

# **PENGARUH JENIS MEDIUM DAN KONSENTRASI BAP TERHADAP PERTUMBUHAN TUNAS ANGGREK *Vanda tricolor***

Nixi Tri Saputra<sup>1)</sup> Dr. Innaka Ageng Rineksane, M.P.<sup>2)</sup> dan Dr. Ir. Gatot  
Supangkat, M.P.,<sup>3)</sup>

Mahasiswa Progam Studi Agroteknologi Pertanian Universitas Muhammadiyah,  
Yogyakarta, Dosen Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas  
Muhammadiyah

## **INTISARI**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan jenis medium dan konsentrasi BAP terbaik untuk pertumbuhan tunas Anggrek *Vanda tricolor*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dari bulan Agustus sampai dengan Oktober 2018. Metode penelitian menggunakan metode percobaan laboratorium yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan perlakuan yang diujikan adalah kombinasi dari medium NDM (*New Doghasima Medium*), VW (*Vacin and Went*), MS (*Murashige and Skoog*) dan konsentrasi BAP (*Benzylaminopurine*) yaitu 0, 0.5, dan 1 mg/l. Setiap perlakuan diulang 10 kali, sehingga diperoleh 90 unit perlakuan. Tiap perlakuan ditambahkan NAA (*Napthalane Acetic Acid*) 0,5 mg/l dan arang aktif 0,2g/l serta PPM (*plant perservative mixture*) 0,5 ml/l. Parameter pengamatan pada penelitian ini antara lain, persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning*, persentase eksplan terkontaminasi, waktu eksplan *browning*, waktu eksplan terkontaminasi, jumlah tunas tiap perlakuan, dan tinggi tunas eksplan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis medium MS (*Murashige and Skoog*) dan konsentrasi BAP (*Benzylaminopurine*) 0,5 mg/l merupakan kombinasi terbaik pada pertumbuhan tunas Anggrek *Vanda tricolor* ditunjukkan pada parameter Jumlah Daun dan Tinggi Tunas.

Kata kunci : Jenis Media, Kultur *In vitro*, Tunas, BAP, Anggrek *Vanda tricolor*

## **ABSTRACT**

*This research to obtain the best type of medium and BAP concentration for the growth of Vanda tricolor orchid buds. The research was conducted at the In vitro Culture Laboratory of the Faculty of Agriculture, Yogyakarta Muhammadiyah University from August to October 2018. The research method used laboratory experimental methods arranged in a single Randomized Complete Design (CRD) with the treatment being tested was a combination of NDM (New Doghasima Medium), VW (Vacin and Went), MS (Murashighe and Skoog) and BAP (Benzylaminopurine) concentrations are 0, 0.5, and 1 mg / l. Each treatment was repeated 10 times, so that 90 treatment units were obtained. Each treatment was added 0.5 mg / l NAA (Naphthalane Acetic Acid) and 0.2g / l active charcoal and 0.5 ml / PPM (plant perservative mixture). Observation parameters in this research include, the percentage of live explants, the percentage of browning explants, the percentage of explants being contaminated, the browning explant time, the explant time contaminated, the number of shoots per treatment, and the height of explant shoots. The results showed that the type of MS medium (Murashige and Skoog) and BAP (Benzylaminopurine) concentration of 0.5 mg / l was the best combination on the growth of Vanda tricolor orchid buds shown in the number of leaves and shoot height parameters.*

*Keywords: Kind of Medium, Benzylaminopurine, In vitro Culture, Buds, Orchid Vanda tricolor.*

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Anggrek *Vanda tricolor* merupakan anggrek endemik kawasan lereng Gunung Merapi. Anggrek berbunga putih dengan bercak totol ungu kemerahan ini hidup secara epifit dan banyak dijumpai menempel pada batang pohon yang ada di hutan Gunung Merapi. Akan tetapi, semburan awan panas, kebakaran hutan di lereng gunung tersebut dan erupsi telah menghancurkan 80 % habitat dan mengancam keberadaan anggrek ini. Selain itu, eksploitasi *Vanda tricolor* keluar dari habitat aslinya oleh masyarakat untuk koleksi atau menjualnya ke luar daerah telah mengurangi populasi anggrek tersebut (Metusala, 2006). Upaya konservasi *Vanda tricolor* telah dilakukan oleh Badan Koordinasi Sumber Daya Alam dengan memberikan tanaman anggrek ini kepada kelompok tani di sekitar kawasan Gunung Merapi. Akan tetapi, pemeliharaan dan metode perbanyakan konvensional yang dilakukan oleh kelompok tani belum dapat meningkatkan jumlah populasi anggrek tersebut bahkan sebaliknya persentase kematian tanaman masih cukup tinggi. Sebagai contoh, sebanyak 80 tanaman anggrek yang diberikan, tersisa 36 tanaman setelah 1 tahun (Metusala, 2006). Oleh karena itu perlu diupayakan perbaikan teknologi untuk memperbanyak dan meregenerasikan kembali anggrek *Vanda tricolor*.

Kultur *in vitro* merupakan teknik mengisolasi bagian tanaman, menumbuhkannya dalam medium buatan yang mengandung nutrisi lengkap di lingkungan steril sehingga bagian tanaman tersebut tumbuh menjadi tanaman sempurna (Pierik, 1987; George, 1993). Medium tumbuh yang digunakan dalam kultur jaringan dapat berupa medium cair, padat dan semi padat (Wattimena, 1991). Menurut Gamborg dan Shyluk (1981), medium dasar yang banyak digunakan adalah *Murashige and Skoog* (MS), Medium *Murashige* dan *Skoog* (MS) sering digunakan karena cukup memenuhi unsur hara makro, mikro dan vitamin untuk pertumbuhan tanaman. Komposisi medium *Vacin and Went* (VW) merupakan komposisi medium yang paling umum digunakan dalam perbanyakan anggrek secara *in vitro*. Medium NDM mengandung beberapa vitamin dan bahan organik yang mendorong pembentukan PLB pada eksplan anggrek. Penelitian mengenai NDM sebagai medium untuk kultur *in vitro* telah dilakukan oleh *Tokuhara dan Mii* (1993). Dari hasil penelitian, dihasilkan lebih dari 10.000 PLB anggrek *Phalaeonopsis* dan *Doritaenopsis* selama 1 tahun dengan mengkulturkan eksplan potongan pucuk. Metode ini dapat diadopsi untuk meregenerasikan anggrek *Vanda tricolor*.

BAP (6 *Benzylaminopurine*) merupakan salah satu sitokinin yang berfungsi memacu pembesaran sel kotiledon dan daun tumbuhan dikotil. Kotiledon akan menjadi organ fotosintetis yang bagus. Bersama dengan auksin, sitokinin berfungsi dalam pertumbuhan sel meristem dan mempengaruhi perkembangan kuncup, batang, dan daun (Parnata, 2004).

## II. TATA CARA PENELITIAN

### A. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Agustus sampai Oktober 2018.

### B. Alat dan Bahan

#### 1. Alat :

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain timbangan analitik, *Hot Plate Magnetic Stirrer*, botol kultur, pH stik, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer, jarum suntik, pinset, *Laminar Air Flow* (LAF), aluminium foil, *dissecting kits*, autoklaf, dan bunsen.

#### 2. Bahan :

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah eksplan steril tunas Anggrek *Vanda tricolor* umur 8 bulan, medium VW (*Vacint and Went*), NDM (*New Doghasima Medium*), MS (*Murashige and Skoog*), BAP, NAA 0,5 mg/l.

### C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan laboratorium yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan perlakuan yang diujikan adalah kombinasi dari medium NDM, VW, MS dan konsentrasi BAP yaitu 0 mg/l, 0,5 mg/l, dan 1 mg/l. Setiap perlakuan diulang 10 kali, sehingga diperoleh 90 unit perlakuan. Tiap perlakuan ditambahkan NAA 0,5 mg/l dan arang aktif 0,2g/l serta PPM (*plant preservative mixture*) 0,5 ml/l.

Kombinasi perlakuan yang diuji yaitu :

M1 = Medium NDM + BAP 0 mg/l

M2 = Medium NDM + BAP 0,5 mg/l

M3 = Medium NDM + BAP 1 mg/l

M4 = Medium VW + BAP 0 mg/l

M5 = Medium VW + BAP 0,5 mg/l

M6 = Medium VW + BAP 1 mg/l

M7 = Medium MS + BAP 0 mg/l

M8 = Medium MS + BAP 0,5 mg/l

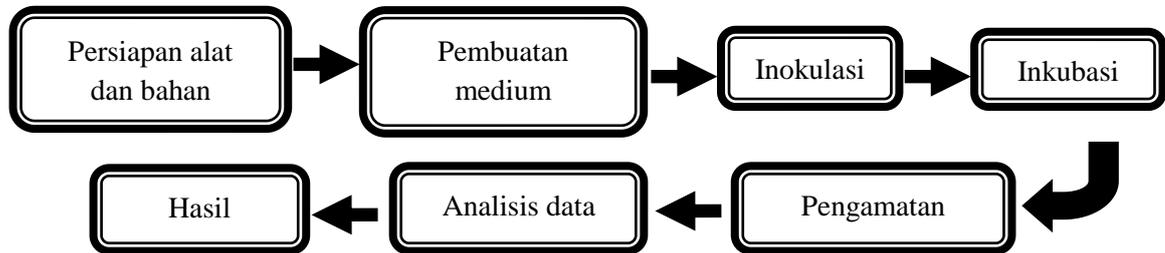
M9 = Medium MS + BAP 1 mg/l

Semua perlakuan ditambah NAA 0,5 mg/l

### D. Cara Penelitian

Tata laksana dalam penelitian ini mencakup beberapa tahap. Tahapan awal yang dilakukan adalah persiapan alat dan bahan untuk inokulasi eksplan. Tahap selanjutnya adalah pembuatan medium yang akan digunakan eksplan sebagai tempat tumbuh. Inokulasi eksplan dilakukan setelah medium dibuat. Eksplan diletakkan di tempat yang sesuai lingkungan tumbuh eksplan dan tahap ini adalah

inkubasi. Pengamatan dilakukan selama inkubasi dan dilakukan pencatatan periodik agar mendapatkan data. Data dianalisa untuk diolah agar didapatkan hasil penelitian yang telah dilakukan



### 1. Persiapan alat dan bahan dan sterilisasi

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian disiapkan. Harus dipastikan bahwa semua alat dan bahan yang diperlukan telah tersedia, agar penelitian berjalan dengan lancar. Eksplan disiapkan dari PLB steril umur 8 bulan. Sterilisasi alat dilakukan dengan dua metode yaitu metode sterilisasi basah dan bakar. Sterilisasi basah dilakukan untuk botol kultur, gelas piala, petridish, erlemeyer, pinset, dan pipet. Alat-alat tersebut dibungkus dengan kertas payung kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Sterilisasi bakar dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) sebelum proses penanaman dengan memasukkan alat (skalpel, gunting, pinset) ke dalam alkohol 70% kemudian dibakar di atas lampu Bunsen.

### 2. Pembuatan medium

Medium yang digunakan sebagai tempat tumbuh eksplan PLB Anggrek pada kultur *in vitro* ini yaitu medium VW, NDM dan MS sebanyak 1800 ml dengan masing masing medium dibuat sebanyak 600 ml yang terbagi menjadi 9 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing masing perlakuan digunakan 10 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml medium.

Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk 200 ml ; medium NDM 0,392 g ; medium VW 0,334 g ; medium MS 0,866 g ; Phytigel 0,5 g ; sukrosa 6 g ; PPM 0,1 ml ; Arang aktif 0,2 g/l dan Zat Pengatur Tumbuh dengan konsentrasi BAP 0 mg/l yaitu 0 ml ; BAP 0,5 mg/l yaitu 1 ml ; dan BAP 1 mg/l yaitu 2 ml.

Larutan stok terlebih dahulu dibuat untuk mempermudah dalam pembuatan medium. Pembuatan larutan stok bertujuan agar tidak perlu dilakukan penimbangan kembali setiap membuat medium dan menghindari kesalahan penimbangan jika bahan yang ditimbang sedikit. Pembuatan stok ZPT dengan cara menimbang ZPT sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 ml aquades steril dan ZPT dilarutkan, BAP dilarutkan dengan HCL dan NAA dilarutkan dengan KOH serta diberi pelabelan pada botol stok 1 mg ZPT sama dengan 10 ml.

### 3. Penanaman eksplan

#### a. Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan berasal PLB steril tanaman anggrek *Vanda Tricolor* umur 8 bulan. Eksplan yang akan digunakan terlebih dulu diseleksi guna memilih eksplan yang sehat dan terhindar dari bakteri dan jamur.

b. Sterilisasi Eksplan

Eksplan anggrek direndam dalam betadine sebanyak tiga tetes selama tiga menit. Setelah itu, eksplan dibilas dengan aquadest steril sebanyak tiga kali sampai bersih. Pencelupan ke bakterisida dan fungisida diperlukan agar eksplan tidak terkontaminasi bakteri dan jamur pada saat proses kultur *in vitro* berlangsung.

c. Sterilisasi *Laminar Air Flow* (LAF)

*Laminar Air Flow* disterilkan dengan disemprot alkohol 70% dan diterangi lampu UV selama satu jam sebelum digunakan. Menyalakan blower lima menit sebelum pelaksanaan penanaman dan memasukkan alat-alat penanaman seperti pinset, skalpel, gelas ukur, gunting, dan botol kultur berisi medium tanam steril, lampu spiritus, petridis ke dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

d. Inokulasi Eksplan

Multiplikasi dilakukan dengan cara memindahkan eksplan menggunakan pinset dari medium lama ke medium perlakuan secara aseptik di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

4. Inkubasi

Proses inkubasi dimulai dengan mensterilkan rak-rak inkubasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dilap dengan kain bersih. Suhu ruang inkubasi kultur antara 24-27 °C dan kelembaban berkisar 70% serta intensitas cahaya 1000 lux selama 24 jam setiap harinya. Botol-botol diletakkan secara acak kemudian diamati pertumbuhannya sesuai dengan parameter pengamatan yang telah ditentukan.

### E. Parameter Yang Diamati

Variabel yang diamati pada penelitian ini antara lain, persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning*, persentase eksplan terkontaminasi, waktu eksplan *browning*, waktu eksplan terkontaminasi, jumlah tunas tiap perlakuan, dan tinggi tunas eksplan.

1. Persentase eksplan hidup (%)

Eksplan yang hidup (eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan (*browning*) lebih dari separuh eksplan) diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Persentase eksplan hidup dihitung diakhir pengamatan dengan rumus :

Rumus :

$$\text{Persentase eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100$$

2. Presentase eksplan *browning* (%)

Eksplan yang mengalami pencoklatan/*browning* diamati seminggu sekali selama 8 minggu, kriteria eksplan *browning* apabila pencoklatan pada eksplan lebih dari separuh eksplan. Persentase eksplan *browning* dapat dihitung dengan

Rumus :

$$\text{Persentase eksplan } \textit{browning} = \frac{\text{Jumlah eksplan } \textit{browning}}{\text{Jumlah eksplan tiap } \textit{browning}} \times 100 \%$$

3. Persentase eksplan terkontaminasi (%)  
Eksplan yang terkontaminasi diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Eksplan dikatakan terkontaminasi apabila ada jamur atau bakteri pada eksplan atau medium kultur tersebut. Persentase eksplan terkontaminasi

Rumus :

$$\text{Persentase eksplan terkontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

4. Waktu muncul tunas  
Waktu muncul tunas merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan kecepatan tumbuh eksplan. Waktu muncul tunas diamati setiap minggu. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama (awal penanaman) hingga muncul tunas pertama

5. Jumlah tunas tiap perlakuan

Jumlah tunas merupakan faktor terpenting dalam multiplikasi tanaman pada kultur *in vitro*. Perhitungan jumlah tunas dilakukan pada keseluruhan tunas yang muncul pada eksplan baik itu tunas yang berasal dari pemanjangan mata tunas maupun tunas adventif (bukan berasal dari mata tunas). Jumlah tunas yang terbentuk diamati pada masing-masing botol, pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 8 minggu.

6. Persentase eksplan bertunas

Pengamatan dilakukan dengan melihat tunas yang terbentuk pada setiap perlakuan. Dilakukan setiap minggu sekali selama 8 minggu dan dinyatakan dalam persen (%).

Rumus:

$$\text{Persentase eksplan bertunas} = \frac{\text{Jumlah eksplan bertunas}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

7. Tinggi tunas  
Tinggi tunas diukur mulai pangkal sampai pucuk tiap minggu sekali selama 8 minggu dengan satuan milimeter (mm). Tunas yang diukur adalah tunas yang paling tinggi.

8. Jumlah daun  
Pengamatan dilakukan pada tiap botol dengan menghitung banyaknya daun yang terbentuk. Pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 8 minggu, kriteria daun yang dihitung adalah daun yang sudah membuka.

## F. Analisis Data

Hasil pengamatan kuantitatif dianalisis menggunakan sidik ragam atau *Analysis of Variance* (Anova), jika ada beda nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan, *Duncan's Range Test* (DMRT).

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman anggrek merupakan tanaman yang bijinya tidak memiliki endosperm atau cadangan makanan, sehingga jika biji yang berbentuk serbuk ini jatuh pada tempat yang tidak memadai maka keberhasilan tumbuhnya akan rendah. Persemaian dengan kultur *in vitro* merupakan salah satu solusi untuk menumbuhkan biji anggrek agar keberhasilannya tinggi. Tunas yang digunakan pada penelitian ini berasal dari biji anggrek *Vanda tricolor* yang disemai secara *in vitro* selama 8 bulan. Pengamatan dilakukan setiap minggu sampai dengan minggu ke 8. Tunas anggrek *Vanda tricolor* memberikan respon terhadap perlakuan yang diberikan dengan adanya perkembangan eksplan dari mulai pembengkakan sampai dengan tumbuhnya tunas, akar dan daun. Laju pertumbuhan dan perkembangan tunas anggrek *Vanda tricolor* selama 8 minggu inkubasi diamati dengan parameter persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning*, persentase kontaminasi, waktu muncul tunas, persentase eksplan bertunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan jumlah daun.

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

Pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* sangat dipengaruhi oleh eksplan dan medium kultur yang digunakan. Eksplan yang mengalami *browning* maupun kontaminasi akan menurunkan tingkat keberhasilan dari kultur *in vitro*. Dengan demikian, kesesuaian antara eksplan dan medium yang digunakan akan menjadi faktor utama untuk menentukan keberhasilan dari teknik kultur *in vitro* (George *et al.*, 2007). Eksplan pada semua perlakuan medium tidak mengalami *browning* dan kontaminasi, sehingga eksplan hidup yang didapatkan sampai dengan akhir pengamatan sangat tinggi yaitu 100% (Tabel 2). *Browning* dan kontaminasi pada eksplan tidak terjadi karena eksplan yang digunakan adalah tunas anggrek *Vanda tricolor* steril hasil dari persemaian secara *in vitro*. Selain itu, dalam penanaman tidak memerlukan perlakuan pada eksplan yang dapat menimbulkan kontaminasi maupun *browning* pada eksplan. Penambahan arang aktif pada medium dalam perlakuan juga mempengaruhi persentase eksplan *browning*. Menurut Widiastoety dkk. (2012), pada kultur *in vitro* anggrek biasanya medium ditambah dengan arang aktif atau karbon yang berfungsi menyerap senyawa racun dalam medium atau menyerap senyawa inhibitor yang disekresikan oleh eksplan, sehingga tingkat eksplan mengalami pencoklatan atau *browning* dapat dihindari. Selain itu, tidak adanya kontaminasi juga dipengaruhi oleh pemberian PPM (*Plant Preservative Mixture*) yang dapat membantu menghambat pertumbuhan dari pathogen. Hasil persentase eksplan hidup, *browning* dan kontaminasi disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. . Pengaruh jenis medium dan konsenstrasi BAP terhadap persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning* dan persentase eksplan kontaminasi tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 MST

Perlakuan	Eksplan Hidup (%)	Eksplan <i>Browning</i> (%)	Eksplan Kontaminasi (%)
NDM + BAP 0 mg/l	80	20	20
NDM + BAP 0,5 mg/l	100	10	0
NDM + BAP 1 mg/l	100	0	0
VW + BAP 0 mg/l	90	30	10
VW + BAP 0,5 mg/l	100	20	0
VW + BAP 1 mg/l	100	0	0
MS + BAP 0 mg/l	100	0	0
MS + BAP 0,5 mg/l	100	20	0
MS + BAP 1 mg/l	70	30	30

\*Semua perlakuan ditambah NAA 0,5 mg/l

### 1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan parameter yang diukur untuk mengetahui kemampuan eksplan beradaptasi pada medium yang digunakan. Eksplan yang ditanam pada semua perlakuan menunjukkan hasil persentase hidup 70 - 100% .

Tingginya persentase hidup eksplan disebabkan eksplan yang digunakan berupa tunas anggrek *Vanda tricolor* steril yang berasal dari hasil persemaian biji anggrek secara *in vitro*. Dengan demikian, tidak ada pemotongan yang akan mengakibatkan *browning* maupun kontaminasi. Komposisi zat dalam medium perlakuan yang digunakan juga telah cocok untuk mendukung kehidupan eksplan selama inkubasi, sehingga persentase eksplan hidup tetap tinggi sampai dengan akhir pengamatan. Menurut Abidin (1995), kemampuan hidup eksplan pada kultur *in vitro* akan sangat tergantung dari eksplan itu sendiri, sedangkan daya tahan eksplan untuk tetap hidup dipengaruhi oleh jenis dan komposisi medium yang digunakan. Eksplan yang hidup dapat dilihat dari warna eksplan yaitu hijau muda sampai hijau tua serta adanya perkembangan dari tunas anggrek *Vanda tricolor* tersebut. Perkembangan meliputi pembesaran dan munculnya bakal tunas berbentuk bulatan kecil yang menunjukkan bahwa eksplan dapat menyerap unsur hara yang terdapat pada medium dan ZPT yang diberikan.

### 2. Persentase Eksplan *Browning*

Persentase eksplan *browning* diamati untuk mengetahui adaptasi dari tunas anggrek *Vanda tricolor* yang dipindahkan dari medium awal ke medium perlakuan. Persentase eksplan yang mengalami *browning* dihitung saat adanya perubahan warna pada permukaan eksplan dari hijau menjadi kecoklatan lebih dari 50%. Penyebab utama dari pencoklatan eksplan yaitu karena pemotongan pada eksplan dan penggunaan eksplan jaringan tua.

Menurut Lerch (1981), pencoklatan pada jaringan dapat terjadi karena aktivitas dari enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti *polifenol oksidase* dan *tirosinase*, yang mana enzim ini akan dilepaskan atau disintesis pada kondisi oksidatif pada saat jaringan dilukai. Jaringan yang diisolasi akan berubah

warna menjadi coklat dan atau kehitaman serta gagal tumbuh. Penggunaan jaringan muda sebagai eksplan juga terbukti menurunkan terjadinya *browning* pada eksplan. Menurut George dan Sherrington (1984), pencoklatan pada jaringan yang muda akan lebih sedikit dibandingkan dengan jaringan yang tua. Eksplan jaringan yang memiliki umur tua mengandung senyawa fenolik yang lebih banyak, sehingga dapat meningkatkan terjadinya *browning*.

Hasil pengamatan menunjukkan hasil terjadinya *browning* 10 – 30 % pada tunas angrek *Vanda tricolor* sampai dengan 8 MST. Rendahnya persentase eksplan *browning* pada eksplan diduga akibat respon eksplan terhadap senyawa atau zat pengatur tumbuh yang diberikan dapat mendorong pertumbuhan mengarah pada pembelahan sel sehingga eksplan dapat pulih kembali setelah perlakuan fisik. Penggunaan arang aktif juga berpengaruh pada tingkat *browning* dari eksplan. Hutami (2006), menyatakan bahwa penambahan arang aktif ke dalam medium kultur seringkali dapat menghindari pembentukan inhibitor fenolat. Arang aktif juga dapat menyerap senyawa fenol yang keluar dari jaringan tanaman yang terluka pada saat inisiasi (Fridborg dan Erikson 1975 dalam Widiastoety dan Marwoto, 2004).

### **3. Persentase Eksplan Kontaminasi**

Pengamatan eksplan yang terkontaminasi bertujuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan sterilisasi baik pada eksplan, alat maupun medium (Imanudin, 2016). Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Ermayanti (1997), bahwa sumber kontaminasi berasal dari mikroorganisme yang tumbuh pada material tanaman yang dibiakkan dan alat-alat yang digunakan. Eksplan yang terkontaminasi dapat dilihat dari adanya bakteri maupun jamur yang tumbuh pada eksplan maupun medium. Pada penelitian ini, sterilisasi hanya dilakukan pada alat dan medium, karena eksplan yang digunakan adalah eksplan yang sudah steril.

Hasil dari pengamatan selama 8 minggu menunjukkan adanya eksplan yang terkontaminasi (10 – 30%). 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. Hal ini menunjukkan kurang tepatnya sterilisasi alat dan medium yang dilakukan. Alat dan medium yang digunakan disterilisasi dengan metode sterilisasi basah, yaitu dengan menggunakan autoklaf selama 1 jam dengan tekanan 1 atm. Sementara pada saat penanaman, alat yang digunakan disterilisasi kembali dengan metode sterilisasi bakar, dimana alat yang telah dicelupkan pada alkohol 70% dibakar dengan api bunsen. Kedua sterilisasi tersebut efektif dalam menghilangkan bakteri maupun jamur penyebab kontaminasi pada medium maupun eksplan. Penggunaan PPM (*Plant Preservative Mixture*) dapat mencegah terjadinya kontaminasi. PPM merupakan larutan kimia yang digunakan sebagai bahan tambahan dalam kultur jaringan tanaman untuk menghilangkan dan mencegah sebagian besar kontaminasi akibat bakteri dan jamur tanaman. Menurut Sharaf dan Weathers (2006), PPM merupakan salah satu bahan biosida cair yang termasuk dalam golongan isotiazolon yang mampu menghambat mikroba dan jamur dalam perbanyakannya secara kultur *in vitro*. Penelitian ini menggunakan PPM dengan konsentrasi 0,1 ml/L yang ditambahkan ke dalam medium. Dosis ini

terbukti mampu menghindari terjadinya kontaminasi pada eksplan maupun medium pada semua perlakuan sampai dengan akhir pengamatan.

## B. Pertumbuhan Tunas

Hasil analisis, menunjukkan bahwa perlakuan macam medium dan konsentrasi BAP tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap semua parameter. Hasil sidik ragam terhadap waktu muncul tunas, persentase eksplan bertunas, tinggi tunas dan jumlah daun disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh Jenis Medium dan Konsentrasi BAP terhadap Waktu Muncul Tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 (MST).

Perlakuan (minggu)	Tumbuh tunas ( % )	Waktu tumbuh tunas
NDM + BAP 0 mg/l	100	1.29a
NDM + BAP 0,5 mg/l	100	1.62a
NDM + BAP 1 mg/l	90	1.39a
VW + BAP 0 mg/l	100	1.26a
VW + BAP 0,5 mg/l	70	1.68a
VW + BAP 1 mg/l	100	1.28a
MS + BAP 0 mg/l	100	1.39a
MS + BAP 0,5 mg/l	90	1.42a
MS + BAP 1 mg/l	70	1.37a

\*semua perlakuan ditambah NAA 0,5 mg/l

Keterangan :

- Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak beda nyata pada uji F  $\alpha = 5\%$ .(-) menunjukkan tidak ada interaksi antar perlakuan.

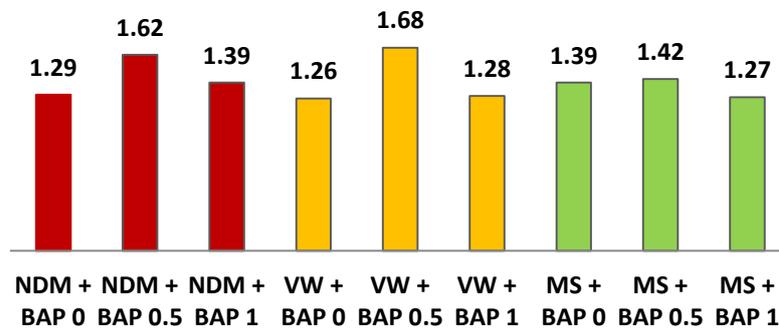
### 1. Waktu muncul tunas

Waktu muncul tunas merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan kecepatan pertumbuhan eksplan sejak awal penanaman. Waktu muncul tunas diamati pada setiap minggunya. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama (awal penanaman) hingga muncul tunas pertama.

Hasil sidik ragam pada waktu tumbuh tunas anggrek *Vanda tricolor* dengan taraf kesalahan 5% (Tabel 2) menunjukkan bahwa perlakuan medium dan konsentrasi BAP yang diberikan menunjukkan analisis yang tidak beda nyata terhadap kecepatan waktu muncul tunas anggrek *Vanda tricolor*. Hasil menunjukkan nilai selisih pada medium VW dan konsentrasi BAP 0 mg/l lebih cepat dibandingkan dengan medium NDM, MS dan konsentrasi BAP 0,5 mg/l, BAP 1 mg/l. Sedangkan pada medium VW dan konsentrasi BAP 0,5 mg/l menunjukkan nilai selisih waktu muncul tunas paling lambat dibandingkan medium NDM, MS dan konsentrasi BAP 0 mg/l, BAP 1 mg/l. Hal ini dapat disebabkan oleh persamaan respon pertumbuhan PLB pada setiap ulangan.

Dwiyani (2013) menyebutkan bahwa salah satu permasalahan dalam budidaya anggrek genus *Vanda* adalah masa vegetatif yang panjang, sehingga memerlukan waktu yang relatif lama dalam proses pembungaan (*flowering*). *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* ini membutuhkan waktu kurang lebih 5 tahun setelah disemai untuk menghasilkan bunga pertama kali. Begitu pula dengan perbanyakannya dengan menggunakan kultur *in vitro* dimana pertumbuhan

*Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* cukup lambat dalam pertumbuhan maupun pembentukan kalus maupun tunas.



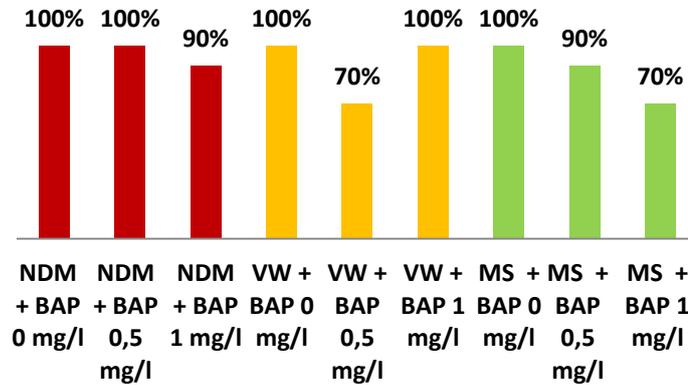
Gambar 1. Waktu muncul tunas berdasarkan jenis medium NDM, VW, MS dan konsentrasi BAP 0, 0,5 dan 1 mg/l terhadap pertumbuhan tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST).

Tunas sudah mulai muncul pada minggu ke-1 pada semua perlakuan. Munculnya tunas ini dicirikan dengan terbentuknya mata tunas dengan ujung lancip dan berwarna hijau pada eksplan. Kecepatan eksplan bertunas dipengaruhi oleh genotip tanaman yang digunakan, kombinasi medium dan zpt yang diberikan. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Wattimena *et al.*, (1992), bahwa kecepatan sel untuk membelah diri dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi zat pengatur tumbuh tertentu dalam konsentrasi yang tertentu.

Hal ini dikarenakan pada dasarnya eksplan PLBs anggrek *Vanda tricolor* telah memiliki calon tunas, sehingga perlakuan tanpa Zat Pengatur Tumbuh golongan sitokinin lebih mengutamakan pertumbuhan tunas dari pada multiplikasi tunas, sedangkan perlakuan dengan penambahan Zat Pengatur Tumbuh golongan sitokinin fungsi utamanya untuk multiplikasi atau memperbanyak tunas dari pada memunculkan tunas, sesuai dengan pendapat Putri (2016) bahwa aktivitas utama sitokinin adalah mendorong pembelahan sel.

## 2. Persentase eksplan bertunas

Perhitungan parameter eksplan bertunas dilakukan dengan melihat pertambahan tunas baru pada eksplan kemudian dibagi dengan jumlah ulangan dan dikalikan 100%. Grafik parameter eksplan bertunas pada akhir pengamatan (8 minggu setelah tanam) disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh Jenis Medium NDM, VW, MS dan Konsentrasi BAP 0, 0,5,1 mg/l terhadap Persentase eksplan bertunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST).

Tunas sudah mulai muncul di minggu pertama pada semua perlakuan. Pada akhir pengamatan (8 MST) diperoleh persentase anggrek *Vanda tricolor* bertunas yang tinggi 90 – 100 % (Gambar 2), kecuali pada perlakuan medium VW dengan pemberian BAP 0,5 mg/L dan medium MS dengan pemberian BAP 1 mg/L yaitu 70%. Hal tersebut karena eksplan mengalami pencoklatan sebagian sejak minggu ke-3 setelah tanam. Pencoklatan pada eksplan dapat menghambat pertumbuhan eksplan karena terhambatnya penyerapan unsur hara sehingga eksplan tidak mampu tumbuh. Pencoklatan diduga karena penggunaan pinset saat penanaman masih panas, sehingga menimbulkan luka pada eksplan. Meskipun mengalami pencoklatan, namun eksplan masih menunjukkan respon pertumbuhan berupa pembengkakan. Tang dan Newton (2004) menjelaskan bahwa pencoklatan pada jaringan sangat menurunkan regenerasi kultur kalus secara *in vitro*, sehingga pertumbuhan dari PLB yang mengalami pencoklatan menjadi lebih lambat.

## 3. Jumlah Tunas

Jumlah tunas merupakan parameter lanjutan dari waktu muncul tunas dan persentase eksplan bertunas. Jumlah tunas ini sangat penting diamati karena semakin banyak tunas yang terbentuk akan berpeluang mendapatkan bibit yang banyak pula. Bhojwani dan Razdan (1983), menyatakan bahwa eksplan yang ditanam pada medium yang mengandung sitokinin dengan konsentrasi tertentu, maka eksplan akan berdiferensiasi membentuk tunas. Parameter ini diamati pada setiap minggunya. Penelitian yang dilakukan oleh Karyanti (2017), yang menguji tunas steril dari anggrek *Vanda douglas* pada medium MS dengan perlakuan konsentrasi sitokinin TDZ dan BAP. Dalam penelitian ini, dihasilkan perlakuan terbaik parameter pertambahan tunas pada minggu ke-12 adalah konsentrasi TDZ

0,5 mg/l, dibandingkan dengan konsentrasi 1 mg/l dan 1,5 mg/l. Pada penelitian yang dilakukannya, perlakuan pada PLB anggrek *Vanda tricolor* var. *pallida* yang menunjukkan hasil proliferasi terbaik terjadi pada pemberian TDZ konsentrasi 0,5 mg/l.

Tabel 3. Pengaruh Jenis Medium dan Konsentrasi BAP terhadap Jumlah Tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 (MST).

Perlakuan	Jumlah Tunas
NDM + BAP 0 mg/l	0.89bc
NDM + BAP 0,5 mg/l	1.03bc
NDM + BAP 1 mg/l	1.50a
VW + BAP 0 mg/l	0.96bc
VW + BAP 0,5 mg/l	1.22ab
VW + BAP 1 mg/l	1.16bc
MS + BAP 0 mg/l	1.15bc
MS + BAP 0,5 mg/l	1.14ab
MS + BAP 1 mg/l	0.86c

\*semua perlakuan ditambah NAA 0,5 mg/l

Keterangan : - Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak beda nyata pada uji F  $\alpha = 5\%$ .(-) menunjukkan tidak ada interaksi antar perlakuan.

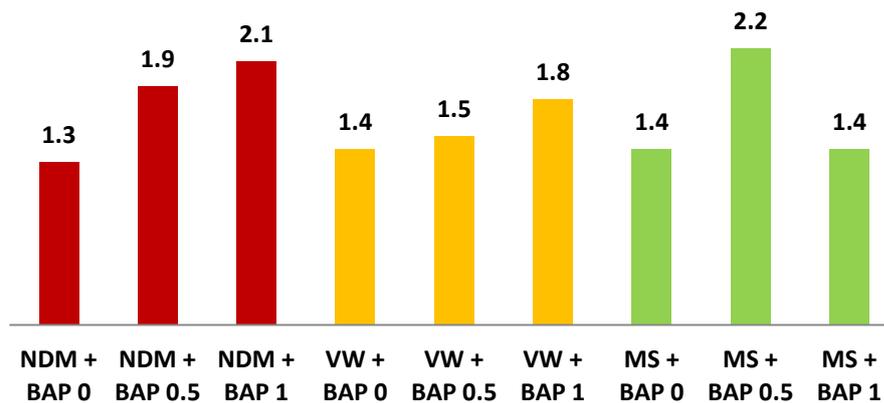
Hasil sidik ragam pada jumlah tunas anggrek *Vanda tricolor* dengan taraf kesalahan 5% (Tabel 3) menunjukkan analisis yang beda nyata terhadap jumlah muncul tunas anggrek *Vanda tricolor*, medium NDM dan konsentrasi BAP 1 mg/l menunjukkan nilai selisih jumlah tunas tertinggi dibandingkan dengan medium VW, MS dan konsentrasi BAP 0 mg/l, BAP 0,5 mg/l. Sementara medium MS dan konsentrasi BAP 1 mg/l menunjukkan nilai selisih jumlah tunas terendah dibandingkan medium NDM, VW dan konsentrasi BAP 0 mg/l, BAP 0,5 mg/l.

Hal tersebut menunjukkan perlakuan berbagai macam medium dengan pemberian konsentrasi BAP memberikan pengaruh terhadap jumlah tunas anggrek *Vanda tricolor* karena terkecukupinya komponen-komponen yang diperlukan untuk pembentukan tunas. Pertumbuhan dan perbanyakan tunas didukung oleh tercukupinya energi dalam hal ini adalah gula dalam bentuk sukrosa yang ditambahkan ke medium. Karbohidrat, dalam hal ini glukosa, merupakan kunci utama dalam proses metabolisme tanaman. Semakin tinggi konsentrasi TDZ berakibat menurunnya pembelahan sel karena terjadi akumulasi TDZ di jaringan. Perbedaan jumlah tunas yang terbentuk pada tiap perlakuan dipengaruhi oleh kombinasi BAP dan NAA pada 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 yang tertentu. Tunas masih terlihat tumbuh sampai akhir pengamatan (minggu 8) pada semua perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi BAP dan NAA pada semua konsentrasi masih aktif berperan dalam penggandaan tunas sampai jangka waktu akhir pengamatan, meskipun jumlah tunas yang terbentuk pada awal pengamatan masih rendah. Hal ini juga didukung dengan pendapat

Davies (1995), yang menyatakan bahwa pemberian NAA pada medium kultur menyebabkan pembelahan sel pada permulaan kultur berjalan lambat, akan tetapi populasi sel tetap terjaga dan kemudian jumlahnya ditingkatkan.

#### 4. Tinggi Tunas

Pertambahan tinggi tunas terjadi karena adanya penambahan jumlah sel atau pemanjangan sel yang dipengaruhi oleh unsur hara maupun ZPT. Tinggi tunas digunakan sebagai indikator pertumbuhan suatu tanaman yang penting untuk diamati karena menggambarkan seberapa besar pengaruh perlakuan terhadap eksplan.



Gambar 3. Pertumbuhan tinggi tunas berdasarkan jenis medium NDM, VW, MS dan konsentrasi BAP 0, 0,5, 1 mg/l terhadap pertumbuhan tunas Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST).

Berdasarkan hasil sidik ragam pada tinggi tunas anggrek *Vanda tricolor* dengan taraf kesalahan 5% menunjukkan analisis yang tidak beda nyata terhadap tinggi tunas anggrek *Vanda tricolor*, medium MS dan konsentrasi BAP 0,5 menunjukkan nilai selisih tinggi tunas yang tertinggi dibandingkan dengan medium NDM, VW dan konsentrasi BAP 0 mg/l, BAP 1 mg/l. Sedangkan pada medium NDM dan konsentrasi BAP 0 menunjukkan nilai selisih terendah dibandingkan dengan medium VW, MS dan konsentrasi BAP 0,5 mg/l, BAP 1 mg/l. Hal tersebut menunjukkan perlakuan berbagai macam medium dengan pemberian konsentrasi BAP tidak memberikan pengaruh terhadap tinggi tunas anggrek *Vanda tricolor* pada minggu ke-8, hasil menunjukkan bahwa perlakuan macam medium yang diberikan Soetopo (2012), melaporkan bahwa pembentukan kalus dan tunas dapat terjadi pada perlakuan medium VW dibandingkan dengan perlakuan medium ½ MS yang hanya memunculkan kalus pada eksplan tunas anggrek *D. strebloceras*. Tunas pada anggrek ini muncul pada 9 HSS (hari setelah semai) sampai dengan 27 HSS (hari setelah semai).

#### 5. Jumlah Daun

Daun merupakan organ vegetatif, pertumbuhannya dipengaruhi oleh kandungan nitrogen dalam media. Selain itu daun merupakan organ yang penting dalam pertumbuhan tanaman karena daun sebagai tempat terjadinya fotosintesis.

yaitu proses pembentukan karbohidrat dari CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O dengan bantuan sinar matahari. Semakin banyak jumlah daun, mengindikasikan pertumbuhan eksplan yang semakin baik (Acima, 2006).

Tabel 4. Pengaruh Jenis Medium dan Konsentrasi BAP terhadap Jumlah Daun Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 (MST).

Perlakuan	Jumlah Daun
NDM + BAP 0 mg/l	0.61bc
NDM + BAP 0,5 mg/l	0.78ab
NDM+ BAP 1 mg/l	0.91ab
VW + BAP 0,mg/l	0.54bc
VW + BAP 0,5 mg/l	0.10c
VW + BAP 1 mg/l	0.64bc
MS + BAP 0 mg/l	0.54bc
MS + BAP 0,5 mg/l	1.21a
MS + BAP 1 mg/l	0.44bc

\*semua perlakuan ditambah NAA 0,5 mg/l

Keterangan :

- Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak beda nyata pada uji F  $\alpha = 5\%$ .(-) menunjukkan tidak ada interaksi antar perlakuan

Hasil sidik ragam pada tunas anggrek *Vanda tricolor* dengan taraf kesalahan 5% pada tabel 5 menunjukkan bahwa perlakuan macam medium yang diberikan menunjukkan analisis yang beda nyata terhadap jumlah daun eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor*, medium MS dan konsentrasi BAP 0,5 menunjukkan jumlah daun dengan nilai selisih tertinggi dibandingkan dengan medium NDM, VW dan konsentrasi BAP 0 mg/l, BAP 1 mg/l. Sementara medium VW dan konsentrasi BAP 0,5 menunjukkan nilai selisih paling rendah dibandingkan medium NDM, MS dan konsentrasi BAP 0 mg/l, BAP 1 mg/l.

Hal tersebut menunjukkan perlakuan berbagai macam medium dengan pemberian konsentrasi BAP memberikan pengaruh terhadap jumlah daun anggrek *Vanda tricolor* karena tercukupinya komponen-komponen yang diperlukan untuk pembentukan daun. Pertumbuhan dan perbanyakan daun didukung oleh tercukupinya energi dalam hal ini adalah gula dalam bentuk sukrosa yang ditambahkan ke medium. Karbohidrat, dalam hal ini glukosa, merupakan kunci utama dalam proses metabolisme tanaman. Sesuai dengan pendapat Wattimena *et al.*, (1992) bahwa kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi zat pengatur tumbuh tertentu dalam konsentrasi yang tertentu. Daun masih akan aktif mengalami pertumbuhan tingginya pada semua perlakuan yang tidak terkena *browning*, sampai akhir pengamatan ( 8 minggu) maupun setelah pengamatan. Hal ini karena kombinasi macam Medium dan BAP masih berperan untuk pengadan tinggi daun pada eksplan.

#### **IV. KESIMPULAN DAN SARAN**

##### **A. Kesimpulan**

Jenis medium MS (*Murashige and Skoog*) dan konsentrasi BAP 0,5 mg/l merupakan kombinasi terbaik pada pertumbuhan tunas Anggrek *Vanda tricolor* ditunjukkan pada parameter Jumlah Daun dan Tinggi Tunas.

##### **B. Saran**

Perlu peningkatan konsentrasi BAP untuk mendapatkan respon waktu lebih cepat pada pertumbuhan eksplan Tunas Anggrek *Vanda tricolor* secara in vitro.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1995. Dasar-dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh. Buku. Angkasa. Bandung. 85 hal.
- Acima. 2006. Pengaruh jenis media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi adenium (*Adenium obesum*) secara in vitro. Skripsi S1 Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Anwar, N. 2007. Pengaruh Medium Multiplikasi Terhadap Pembentukan Akar pada Tunas In Vitro Nenas (*Ananas comocus (L.) Merr.*) cv. Smooth Cayenne di Medium Pengakaran. Skripsi Diterbitkan. Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 37 hal.
- Ashari, S. 1995. Hortikultura Aspek Budidaya. Universitas Indonesia Press (UI-Press). Jakarta.
- 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.
- Bhojwani, S.S. dan M. K. Razdan. 1983. *Plant tissue Culture. Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo. 502 p.
- 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.
- Dressler, R. and Dodson. 2000. The orchid natural history and classification. Cambridge. Harvard University Press.
- Dwiyani. 2013. Induksi Kalus pada Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. Var. *Suavis*, Upaya Penyediaan Target Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Jurnal Agrotropika 18(2): 73-76.
- Ermayanti, T.M. 1997. Mengenal dan Mengatasi Kontaminan Pada Biak Jaring Tanaman. Warta Biotek 11(3).
- Gamborg OL, and Shyluk JP. 1981. *Nutrition, Media and Characteristic Plant Cell and Tissue Cultures in plants tissue cultures: methods and Application in Agricultural*. New York: Academic Press.
- George, E.F., M.A. Hall, G.J. De Klerk. 2007. *Plant Propagation by In vitro Culture*. 3rd edition. Vol 1. The Background. Exegetic. Basingtone, UK.
- George, E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture Part 1: The Technology*. 2nd edition. Exegetics Limited, England. 574p.
- George, EF. dan P.D. Sherington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Lim., England. 09 pp.

- Gunadi, T. 1977. Mengenali Anggrek. Penerangan dan Publikasi PAI cabang Bandung. 128 hal.
- Gunawan, L. W. 1987. Teknik Kultur Jaringan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Gunawan, L.W. 2004. *Budi Daya Anggrek*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Gunawan, L. W. 1992. Teknik Kultur Jaringan. Bogor. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB
- Hendaryono, Daisy P. Sriyanti dan Wijayani, Ari. 1994. Teknik Kultur Jaringan. Penerbit Kanisus, Yogyakarta. Hal. 17.
- Hendaryono, D. 1998. Teknik Kultur Jaringan Tanaman Anggrek : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif-Modern. Kanisiu: Yogyakarta.
- Hoesen, D.S.H. 1996. Pembentukan Tunas Kencur Secara In-Vitro. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*. Kel. Kerja Nas. Tumb. Obat Indonesia. Jakarta. 3 (2) : 21 – 27.
- Hutami, S. 2006. Penggunaan arang aktif dalam kultur *in vitro*. *Berita Biologi* 8(1):83-89 hlmn.
- Hutami S. 2008. Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 4(2):83-88.
- Intan. 2008. Perbanyakkan Iles – Iles (*Amorphophallus Mulleri* Blume) Secara Kultur *in Vitro* Dengan Pemberian Zat Pengatur Tumbuh NAA dan BAP. Institut Pertanian Bogor. Bogor, Jawa Barat.
- Imanudin. 2016. Pengaruh Penambahan Air Rebusan Kentang (*Solanum tuberosum* L.), BAP dan NAA Terhadap Induksi Tunas Jati Emas (*Cordia subcordata*) Secara *In vitro*. Skripsi. <http://repository.umy.ac.id/bitstream/handle/123456789/6525/NASKAH%20PUBLIKASI.pdf?sequence=12&isAllowed=y>. Diakses tanggal 19 April 2018.
- Isnaeni, N. 2008. Pengaruh Tdz Terhadap Inisiasi dan Multiplikasi Kultur *In Vitro* Pisang Raja Bulu (*Musa paradisiaca* L. AAB Group). IPB. Bogor.
- Karyanti. 2017. Pengaruh Beberapa Jenis Sitokinin Pada Multiplikasi Tunas Anggrek *Vanda douglas* Secara *In vitro*. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia* 4 (1) : 36-43.
- Latip, M.A., R. Murdad, Z.A. Aziz, L.H. Ting, L.M. Govindasamy and R. Ripin. 2010. Effects of N6-Benzyladenine and Thidiazuron on Proliferation of *Phalaenopsis gigantea* Protocorms. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology Biotechnology* 18(1):217-220.
- Lerch, K. 1981. *Tyrosinase kinetics: A Semi-Quantitative Model Of The Mechanism Of Oxidation Of Monohydric And Dihydric Phenolic*

- Substrates*. In Sigel, H. (Ed.). Metal Ions in Biology System. 13 Marcel Dekker Inc., New York, Basel. p. 143-186.
- Lestari, Y. 2006. Identification of indigenous *Streptomyces* spp. producing antibacterial compounds. *J Mikrobiol Indones* 11:99-101.
- Marlina, N. 2009. Teknik Perbanyak Lili Dengan Kultur Jaringan. Buletin Teknik Pertanian Cihe-rang. 14 (1) : 6-8.
- Metusala, D. 2006. Melirik Konservasi Anggrek *Vanda tricolor* L. var. *suavis* di Merapi. <<http://www.anggrek.org/melirik-konservasi-anggrek-vanda-tricolor-di-merapi-2.html>>. Diakses tanggal 20 Juli 2011.
- Mutmainah, S. 2016. Induksi Tunas Adventif Bawang Putih Tunggal (*Allium satiyum*) dengan penambahan BAP dan NAA Secara *in vitro*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Diakses 25 mei 2017.
- Noggle, G.R dan G.J. Fritz. 1993. Introductory Plant Physiologi. Second Edition. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey 627 p.
- Parnata, S. 2004. Sitokinin dan Auksin. Jakarta: PT AgromediumPustaka. Hal 15-18.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. Netherlands.
- Pranata, A. S., 2005. Panduan Budidaya dan Perawatan Anggrek. Jakarta: Agromedia.
- Prihatmanti, D. 2002. Penggunaan zpt NAA dan BAP serta air kelapa untuk menginduksi organogenesis tanaman Anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden ex Andre). Skripsi. Jurusan Budidaya Petanian, Fakultas Pertanian, IPB. Bogor.
- Putri, F. Y. E. 2016. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Golongan Auksin (NAA) dan Sitokinin (BAP, Kinetin dan Thidiazuron) terhadap Subkultur Nilam Aceh. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rineksane, I. A dan M. Sukarjan. 2015. Regenerasi Anggrek *Vanda tricolor* Pasca Erupsi Merapi Melalui Kultur *In Vitro*. Yogyakarta.
- Rupawan, I. M., Basri, Z. dan M. Bustami. 2014. Pertumbuhan Anggrek *Vanda (vanda sp)* Pada Berbagai Komposisi Media Secara *In Vitro*. *e-Jurnal. Agrotekbis* 2 (5) : 488-494.
- Semiarti E, Dewi K, Sasongko AB, Nurwulan R. 2009. Bibit GAMA Anggrek Unggulan Hasil Persilangan Anggrek Lokal Indonesia *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* Merapi dan *Vanda limbata* Blume dengan karakter molekular. UGM, Yogyakarta.

- Sharaf, E. MA., dan Weathers, P. 2006. "Movement and Containment of Microbial Contamination in The Nutrient Mist Bioreactor". *In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant*. Volume 42(6). Pp: 553-557
- Soetopo, L. 2012. Kemandirian Benih Anggrek Untuk Pasar Domestik dan Ekspor 'Kultur *In vitro* Tunas dan Biji pada *Dendrobium* Spesies'. <http://litasoetopo.lecture.ub.ac.id/2012/01/kemandirian-benih-anggrek-untuk-pasar-domestik-dan-ekspor-%E2%80%99kultur-in-vitro-tunas-dan-biji-pada-dendrobium-spesies%E2%80%99/>. Diakses tanggal 24 April 2018.
- Suryowinoto, M. 1996. Pemuliaan tanaman secara *in vitro*. Kanisius. Yogyakarta.
- Tang, W. dan R.J. Newton. 2004. *Increase of Polyphenol Oxidase and Decrease of Polyamines Correlate With Tissue Browning in Virginia pine (Pinus virginiana Mill.)*. *Plant Sci*. 167(3):621-628
- Tokuhara, K. and Mii, M. 1993. *Micropropagation of Pha-laennopsis and Doritaenopsis by culturing shoot tips of flowering stalk buds*. *Plant Cell Rep*. 13: 7-11.
- 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.
- Wattimena. 1991. Bioteknologi tanaman. tim laboratorium kultur jaringan tanaman. PAU Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Wetter, L. R., dan F. Constabel. 1991. Metode Kultur Jaringan Tanaman. ITB. Bandung.
- Widiastoety, D, Santi, A, dan Solvia, N. 2012. Pengaruh Myoinositol dan Arang Aktif terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek *Dendrobium* dalam Kultur *In vitro*. *Jurnal Holtikultura*. 22 (3) : 205-209 hlm.
- Widiastoety, D. dan Marwoto. 2004. Pengaruh Auksin dan Sitokinin terhadap Pertumbuhan Plantlet Anggrek Mokara. *J. Hort*. 24(3): 230-238.
- Wilkins, M.B. 1989. *Fisiologi Tanaman*. PT. Bina Aksara : Jakarta.
- Yusnita. 2004. Kultur Jaringan. Cara Memperbanyak Tanaman secara Efisien. Agromedia Pustaka. Jakarta. 88 hlmn.
- Zaer, J. S. dan M. O. Mapes. 1985. *Action of Growth Regulators*. P. 231-255. In J. M. Bonga and P. J. Duczan (eds.). *Tissue Culture in Forestry*. Martinus NIJHOFF. London.

## LAMPIRAN

### Lampiran I. Kebutuhan Kebutuhan Media

Komponen	1 ℓ	200 ml
Medium NDM	1,96 ℓ	0,392 g
MEDIUM VW	1,67 g	0,334 g
MEDIUM MS	4,33 g	0,866 g
Phytigel	2,5 g	0,5 g
Sukrosa	30 g	6 g
PPM	0,5 ml	0,1 ml
BAP 0,5	5 ml	1 ml
BAP 1	10 ml	2 ml
NAA	5 ml	1 ml
Arang aktif	0,2 g/ℓ	0,04 g/ℓ

### Lampiran II. Kandungan Medium MS, VW, NDM

Unsur	Komponen	Medium		
		MS (mg/liter)	VW (mg/liter)	NDM (mg/liter)
Unsur Makro	KNO <sub>3</sub>	1.900	80	200
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650	-	480
	(NH <sub>4</sub> ) <sup>2</sup> SO <sub>4</sub>	-	-	-
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370	740	250
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	200	-
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440	-	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	550

	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sup>2</sup> 4H <sub>2</sub> O	-	285	470
	KCl	-	65	150
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	-	16,5	-
Unsur Mikro	Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	-	-
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27,8	-	-
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	16,9	7	3
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	2,67	0,5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	1,5	0,5
	KI	0,83	0,75	-
	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	-	0,025
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,01	0,025
	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sup>3</sup>	-	2,5	-
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025	-	0,025
	NaMoO <sub>3</sub>	-	0,001	-
	Komponen Organik	Myo-inositol	100	-
Glicyne		100	3	-
Asam nicotinic		0,5	0,5	-
Pyridoxine HCl		0,5	0,1	1
Thiamine HCl		1	0,1	1
d-Biotin		-	-	0,1
Niacin		-	-	1
Calcium pantothenate		-	-	1
Adenine		-	-	1
i-Cystein		-	-	1
Fe-EDTA		-	-	21

### Lampiran III. Layout Penelitian

M2B3 (6)	M3B3 (10)	M2B1 (2)	M1B3 (5)	M1B2 (9)	M3B2 (2)	M2B2 (1)	M3B2 (8)	M2B1 (9)
M1B2 (1)	M2B3 (5)	M2B2 (10)	M3B2 (9)	M1B1 (3)	M2B1 (3)	M3B3 (7)	M1B1 (1)	M2B1 (7)
M3B1 (1)	M2B1 (1)	M2B3 (10)	M1B2 (4)	M2B2 (6)	M3B3 (1)	M1B2 (3)	M2B2 (8)	M1B1 (2)
M3B1 (3)	M2B3 (3)	M2B1 (4)	M2B3 (2)	M3B2 (5)	M3B2 (7)	M3B2 (4)	M2B1 (6)	M3B3 (4)
M3B1 (2)	M2B3 (9)	M1B2 (8)	M2B3 (4)	M1B1 (10)	M1B3 (9)	M1B3 (2)	M3B2 (3)	M1B1 (5)
M2B2 (2)	M1B2 (2)	M1B3 (7)	M1B2 (7)	M2B2 (3)	M1B1 (8)	M1B3 (6)	M3B1 (9)	M2B1 (10)
M1B3 (1)	M2B2 (7)	M3B3 (2)	M1B1 (4)	M3B1 (7)	M2B3 (1)	M2B2 (9)	M1B1 (9)	M1B3 (8)
M1B3 (3)	M3B3 (3)	M1B3 (10)	M3B3 (9)	M3B3 (6)	M2B3 (7)	M3B3 (8)	M3B1 (4)	M1B2 (5)
M3B1 (6)	M3B2 (10)	M1B2 (6)	M3B2 (1)	M3B1 (8)	M1B1 (6)	M2B3 (8)	M1B1 (7)	M2B1 (5)
M2B2 (5)	M3B1 (10)	M1B2 (10)	M2B1 (8)	M3B1 (5)	M2B2 (4)	M3B3 (5)	M1B3 (4)	M3B2 (6)

Keterangan :

M1B1 = NDM + BAP 0 mg/l + NAA 0,5 mg/l

M2B1 = VW + BAP 0 mg/l + NAA 0,5 mg/l

M3B1 = MS + BAP 0 mg/l + NAA 0,5 mg/l

M1B2 = NDM + BAP 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l

M2B2 = VW + BAP 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l

M2B2 = MS + BAP 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l

M1B3 = NDM + BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l

M2B3 = VW + BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l

M3B3 = MS + BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l

**Lampiran IV. Hasil Sidik Ragam pertumbuhan tunas Anggrek *Vanda tricolor***

1. Waktu Tumbuh Tunas

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat tengah	F-Hitung	Pr>F
Model	17	3.90131414	0.22948907	0.93	0.5435ns
Perlakuan	8	1.75860516	0.21982564	0.89	0.5289ns
Galat	72	17.77125751	0.24682302		
Total	89	21.67257166			

Cv 35.14329

Keterangan = N: beda nyata Ns: tidak beda nyata

2. Jumlah Tunas

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat tengah	F-Hitung	Pr>F
Model	17	4.69509590	0.27618211	2.45	0.0045s
Perlakuan	8	3.07211250	0.38401406	3.41	0.0023s
Galat	72	8.11692404	0.11273506		
Total	89	12.81201994			

Cv 30.34475

Keterangan = N: beda nyata Ns: tidak beda nyata

3. Jumlah Daun

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat tengah	F-Hitung	Pr>F
Model	17	10.81289853	0.63605285	2.13	0.0139s
Perlakuan	8	7.83976569	0.97997071	3.29	0.0030s
Galat	72	21.46663876	0.29814776		
Total	89	32.27953729			

Cv 85.49218

Keterangan = N: beda nyata Ns: tidak beda nyata

4. Tinggi Tunas

Sumber	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat tengah	F-Hitung	Pr>F
Model	17	31.6444444	1.8614379	1.39	0.1668
Perlakuan	8	9.20000000	1.15000000	0.86	0.5546
Galat	72	96.3555556	1.3382716		
Total	89	128.0000000			

Cv 69.41021

Keterangan =

N: beda nyata Ns: tidak beda nyata

