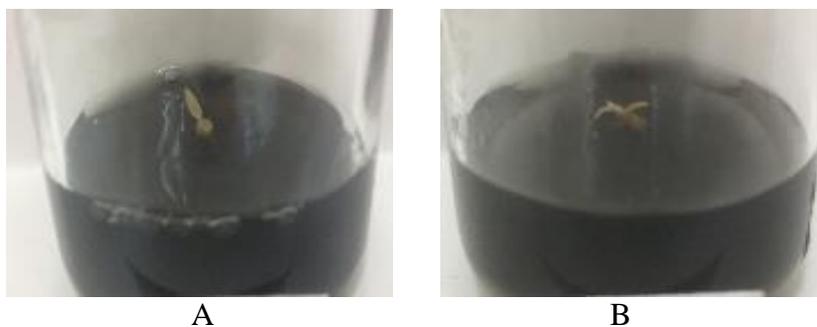
Berdasarkan Tabel 2, dapat diketahui bahwa perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + Ekstrak Tomat 150 ml/L mengalami tingkat *browning* paling tinggi yaitu sebesar 47%. Sementara itu perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L dan NDM + air kelapa 150 ml/L mengalami tingkat *browning* paling rendah yaitu 20%. Pada medium perlakuan yang diuji ditambahkan arang aktif 0,2 g/L. Penambahan arang aktif tersebut seharusnya dapat mengurangi oksidasi senyawa fenol yang dikeluarkan oleh anggrek *Vanda tricolor*. Hal ini dikarenakan arang aktif berfungsi untuk mencegah terjadinya *browning* pada eksplan akibat dari oksidasi senyawa fenol. Menurut Hutami (2006), penggunaan arang aktif dalam kultur *in vitro* dapat menyerap zat penghambat baik dari medium ataupun eksplan.

Dalam penelitian ini persentase eksplan *browning* yang cukup tinggi diduga disebabkan oleh sumber eksplan yang berumur lebih dari 6 bulan di dalam botol kultur, sehingga kandungan fenol yang dimiliki lebih tinggi jika dibandingkan dengan eksplan yang berumur lebih muda (Rineksane dkk, 2017). Menurut Dwiyani (2009) eksplan *Vanda tricolor* var. *Suavis* mengandung senyawa fenolik yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan anggrek *Phalaenopsis amabilis*, sehingga memicu terjadinya pencoklatan pada seluruh perlakuan. Pencoklatan yang terjadi disebabkan senyawa fenol yang teroksidasi menjadi senyawa aktif *quinon* dan senyawa lain (polymerase) bersifat racun dan menyebabkan eksplan *browning* sulit untuk *recovery* kembali sehingga eksplan mengalami kematian (George dan Sherrington, 1984).

4. Persentase Eksplan Vitrifikasi

Vitrifikasi merupakan penyakit fisiologis yang menjadi kendala umum dalam kultur jaringan. Vitrifikasi pada eksplan di tandai dengan adanya perubahan yang terjadi pada eksplan yaitu warna daun dan batang menjadi putih transparan dan rapuh. Persentase eksplan vitrifikasi disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 1, dapat diketahui bahwa persentase eksplan vitrifikasi perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L merupakan persentase vitrifikasi paling tinggi yaitu sebesar 33,3%. Sementara pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L dan NDM + air kelapa 150 ml/L + Ekstrak Tomat 150 ml/L menunjukkan persentase vitrifikasi terendah yaitu 0%.

Tingginya persentase vitrifikasi pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L diduga karena ketidakseimbangan hormon pada medium perlakuan yaitu hanya terdapat sitokinin tunggal. Vitrifikasi yang terjadi dalam kultur jaringan tanaman disebabkan oleh beberapa faktor yaitu jenis eksplan yang digunakan, ketidakseimbangan unsur mikro dan hormon, intensitas cahaya rendah dan kelembaban relatif tinggi. Pengamatan eksplan vitrifikasi disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Eksplan *Vanda tricolor* vitrifikasi A (NDM + TDZ 0,5 ml/L) dan B (NDM + air kelapa 150 ml/L)

Pada Gambar 2 dapat dilihat eksplan yang mengalami vitrifikasi menunjukkan pertumbuhan yang tidak normal, warna daun dan batang menjadi putih transparan, tanaman yang dihasilkan kerdil dan terlihat rapuh. Menurut Santoso dan Nursandi (2002) vitrifikasi terjadi akibat kegagalan atau adanya hambatan dalam proses pembentukan dinding sel (jaringan parenkim) dan hambatan dalam proses pembentukan lignin. Hal ini menyebabkan pertumbuhan tanaman menjadi terhambat.

B. Perkembangan Tunas

Perkembangan tunas pada medium NDM dengan TDZ, Air Kelapa, Ekstrak Pisang dan Ekstrak Tomat diamati Pertambahan Tinggi Tunas, Waktu Muncul Tunas (minggu), Jumlah Tunas dan Persentase Eksplan Bertunas. Hasil perkembangan tunas disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh komposisi medium NDM (TDZ, Air Kelapa, Ekstrak Pisang dan Ekstrak Tomat) terhadap Jumlah Tunas dan Persentase Eksplan Bertunas *Vanda tricolor* pada 8 MST

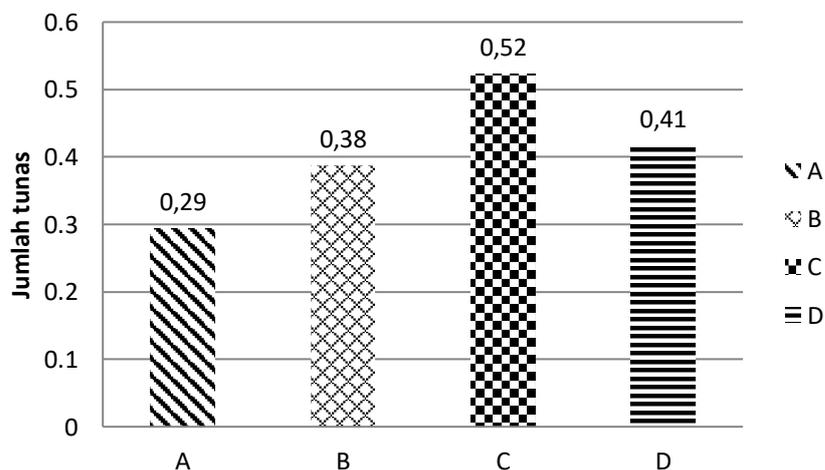
Perlakuan	Jumlah Tunas	Persentase Eksplan Bertunas (%)
NDM + TDZ 0,5 ml/L	0,00b	0,0
NDM + Air Kelapa 150 ml/L	0,00b	0,0
NDM + Air Kelapa 150 ml/L+ Ekstrak Pisang 150 g/L	6,66a	46,6
NDM + Air kelapa 150 ml/L+ Ekstrak Tomat ml/L	1,33ab	20,0

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama, menunjukkan tidak ada pengaruh yang berbeda nyata menurut analisis DMRT pada taraf $\alpha=5\%$.

1. Pertambahan Tinggi Tunas

Pertambahan tinggi tunas menandakan adanya penambahan jumlah atau pemanjangan sel yang dipengaruhi oleh kandungan unsur hara ataupun ZPT didalam medium perlakuan. Pertambahan tinggi tunas diamati untuk melihat bagaimana pengaruh antar perlakuan terhadap tinggi tunas dan sebagai salah satu indikator pertumbuhan. Tinggi tunas diukur dengan menggunakan penggaris dari permukaan medium atau pangkal tunas sampai ujung daun atau titik tumbuh.

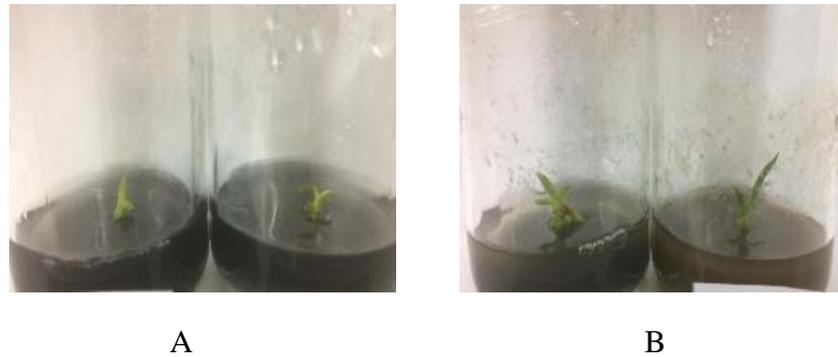
Hasil sidik ragam pertambahan tinggi tunas (lampiran 6a) menunjukkan pengaruh yang tidak berbeda nyata. Sehingga komposisi medium NDM + (TDZ, air kelapa, ekstrak pisang dan ekstrak tomat) tidak memberikan pengaruh terhadap pertambahan tinggi tunas. Rerata Pertambahan Tinggi Tunas 8 MST tersaji pada gambar 3.



Keterangan : A (NDM + TDZ 0,5 ml/L)
 B (NDM + air kelapa 150 ml/L)
 C (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L)
 D (NDM + air kelapa 150 ml/L+ ekstrak tomat 150 ml/L)

Gambar 3. Rerata Pertambahan Tinggi Tunas *Vanda tricolor* 8 MST

Berdasarkan histogram pada Gambar 3, rerata pertambahan tinggi tunas, pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L menunjukkan hasil pertambahan tinggi tunas yang cenderung lebih tinggi (0,52 cm). Hal ini menggambarkan respon positif eksplan terhadap pemberian ZPT yang bersumber dari air kelapa dan ekstrak pisang ke dalam medium kultur berhasil mempercepat pertumbuhan dengan bertambahnya tinggi pada tunas anggrek *Vanda tricolor*. Sementara pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L) menunjukkan hasil yang cenderung lebih rendah (0,29 cm). Hal ini dapat diduga pemberian sitokinin tunggal tanpa diimbangi dengan auksin yang diperlukan untuk pemanjangan sel-sel tunas, sehingga dapat menghambat pemanjangan tunas. Menurut Afriani (2006) pembesaran anggrek *Dendrobium* sp, dengan penambahan ekstrak pisang 50 g/l menghasilkan planlet paling tinggi yaitu 3,2 cm dan jumlah daun terbanyak pada 24 MST. Sementara itu menurut hasil penelitian Widiastoety dan Purbadi (2003) penambahan air kelapa sebanyak 150 ml/L pada medium dapat mendorong pertumbuhan tinggi, panjang dan lebar daun serta jumlah akar planlet *Dendrobium*. Hasil pengamatan pertambahan tinggi eksplan 8 MST dapat dilihat pada Gambar 4.

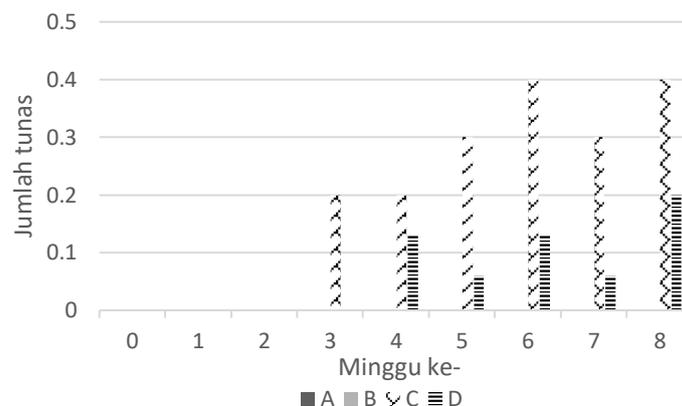


Keterangan : A (NDM + TDZ 0,5 ml/L dan NDM + air kelapa 150 ml/L)
B (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L
dan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L).

Gambar 4. Pertambahan Tinggi Tunas *Vanda tricolor* pada 8 MST

2. Waktu Muncul Tunas

Waktu muncul tunas merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan respon eksplan *Vanda tricolor* terhadap perlakuan yang diberikan dalam kecepatan membentuk tunas. Parameter waktu muncul tunas diamati dengan tujuan yaitu untuk mendapatkan perlakuan yang dapat menghasilkan tunas tercepat. Data waktu muncul tunas disajikan pada Gambar 5.



Keterangan : A (NDM + TDZ 0,5 ml/L)
 B (NDM + air kelapa 150 ml/L)
 C (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L)
 D (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L)

Gambar 5. Rerata waktu muncul tunas *Vanda tricolor*

Berdasarkan Gambar 5, dapat diketahui bahwa perlakuan (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L) menunjukkan waktu muncul tunas tercepat yaitu pada minggu ke-3 dengan rata-rata 0,2. Sementara itu pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L dan NDM + air kelapa 150 ml/L menunjukkan waktu muncul tunas terendah dengan rata-rata 0. Hal ini menunjukkan bahwa tunas tidak ada yang muncul pada perlakuan tersebut sampai pada 8 MST. Pada perlakuan NDM + kelapa 150 ml/L + pisang 150 g/L terkandung hormon sitokinin dan auksin. Menurut George dan Sherrington (1984) interaksi sitokinin dan auksin dapat merangsang eksplan untuk membentuk tunas. Dalam hal ini, diduga proses pembentukan tunas menjadi lebih cepat dengan adanya hormon tumbuh yang lengkap. Jika dalam medium kultur konsentrasi sitokinin lebih tinggi dibandingkan dengan auksin, maka akan memacu pembentukan tunas dan multiplikasi tunas.

3. Pertambahan Jumlah Tunas

Pertambahan jumlah tunas merupakan jumlah tunas baru yang tumbuh pada masing-masing perlakuan. Pengamatan pertambahan jumlah tunas diamati bertujuan untuk mengetahui efektifitas dari tiap komposisi medium yang diberikan terhadap proses pembentukan tunas pada eksplan *Vanda tricolor*. Pengamatan pertambahan jumlah tunas sangat penting untuk diamatai. Hal ini dikarenakan, keberhasilan dalam tahap multiplikasi tunas ditentukan dari pertambahan jumlah tunas yang tumbuh. Tujuan dari multiplikasi yaitu untuk menghasilkan atau menggandakan tunas lebih dari satu pada eksplan.

Hasil sidik ragam Pertambahan Jumlah Tunas (Lampiran 6e) menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata. Komposisi medium NDM + (TDZ, air kelapa, ekstrak pisang dan ekstrak tomat) memberikan pengaruh terhadap pertambahan jumlah tunas. Dari hasil tersebut, kemudian dilakukan uji lanjut α dengan taraf 5% yang disajikan pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3, dapat diketahui bahwa perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L menunjukkan hasil pertambahan jumlah tunas tertinggi (6,66), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L yaitu (1,33), sementara pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L dan NDM + air kelapa 150 ml/L menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L.

Dalam mikropropagasi, penambahan jumlah tunas sangat penting untuk diamati, karena semakin banyak tunas yang terbentuk, maka peluang untuk mendapatkan bibit semakin banyak. Pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L terkandung hormon sitokinin dari air kelapa yang mempunyai kemampuan besar untuk mendorong pembelahan sel dan proses diferensiasi (Gunawan, 1995), serta medium perlakuan terkandung hormon auksin dari ekstrak pisang yang dapat menstimulasi organogenesis dan pertumbuhan tunas dalam mikropropagasi pada tanaman (Dwiyani, 2009).

Sitokinin memacu sitokinesis yang dapat meningkatkan jumlah sel. Sitokinesis merupakan proses pembelahan sel dimana sel-sel menyerap air dalam jumlah yang lebih banyak sehingga plasma sel bertambah dan sel memanjang. Perkembangan jaringan atau sel-sel yang mendapat spesialisasi fungsi menyebabkan spesialisasi alat-alat atau organ sehingga membentuk, akar, tunas dan sebagainya (Kasli, 2009). Penambahan hormon sitokinin pada umumnya didampingi dengan hormon dari kelompok auksin untuk meningkatkan pemanjangan sel. Hasil penelitian Djajanegara 2010, penambahan bubur pisang ambon sebanyak 100 g/L dan air kelapa 100 ml/L berpengaruh nyata terhadap pembentukan tunas dan jumlah daun. Hasil pengamatan penambahan tunas dapat dilihat pada Gambar 6.



Keterangan : A (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L)
 B (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L)

Gambar 6. Jumlah tunas *Vanda tricolor*

4. Persentase Eksplan Bertunas

Persentase eksplan bertunas merupakan jumlah eksplan yang mampu menumbuhkan tunas pada tiap perlakuan dan dinyatakan dalam satuan persen. Tujuan dari parameter eksplan bertunas yaitu untuk mendapatkan komposisi media yang tepat dalam menghasilkan tunas *Vanda tricolor* pada tiap perlakuan. Semakin tinggi persentase eksplan bertunas maka semakin tinggi pula eksplan yang mampu melakukan regenerasi. Hasil Persentase Eksplan Bertunas disajikan pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3, perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L menunjukkan hasil persentase eksplan bertunas tertinggi yaitu 46,6%. Sementara hasil terendah ditunjukkan pada perlakuan A NDM + TDZ 0,5 ml/L dan NDM + air kelapa 150 ml/L yaitu 0%. Hal ini menunjukkan pada persentase eksplan bertunas dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang diberikan pada medium perlakuan. Pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L terkandung hormon sitokinin dari air kelapa yang mempunyai

kemampuan untuk mendorong pembelahan sel dan proses diferensiasi (Gunawan, 1995), serta medium perlakuan terkandung hormon auksin dari ekstrak pisang yang dapat menstimulasi organogenesis dan pertumbuhan tunas dalam mikropropagasi pada tanaman (Dwiyani, 2009). Hasil penelitian Inkiriwang, dkk (2016), perlakuan MS 50% + air kelapa 30% dan pupuk majemuk 1,5 g/L menghasilkan rata-rata eksplan bertunas tertinggi yaitu 6,78% pada pertumbuhan anggrek *Dendrobium*.

C. Perkembangan Daun

Perkembangan daun pada medium NDM dengan TDZ, Air Kelapa, Ekstrak Pisang dan Ekstrak Tomat diamati pertambahan Jumlah Daun dan Warna Daun. Hasil uji lanjut pertambahan jumlah daun disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh komposisi medium NDM (TDZ, air kelapa, ekstrak pisang dan ekstrak tomat) terhadap pertumbuhan jumlah daun dan warna daun *Vanda tricolor* 8 MST.

Perlakuan	Pertambahan Jumlah Daun	Warna Daun
NDM + TDZ 0,5 ml/L	0,40b	3,13a
NDM + Air Kelapa 150 ml/L	0,53b	3,26a
NDM + Air Kelapa 150 ml/L+ Ekstrak Pisang 150 g/L	3,26a	3,66a
NDM + Air kelapa 150 ml/L+ Ekstrak Tomat ml/L	1,33b	3,60a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama, menunjukkan tidak ada pengaruh yang berbeda nyata menurut analisis DMRT pada taraf $\alpha=5\%$.

Skor warna : 1 = 7,5 Yellow Red 

2. 2,5 Yellow 

3. 5 Yellow 

4. 2,5 Green Yellow 

5. 5 Green Yellow 

1. Pertambahan Jumlah Daun

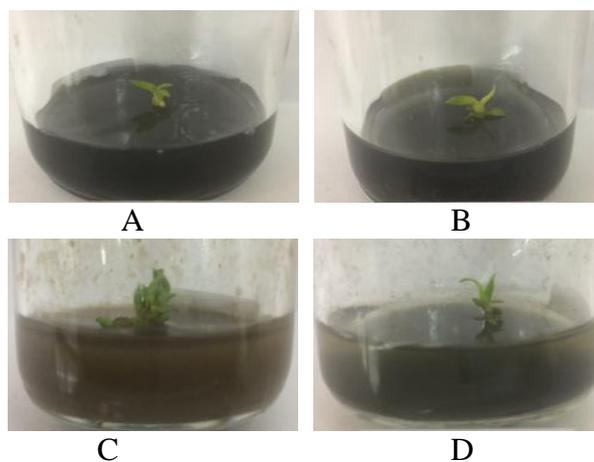
Pertambahan jumlah daun merupakan jumlah daun yang tumbuh pada eksplan pada setiap perlakuan. Parameter ini dapat digunakan sebagai indikator pertumbuhan vegetatif tanaman. Pertambahan jumlah daun sangat berpengaruh pada pertumbuhan planlet. Hal ini dikarenakan daun merupakan tempat untuk menghasilkan fotosintat yang diperlukan dalam pertumbuhan dan perkembangan planlet. Hasil analisis pertambahan jumlah daun 8 MST pada Tabel 4.

Hasil analisis sidik ragam Pertambahan Jumlah Daun 8 MST (Lampiran 6d) menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata. Sehingga penggunaan perbedaan komposisi medium NDM + (TDZ, air kelapa, ekstrak pisang dan ekstrak tomat) berpengaruh terhadap pertambahan jumlah daun pada eksplan anggrek *Vanda tricolor*. Hasil tersebut, kemudian diuji lanjut α taraf 5%.

Berdasarkan Tabel 4, dapat diketahui bahwa Pertambahan jumlah daun eksplan *Vanda tricolor* terbanyak ditunjukkan oleh perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L dan ekstrak pisang 150 g/L yaitu sebanyak 3,26 helai. Diduga pada medium tersebut tersedia unsur K, Mg dan Fe yang terdapat di dalam ekstrak pisang dan air kelapa. Unsur K dan Fe berfungsi dalam metabolisme untuk menghasilkan ATP. Unsur Mg sangat diperlukan untuk proses fotosintesis karena Mg merupakan komponen molekul klorofil yang dibutuhkan dalam pembentukan klorofil. Unsur Fe berperan dalam transfer elektron, hal ini memungkinkan jumlah daun mencapai optimal (Djajanegara, 2010).

Pertambahan jumlah daun eksplan *Vanda tricolor* terendah ditunjukkan pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L yaitu sebanyak 0,40 helai. Hal ini diduga

pemberian sitokinin tunggal belum mampu mendorong pertumbuhan daun pada eksplan *Vanda tricolor*. Menurut hasil penelitian Djajanegara 2010, penambahan bubur pisang ambon sebanyak 100 g/L dan air kelapa 100 ml/L berpengaruh nyata terhadap pembentukan tunas dan jumlah daun. Hasil pengamatan jumlah daun dapat dilihat pada Gambar 7.



Keterangan : A (NDM + TDZ 0,5 ml/L)
 B (NDM + air kelapa 150 ml/L)
 C (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L)
 D (NDM + air kelapa + ekstrak tomat 150 ml/L)

Gambar 7. Pertambahan jumlah daun *Vanda tricolor* pada 8 MST.

2. Warna Daun

Pengamatan warna daun dilakukan untuk melihat apakah terdapat perubahan atau perbedaan warna pada daun sebagai respon eksplan terhadap medium perlakuan yang diujikan. Tujuan dari pengamatan parameter warna daun yaitu untuk mengetahui bagaimana pengaruh komposisi medium terhadap warna daun eksplan *Vanda tricolor*. Pengamatan warna daun dilakukan dengan cara mencocokkan warna daun pada *Munssel Plant Tissue colour chart*.

Hasil sidik ragam warna daun (lampiran 6d) menunjukkan pengaruh yang tidak berbeda nyata, sehingga komposisi medium NDM + (TDZ, air kelapa, ekstrak pisang dan ekstrak tomat tidak memberikan pengaruh terhadap warna daun *Vanda tricolor*. Pada medium perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L hasil rerata warna daun cenderung lebih tinggi yaitu 3,66. Sementara itu pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L hasil rerata warna daun cenderung lebih rendah yaitu 3,13.

Berdasarkan hasil skoring Tabel 4, pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L menunjukkan skor warna daun yang cenderung lebih tinggi dengan rerata tingkat skoring 5 *Green Yellow*. Kandungan karbohidrat yang tinggi pada pisang menyebabkan warna daun menjadi lebih hijau dan hormon sitokinin pada air kelapa mempengaruhi warna hijau daun. Menurut Dwijoseputro (1994) terbentuknya klorofil dipengaruhi oleh karbohidrat terutama dalam bentuk gula. Selain itu pengaruh sitokinin yang kuat dalam medium dapat memacu pembentukan kloroplas dan klorofil menjadi lebih stabil.

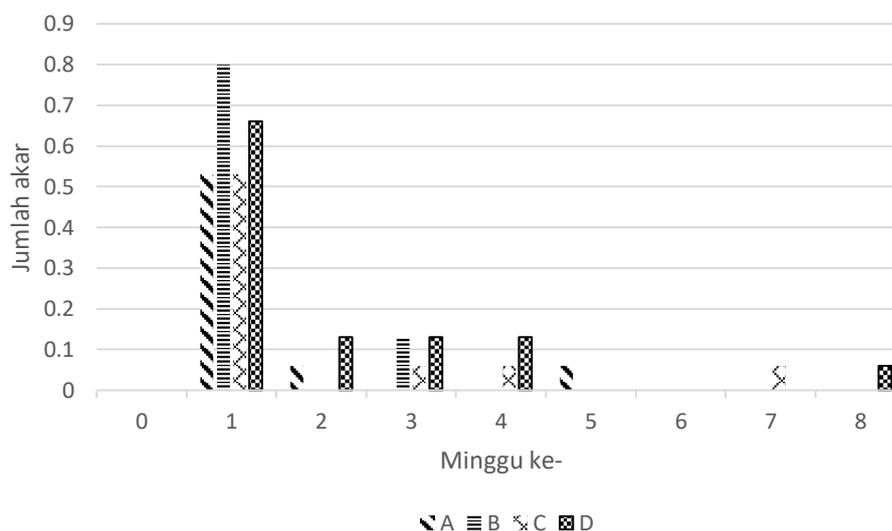
D. Perkembangan Akar

Perkembangan akar pada medium NDM dengan TDZ, Air Kelapa, Ekstrak Pisang dan Ekstak Tomat diamati Jumlah Akar dan Waktu Muncul Akar.

1. Waktu Muncul Akar

Waktu muncul akar merupakan waktu yang ditempuh eksplan untuk berakar yang dinyatakan dalam satuan minggu. Waktu muncul akar merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan respon eksplan *Vanda tricolor* terhadap perlakuan yang diberikan dalam menghasilkan akar. Tujuan dari

parameter waktu muncul akar yaitu untuk mendapatkan perlakuan yang dapat menghasilkan akar tercepat. Rerata waktu muncul akar disajikan pada gambar 8.



Keterangan : A (NDM + TDZ 0,5 ml/L)
 B (NDM + air kelapa 150 ml/L)
 C (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L)
 D (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L)

Gambar 8. Rerata waktu muncul akar *Vanda tricolor*

Berdasarkan rerata waktu muncul akar pada Gambar 8, dapat diketahui bahwa semua perlakuan menunjukkan waktu muncul akar yang sama yaitu pada minggu ke-1. Namun pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L menunjukkan rerata tertinggi yaitu 0,8. Dalam hal ini diduga kandungan sitokinin dan auksin pada air kelapa dapat merangsang pertumbuhan akar pada tunas *Vanda tricolor*. Jumlah sitokinin dalam air kelapa lebih tinggi dari pada jumlah auksin, namun kandungan auksin dalam air kelapa tersebut dapat merangsang pembesaran dan pemanjangan sel dan merangsang pembentukan akar. Menurut penelitian Tuhuteru, dkk. (2012) konsentrasi air kelapa 50 ml/L dapat menghasilkan akar

dengan rentang waktu tercepat pada pertumbuhan dan perkembangan anggrek *Dendrobium anosum*.

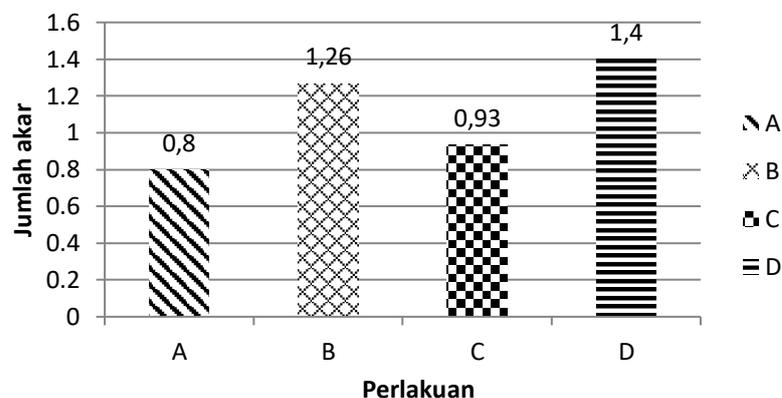
Pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L dan perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L menunjukkan rerata terendah yaitu 0.53. Hal ini diduga pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L, interaksi bahan aktif dalam komposisi medium tersebut lebih mengarah pada pembentukan tunas, hal ini ditunjukkan pada perlakuan tersebut menunjukkan waktu muncul tunas tercepat, pertambahan jumlah tunas dan persentase eksplan bertunas tertinggi dari semua medium perlakuan. Sementara itu pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L hanya terkandung 1 jenis hormon yaitu sitokinin tunggal dan tidak terdapat auksin yang berfungsi untuk merangsang pembentukan akar. Kandungan auksin endogen pada eksplan *Vanda tricolor* diduga belum mencukupi kebutuhan untuk memacu pertumbuhan akar, sehingga diperlukan auksin tambahan atau auksin eksogen pada medium perlakuan.

2. Pertambahan Jumlah Akar

Jumlah akar merupakan faktor yang penting untuk diamatai dalam mengetahui kemampuan eksplan untuk menyerap nutrisi pada medium kultur. Semakin banyak jumlah akar maka semakin optimal penyerapan nutrisi pada medium. Perhitungan jumlah akar dilakukan pada keseluruhan eksplan pada setiap perlakuan yang sudah terlihat adanya pertumbuhan akar.

Hasil sidik ragam Pertambahan Jumlah Akar (lampiran 6c) menunjukkan pengaruh yang tidak berbeda nyata. Sehingga perbedaan komposisi medium NDM + (TDZ, air kelapa, ekstrak pisang dan ekstrak tomat) tidak memberikan pengaruh

terhadap pertambahan jumlah akar pada eksplan *Vanda tricolor*. Pertambahan jumlah akar disajikan pada Gambar 9.



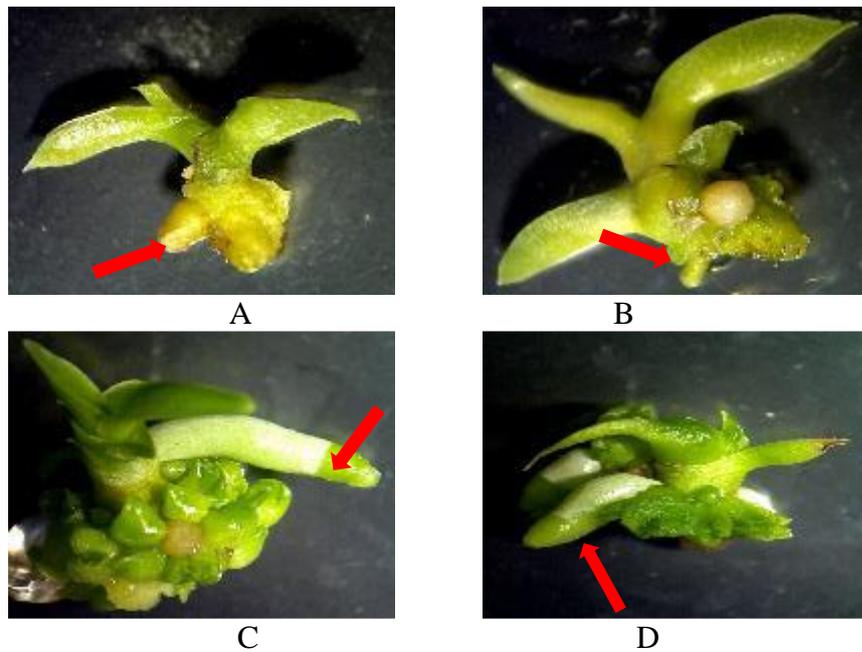
Keterangan : A (NDM + TDZ 0,5 ml/L)
 B (NDM + air kelapa 150 ml/L)
 C (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L)
 D (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L)

Gambar 9. Rerata pertambahan jumlah akar *Vanda tricolor* pada 8 MST.

Berdasarkan histogram pada Gambar 9, dapat diketahui bahwa perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L memberikan hasil pertambahan jumlah akar yang cenderung lebih tinggi (1,40). Dalam hal ini diduga kandungan auksin didalam air kelapa dan ekstrak tomat mampu untuk memacu pertumbuhan akar terbanyak sehingga menghasilkan pertambahan jumlah akar yang cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Menurut Wattimena (1988) zat pengatur tumbuh golongan auksin dapat mengontrol morfogenesis dalam pembentukan dan akar. Pertambahan jumlah akar pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L pada Gambar 8 menunjukkan pertambahan akar muncul selama 5 minggu dari 8

minggu pengamatan, sehingga jumlah akar yang dihasilkan lebih banyak perlakuan lainnya.

Pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L menunjukkan hasil pertambahan akar yang cenderung lebih rendah (0,8). Hal ini diduga pada medium NDM + TDZ 0,5 ml/L hanya terkandung 1 jenis hormon yaitu sitokinin tunggal dan tidak terdapat hormone auksin yang berfungsi untuk merangsang pembentukan akar, sehingga jumlah akar yang dihasilkan menjadi cenderung lebih rendah. Hasil pengamatan jumlah akar dapat dilihat pada Gambar 10.



Keterangan : A (NDM + TDZ 0,5 ml/L)
 B (NDM + air kelapa 150 ml/L)
 C (NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L)
 D (NDM + air kelapa 150 ml/L+ ekstrak tomat 150 ml/L)

Gambar 10. Pertambahan jumlah akar *Vanda tricolor*

3. Persentase Eksplan Berakar

Persentase eksplan berakar merupakan jumlah eksplan yang mampu menumbuhkan akar pada tiap perlakuan yang diuji dan dinyatakan dalam satuan persen. Tujuan dari pengamatan parameter eksplan berakar ialah untuk melihat bagaimana penyerapan unsur hara pada eksplan anggrek *Vanda tricolor*, karena semakin tinggi persentase eksplan berakar maka penyerapan unsur hara akan semakin efektif. Persentase Eksplan Berakar disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh komposisi medium NDM (TDZ, Air Kelapa, Ekstrak Pisang dan Ekstrak Tomat) terhadap persentase eksplan berakar pada *Vanda tricolor* 8 MST.

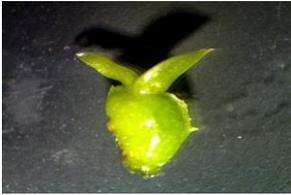
Perlakuan	Persentase Eksplan Berakar (%)
NDM + TDZ 0,5 ml/L	53,3
NDM + Air Kelapa 150 ml/L	80,0
NDM + Air Kelapa 150 ml/L+ Ekstrak Pisang 150 g/L	60,0
NDM + Air kelapa 150 ml/L+ Ekstrak Tomat ml/L	80,0

Berdasarkan Tabel 5, dapat diketahui bahwa pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L dan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L menunjukkan hasil persentase eksplan berakar tertinggi yaitu 80%. Hal ini diduga Kandungan auksin dalam air kelapa ekstrak tomat dapat mencukupi kebutuhan dalam memacu pertumbuhan akar *Vanda tricolor*. Menurut Wattimena (1988) zat pengatur tumbuh tersebut dapat mengontrol morfogenesis dalam pembentukan akar. Sementara hasil persentase eksplan terendah ditunjukkan pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L yaitu 53,3%. Hal ini dikarenakan pada perlakuan tersebut

hanya terdapat sitokinin tunggal. Menurut Pranata dkk. (2015) Sitokinin mempunyai peranan untuk memacu pertumbuhan tunas dan menghambat pertumbuhan akar.

E. Perkembangan Eksplan

Perkembangan eksplan merupakan perubahan-perubahan yang terjadi pada eksplan yang dipengaruhi oleh medium tumbuh yang diberikan. Perkembangan eksplan penting untuk diamati untuk melihat apakah eksplan dapat tumbuh dan berkembang serta beradaptasi dalam medium perlakuan yang diujikan. Tunas anggrek *Vanda tricolor* yang diinokulasi pada medium perlakuan diamati di bawah mikroskop untuk melihat perkembangan multiplikasi tunas. Pengamatan di bawah mikroskop dilakukan pada minggu ke-4 dan minggu ke-8 setelah tanam. Perkembangan eksplan disajikan pada Gambar 11.

Eksplan pada 0 MST	 0,8 mm	
Perlakuan	Hasil Pengamatan Mikroskop Minggu ke-4	Hasil Pengamatan Mikroskop minggu ke-8
A	 0,8	 0,8
B	 0,8	 0,8
C	 0,7	 0,7
D	 0,7	 0,7

Gambar 11. Perkembangan tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada medium (A) NDM + TDZ 0,5 ml/L, (B) NDM + Air Kelapa 150 ml/L, (C) NDM + Air Kelapa 150 ml/L + Ekstrak Pisang 150 g/L dan (D) NDM + Air Kelapa 150 ml/L + Ekstrak Tomat 150 ml/L minggu ke-4 dan 8.

Berdasarkan Gambar 11, dapat diketahui bahwa pemberian perlakuan yang berbeda pada medium multiplikasi anggrek *Vanda tricolor* dapat memberikan respon visual yang berbeda. Eksplan mengalami pertumbuhan dan perkembangan selama masa inkubasi 8 minggu. Pada perlakuan NDM + TDZ 0,5 ml/L 4 MST, perkembangan eksplan ditandai dengan penambahan tinggi tunas, penambahan jumlah daun, muncul bulatan dan akar. Sementara itu pada 8 MST, eksplan mengering, warna daun berubah menjadi coklat, sehingga menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan menjadi terhenti.

Pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L 4 MST, perkembangan pada eksplan ditandai dengan penambahan tinggi tunas dan penambahan jumlah daun. Pada 8 MST, perkembangan eksplan ditandai dengan penambahan tinggi tanaman dan kemunculan akar. Pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak pisang 150 g/L 4 MST, perkembangan eksplan ditandai dengan penambahan tinggi tunas, penambahan jumlah daun dan calon-calon tunas serta bulatan-bulatan. Pada 8 MST, perkembangan eksplan ditandai dengan penambahan tinggi tunas, calon-calon tunas berkembang menjadi tunas dan kemunculan akar. Pada perlakuan NDM + air kelapa 150 ml/L + ekstrak tomat 150 ml/L 4 MST, perkembangan eksplan ditandai dengan penambahan tinggi tunas, penambahan jumlah daun, kemunculan akar dan kalus. Pada 8 MST, perkembangan eksplan ditandai dengan penambahan tinggi tunas dan kalus berkembang menjadi tunas.