

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tanaman Anggrek Merapi

*Vanda tricolor* Lindl. merupakan nama latin untuk anggrek Merapi yang merupakan tanaman anggrek spesies asli Indonesia yang tumbuh secara alami di tanah humus hutan yang lembab. Pola pertumbuhan anggrek ini tergolong tipe monopodial dimana batang tumbuh ke atas dan daunnya akan ikut tumbuh seiring dengan pertumbuhan batang selama hidupnya.

Tanaman anggrek Merapi tergolong tanaman anggrek langka dan dalam ancaman kepunahan karena bunganya yang eksotik mencolok dan mempunyai bentuk tubuh yang besar sehingga mudah didapat oleh pemburu bunga. Selain itu, pengembangbiakan anggrek Merapi sulit karena untuk memperoleh biji tanaman ini memerlukan rentang waktu yang lama.

*Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis forma* Merapi terkenal dengan sebutan anggrek Merapi karena tanaman ini tumbuh subur di lereng Merapi, sehingga tanaman anggrek ini disebut dengan anggrek Merapi. Tanaman ini memiliki bunga berwarna putih dengan bentol berwarna ungu yang menjadi ciri khas dari anggrek ini. Adapun klasifikasi ilmiah dari tanaman anggrek Merapi sebagai berikut

- |               |                      |                |                     |
|---------------|----------------------|----------------|---------------------|
| 1. Kerajaan   | : plantae            | 5. Family      | : Orchidaceae       |
| 2. (unranked) | : Angiosperma        | 6. Sub Family: | Epidendroideae      |
| 3. (unranked) | : Monocots           | 7. Genus       | : <i>Vanda</i>      |
| 4. Ordo       | : <i>Asparagales</i> | 8. Species     | : <i>V.tricolor</i> |

Tanaman angrek *V.tricolor* memiliki beberapa varietas seperti varietas *suavis* Merapi dan Bali dari hasil penelitian Semiarti *dkk.*, (2009) menunjukkan bahwa angrek *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* forma Merapi dan Bali yang telah dikarakterisasi secara morfologi, meliputi: panjang, lebar, dan tebal daun, ukuran bunga, serta diameter buah *Vanda* yang telah masak, menunjukkan hasil yang tidak terlalu berbeda. Begitu pula hasil karakterisasi molekular, keduanya menunjukkan pola morfologi maupun molekular yang sangat mirip satu sama lain.

Hasil penelitian Gardiner (2007) dalam Semiarti *dkk.*, (2009), menyatakan bahwa angrek *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang sekarang tersebar di Jawa dan Bali berasal dari satu tetua yang sama yaitu *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang ada di Sulawesi dan Filipina. Hasil penelitian ini tentu membawa harapan besar bagi para konservator angrek sebab jika *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* forma Merapi dan Bali memiliki karakter morfologi dan molekular yang sama, maka ada kemungkinan bahwa *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* forma Bali mampu bertahan hidup jika diintroduksi ke daerah Gunung Merapi (Semiarti *dkk.*, 2009).

Menurut Semiarti *dkk.*, (2009) morfologi *V.tricolor* Lindli. varietas *suavis* forma Merapi memiliki Panjang daun :  $31,8 \pm 3,5$  cm, Lebar daun :  $4,2 \pm 0,6$  cm, Tebal daun :  $0.1 \pm 0.2$  cm, panjang bunga :  $6.1 \pm 0.3$  cm, lebar bunga :  $6.1 \pm 0.3$  cm, panjang buah :  $6.3 \pm 0,2$  cm, dan diameter buah:  $2.7 \pm 0.4$ cm.

Perbanyakan tanaman angrek Merapi ini belum banyak dilaporkan, perbanyakan secara konvensional yang membutuhkan waktu yang lama dan tingkat keberhasilan yang kecil merupakan salah satu faktor perbanyakan tanaman

anggrek ini jarang dilakukan. Hasil penelitian Dwiyani *dkk.*, (2012) perlakuan tanpa ekstrak tomat, embrio *V. tricolor* Lindl. forma Merapi mencapai hampir 30% memperlihatkan kondisi embrio/protokorm pada medium tanpa ekstrak tomat pada 4 minggu setelah semai. Hal ini disebabkan adanya zat penghambat yang akan mempengaruhi aktivasi enzim yang menginisiasi proses perkecambahan dan pertumbuhan sehingga penggunaan ekstrak tomat tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

Sementara hasil penelitian Rineksane (2012) perlakuan NDM + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA menunjukkan adanya pertumbuhan kalus belum membentuk tunas adventif disebabkan penggunaan eksplan daun yang diambil dari tanaman dewasa sehingga respon dari tanaman lebih lambat dibandingkan dengan eksplan yang diambil dari kultur *in vitro*. Oleh karena itu, penelitian ini mencoba menggunakan eksplan daun steril *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang diinduksi kalus menggunakan Thidiazuron dan 2,4-D.

Menurut Dwiyani *dkk.*, (2012) dan Rineksane (2012) permasalahan yang spesifik dimiliki dengan riset *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis* yaitu *browning*, hal ini disebabkan kandungan fenolik yang terkandung dalam jaringan tanaman yang beroksidasi karena pelukaan pada eksplan yang menyebabkan terjadinya *browning* sehingga dalam perbanyakannya memerlukan upaya dalam mengatasi terjadinya *browning*. Penggunaan daun muda sebagai eksplan diharapkan mampu mencegah terjadinya *browning*. Menurut George dan Sherrington (1984) dalam Hutami (2008) pencoklatan pada jaringan muda lebih sedikit dibandingkan dengan jaringan yang tua.

## **B. Kultur *In Vitro* Anggrek**

Kultur *in vitro* merupakan suatu teknik pengisolasian bagian tanaman seperti organ, jaringan, sel, protoplasma, menumbuhkannya secara aseptis dalam medium buatan yang kaya akan nutrisi dan mengandung zat pengatur tumbuh sehingga bagian-bagian tersebut memperbanyak diri dan akhirnya beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali. Pada mulanya orientasi teknik kultur jaringan menjadi sarana pembuktian sifat totipotensi sel (Herawan, 1996). Satu sel dapat tumbuh sendiri walaupun terpisah dengan tanaman induknya karena sel mempunyai kemampuan untuk berkembang. Menurut sifat totipotensi sel dengan pengambilan bagian tubuh manapun dari tanaman akan tumbuh menjadi individu baru yang lengkap apabila diletakkan di medium yang sesuai (Katuuk, 1989).

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur *in vitro* yaitu pemberian unsur hara yang lengkap dan tepat sesuai dengan eksplan. Ketepatan dalam pemberian takaran unsur hara karena pertumbuhan eksplan sangat bergantung pada susunan zat makanan yang terlarut dalam medium (Katuuk, 1989). Beberapa keuntungan yang diperoleh dari perbanyakan kultur *in vitro* antara lain : perbanyakan generatif dan vegetatif yang cepat dan efisien, mempermudah seleksi mutan, menghindari sterilitas yang menghambat hibridisasi, produksi tanaman bebas patogen dan sebagai pelestarian plasma nutfah (Widiastoeti dan Santi,1997).

Menurut Daisy *dkk.*, (1994), teknik kultur jaringan akan berhasil dengan baik apabila syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi. Syarat-syarat tersebut meliputi pemilihan eksplan sebagai bahan dasar untuk pembentukan kalus,

penggunaan medium yang cocok, keadaan yang aseptik dan pengaturan udara yang baik terutama untuk kultur cair. Meskipun pada prinsipnya semua jenis sel dapat ditumbuhkan, tetapi sebaiknya dipilih bagian tanaman yang masih muda dan mudah tumbuh yaitu bagian meristem, seperti daun muda, ujung akar, ujung batang, keping biji dan sebagainya. Bila menggunakan embrio bagian biji-biji yang lain sebagai eksplan, yang perlu diperhatikan yaitu kemasakan embrio, waktu imbibisi, temperature dan dormansi.

Dalam kultur *in vitro* terdapat beberapa proses yaitu kultur dengan menggunakan eksplan dari luar maupun kegiatan *over planting* atau sub kultur. Sub kultur (*over planting*) merupakan kegiatan pemindahan planlet (anggrek) ke dalam medium botol kultur baru sehingga memperoleh kebutuhan nutrisi yang baru. Bila medium agar lebih dari 3 bulan tidak diganti, maka medium akan mengalami kecoklatan, menipis, dan mengering. Tanda-tandanya yaitu tanaman anggrek akan mengalami pencoklatan, layu, serta daun yang menguning. Keadaan yang seperti ini akan sangat merugikan apabila planletnya yaitu anggrek silangan. Oleh karena itu sebelum terlambat, anggrek botol harus dipindahkan dalam medium yang baru (Hendaryono, 2001 *cit* Liberty, 2001).

Medium merupakan salah satu faktor penting dalam keberhasilan kultur *in vitro*, penggunaan jenis medium akan berpengaruh terhadap kandungan unsur hara yang terkandung didalamnya. Unsur hara yang terkandung dalam suatu medium yang terdiri dari unsur makro dan mikro serta kandungan bahan organik dan vitamin sehingga mampu merangsang pertumbuhan eksplan.

### C. Medium $\frac{1}{2}$ MS dan NDM

Medium merupakan tempat untuk tumbuh bagi tanaman. Penggunaan medium dalam kultur *in vitro* tidak lepas dari kandungan unsur hara yang dikandung di dalamnya. Dalam kebanyakan kultur *in vitro*, pertumbuhan eksplan sangat dipengaruhi oleh medium tanam. Medium tanam berisi berbagai macam zat hara seperti unsur kultur makro, unsur mikro, vitamin, dan zat pengatur tumbuh. Pembuatan medium dibuat menjadi padat dengan menambahkan agar yang berguna untuk mencegah eksplan berpindah tempat. Medium tumbuh yang dipakai tergantung pada jenis asal mula eksplan diambil sesuai dengan bahan, tujuan serta umur jaringan (Widiastoeti dan Santi, 1997).

*Murashige dan Skoog* (MS) merupakan medium pertumbuhan tanaman yang digunakan di laboratorium untuk budidaya kultur sel tanaman. MS diciptakan oleh ilmuwan tanaman Toshio Murashige dan Folke K. Skoog pada tahun 1962. Kandungan unsur dalam medium MS mampu memberi unsur hara yang cukup untuk pertumbuhan. Marlina (2004) dalam Purwanto dkk., (2007) menyatakan bahwa media MS sering digunakan karena cukup memenuhi unsur hara makro, mikro dan vitamin untuk pertumbuhan tanaman. Adapun kandungan unsur yang terkandung dalam medium MS dapat dilihat pada Lampiran I.

Penggunaan medium MS dapat dilakukan dengan cara *full strength* maupun *half strength* ( $\frac{1}{2}$ MS) sesuai dengan tujuan. Penggunaan medium MS yang dimodifikasi ini bertujuan dalam diferensiasi unsur hara dengan tujuan tertentu. George (1996) dalam Zasari (2010) menyatakan medium Murashige dan Skoog

(MS) *full strength* maupun *half strength* ( $\frac{1}{2}$  MS) dengan atau tanpa zat pengatur tumbuh dapat digunakan untuk regenerasi PLBs tanaman anggrek menjadi planlet.

Pada medium  $\frac{1}{2}$  MS penggunaan unsur makro hanya diberikan setengah dari dosis medium MS yang biasa digunakan. Di era tahun 2000, protokol regenerasi tanaman *Phalaenopsis* menggunakan medium  $\frac{1}{2}$  nutrisi *Murashige and Skoog* (MS) yang ditambahkan 0-1 mg/l Thidiazuron dan 0-10 mg/l 2,4-*dichloropenoxyacetic acid* (2,4-D), sedangkan plb (*protocom like body*) dapat dibentuk dari kalus tersebut pada medium  $\frac{1}{2}$  MS yang ditambah Thidiazuron saja sebanyak 0,1-1 mg/l (Ying-Chun *et al.*, 2000). Park *et al.*, (2002b) dan Chowdhury *et al.*, (2003) juga melakukan perbanyakan cepat pada *phalaenopsis* menggunakan eksplan daun dari mata tunas tangkai bunga, namun medium yang digunakan lebih sederhana yaitu menggunakan  $\frac{1}{2}$  MS dan diberi tambahan BAP dan NAA untuk inisiasi.

Selain medium  $\frac{1}{2}$  MS, medium yang digunakan yaitu medium *New Dogashima Medium* (NDM) (Tokuhara dan Mii, 1993). NDM merupakan medium yang mengandung banyak komponen organik. Tokuhara dan Mii (1993) dalam Te-chato *et al.*, (2010) melaporkan bahwa NDM memberikan hasil terbaik dalam formasi pertumbuhan protocorm *Phalaenopsis*. Penelitian Te-chato *et al.*, (2010) menyatakan penggunaan NDM dapat mengubah struktur kalus nodular pada subkultur *Rhynchostylis rubrum* dalam kondisi cahaya kalus berubah menjadi hijau dan kemudian menghasilkan embrio somatik dewasa.

Selain unsur hara, pertumbuhan eksplan juga dipengaruhi oleh adanya zat pengatur tumbuh yaitu senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit

tetapi dapat mendukung, menghambat dan dapat mengubah proses fisiologis tumbuhan. Zat pengatur tumbuh dapat berupa auksin, giberelin, sitokinin, etilen, dan inhibitor. Diantara sekian banyak zat pengatur tumbuh, penggunaan auksin dan sitokinin yang paling banyak digunakan. Perbedaan konsentrasi auksin dan sitokinin akan mempengaruhi pada pertumbuhan, pembentukan serta perkembangan akar dan tunas eksplan. Pembentukan organ dipengaruhi oleh adanya keseimbangan antara auksin dan sitokinin (Katuuk, 1989).

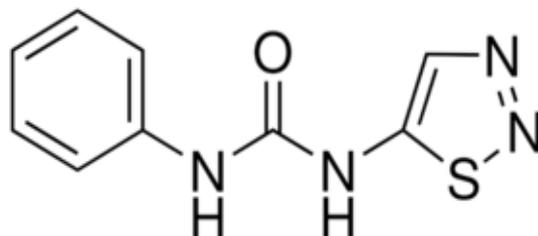
#### **D. ZPT 2,4-D dan Thidiazuron**

Zat Pengatur Tumbuh mempunyai peran yang sangat penting dalam mengatur pertumbuhan dan perkembangan eksplan dalam kultur jaringan. Pertumbuhan dan morfogenesis eksplan dalam kultur *in vitro* diatur oleh keseimbangan zat pengatur tumbuh pada medium dengan hormon endogen yang terdapat dalam eksplan. Menurut Gunawan (1987) penambahan zat pengatur tumbuh eksogen akan mengubah zat pengatur tumbuh endogen sel.

Menurut Raghavan (1986) dalam Lizawati (2012), auksin meningkatkan kuantitas sel-sel embriogenik dengan cara memacu pembelahan sel untuk membentuk massa proembriogenik, serta mencegah inisiasi pertumbuhan yang teratur pada sel-sel tersebut. 2,4-D merupakan auksin buatan. Menurut Bhojwani & Razdan (1996) dalam Lizawati (2012) ZPT 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman. Pertumbuhan kalus embriogenik tergantung pada genotipe dan komposisi medium yang digunakan. Hasil penelitian Hofmann *et*

*al.*, (2004) yang menunjukkan bahwa embriogenesis secara nyata dipengaruhi oleh genotipe, kandungan sukrosa, dan jenis auksin yang digunakan.

Thidiazuron (TDZ) telah memperoleh perhatian selama dekade terakhir karena perannya yang efisien dalam sel tanaman dan kultur jaringan. Beragam respon fisiologis yang diamati dalam menanggapi Thidiazuron aplikasi dalam spesies tanaman yang berbeda. Thidiazuron merupakan sitokinin sintetik yang kuat dengan rumus kimia  $C_9H_8N_4OS$  (Gambar 1). Thidiazuron merupakan senyawa kimia yang mempunyai sifat termolabil yaitu senyawa yang mampu berkerja pada suhu tertentu dan akan mengalami penurunan kualitas dan rusak pada suhu tinggi, sehingga penggunaan Thidiazuron sebaiknya dilakukan menggunakan *milipore* yang berfungsi sebagai penyaring cendawan yang menyebabkan terjadinya kontaminasi dan penggunaan Thidiazuron dilakukan di LAF.



**Gambar 1** Rumus Kimia Thidiazuron

Menurut Latip and Murdad (2010) medium yang menggunakan Thidiazuron sangat efektif dalam mendorong proliferasi bagian protocorm *P. Gigantea* setelah 80 hari kultur. Hasil penelitian Rosdiana (2010) menunjukkan bahwa penggunaan 1 mg/l Thidiazuron pada *Phalaenopsis amboinensis*

menunjukkan hasil terbaik terhadap waktu munculnya tunas, sedangkan konsentrasi 5 mg/l Thidiazuron memberikan hasil terbaik pada pengamatan jumlah daun. Menurut Rosdiana (2010) 1 mg/l Thidiazuron merupakan konsentrasi yang tepat yang dapat mendorong pembelahan sel meristematik pada bagian batang sehingga dapat memacu terbentuknya tunas dalam waktu yang relatif lebih cepat dibandingkan dengan penggunaan Thidiazuron pada konsentrasi lain, yang lebih rendah, ataupun lebih tinggi dari 1 mg/l. Chen, *et al.*,(2002) dalam Rosdiana (2010) menyatakan bahwa penggunaan tipe urea sitokinin seperti Thidiazuron sebagai substitusi BAP (*Benzilaminopurine*) terbukti meningkatkan kapasitas pembentukan tunas pada anggrek bulan.

Pada umumnya, Thidiazuron digunakan dalam konsentrasi yang rendah karena Thidiazuron memiliki efektivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan BA (Yusnita, 2004). Khawar *et al.*,(2003) dalam Rosdiana (2010) menyatakan bahwa penambahan Thidiazuron dalam konsentrasi yang rendah dapat meningkatkan jumlah pembentukan tunas. Rosdiana (2010) juga menunjukkan interaksi antara 2,4-D dengan Thidiazuron dimana hasil terbaik pada perlakuan 2 mg/l dan 2,5 mg/l pada pengamatan hari munculnya tunas *Phalaenopsis amboinensis*. Namun secara umum, interaksi cenderung memberikan reaksi antagonis terhadap pertumbuhan tunas bila dibandingkan dengan konsentrasi Thidiazuron.

Hasil penelitian Rosdiana (2010) menunjukkan bahwa perlakuan kontrol 2,4-D memberikan hasil terbaik pada pengamatan hari munculnya tunas dan jumlah daun *Phalaenopsis amboinensis*. Ekowahyuni (2002) melaporkan bahwa

auksin pada konsentrasi tinggi dapat menghambat pertumbuhan mata tunas untuk menjadi tunas absisi. Selain itu, Wetherel (1982) *dalam* Rosdiana (2010) telah menjelaskan bahwa penambahan auksin dalam jumlah yang lebih besar, atau penambahan auksin yang lebih stabil, seperti 2,4-D cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman.