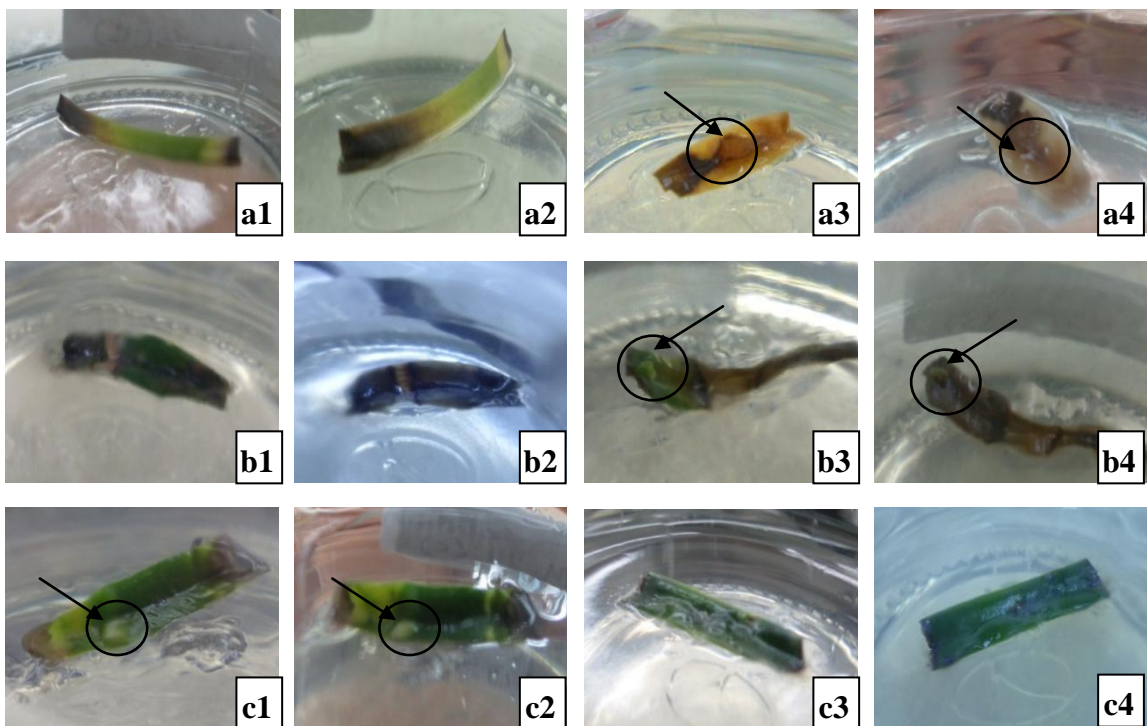


IV. HASIL ANALISIS DAN PEMBAHASAN

A. Kondisi Umum

Pertumbuhan eksplan *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis forma* Merapi atau anggrek Merapi pada pengamatan yang dilakukan tiap minggu menunjukkan adanya perubahan warna eksplan. Semua eksplan yang digunakan berwarna hijau pada saat inokulasi dilakukan. Eksplan mengalami perubahan warna yang disebabkan terjadinya *browning* mulai minggu kedua setelah tanam. Perkembangan eksplan setiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 Perkembangan eksplan pada setiap medium, (a1) $\frac{1}{2}$ MS + 0 mg/l Thidiazuron 6MST, (a2) $\frac{1}{2}$ MS + 0 mg/l Thidiazuron 8 MST, (a3) NDM + 0 mg/l Thidiazuron 6MST, (a4) NDM + 0 mg/L Thidiazuron 8 MST, (b1) $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/l Thidiazuron 6MST, (b2) $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/l Thidiazuron 8 MST, (b3) NDM + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/L Thidiazuron 6MST, (b4) NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron 8 MST, (c1) $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/l Thidiazuron 6MST, (c2) $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/l Thidiazuron 8 MST, (c3) NDM + 1 mg/l Thidiazuron 6MST, (c4) NDM + 1 mg/l Thidiazuron 8MST

Perubahan warna yang disebabkan oleh *browning* terjadi hampir pada semua perlakuan baik medium perlakuan $\frac{1}{2}$ MS maupun NDM (Gambar 2). *Browning* terjadi pada bagian tepi eksplan (Gambar 2.a1) yang disebabkan oleh luka yang berasal dari pemotongan eksplan dan terjadi pada semua perlakuan. Luka pada daun mengakibatkan meningkatnya aktivitas *Phenilalanin amonia liase* (PAL) yang kemudian merangsang sintesa senyawa fenolik dan diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim oksidase (PPO) sehingga mengakibatkan *browning* (Hutami, 2008). *Browning* akan menyebar ke semua bagian eksplan seperti ditunjukkan pada Gambar 2.b2.

Pertumbuhan *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis* dimulai dari terjadinya penggembungan pada permukaan eksplan yang teramati mulai minggu ke-4 (Gambar 2.a1) dan terus menunjukkan pembesaran dengan pembengkakan pada eksplan seperti pada Gambar 2.c1 dan Gambar 2.c2. Pembengkakan pada daun disebabkan oleh respon tanaman terhadap perlakuan, yaitu terjadinya imbibisi yang menunjukkan bahwa eksplan melakukan penyerapan air dan hara dari medium $\frac{1}{2}$ MS. Gill *et al.*, (2004) dalam Fibrianty (2013) menyampaikan bahwa pembengkakan eksplan pada tanaman memberikan indikasi adanya pemanjangan atau pembesaran sel yang disebabkan adanya auksin. Hal tersebut juga terjadi pada eksplan di medium NDM yang menunjukkan adanya pembengkakan dan pecah (Gambar 2 a3) serta munculnya kalus pada permukaan eksplan yang berbentuk bulir kecil (Gambar 2.b3).

Eksplan pada medium NDM mengalami vitrifikasi pada minggu ke-6 (Gambar 2. a4). Eksplan yang mengalami vitrifikasi ditandai dengan perubahan

warna eksplan menjadi putih bening. Vitrifikasi disebabkan oleh melemahnya jaringan eksplan dan potensial air dalam medium menyebabkan hilangnya kemampuan eksplan dalam menyerap unsur hara sehingga air masuk dan mengakibatkan terjadinya vitrifikasi yang ditandai dengan hilangnya kandungan sel-sel pada tanaman serta klorofil dalam eksplan dan kandungan air yang tinggi dalam eksplan. Menurut Agriani (2010) vitrifikasi merupakan abnormalitas pada tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* yang ditandai dengan kandungan air jaringan terlalu tinggi, sukulensi atau *translucency*.

Laju pertumbuhan eksplan anggrek *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* pada medium NDM dan ½ MS dengan penambahan Thidiazuron diketahui dari parameter pengamatan antara lain : persentase eksplan berkalus, persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning* dan vitrifikasi.

B. Persentase Eksplan Berkalus

Persentase eksplan berkalus menunjukkan adanya pengaruh perlakuan terhadap perkembangan eksplan yang diberikan. Perkembangan yang terjadi dalam penelitian ini yaitu munculnya pertumbuhan kalus pada eksplan pada beberapa medium perlakuan. Hasil pengamatan persentase eksplan berkalus ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Pengaruh Jenis Medium dengan Kombinasi Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Berkalus

Perlakuan	Persentase Eksplan Berkalus (%)
MS + 0 mg/l Thidiazuron	0
½ MS + 0,5 mg/l Thidiazuron	0
½ MS + 1 mg/l Thidiazuron	0
NDM + 0 mg/l Thidiazuron	7
NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron	7
NDM + 1 mg/l Thidiazuron	0

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan pertumbuhan kalus kecuali pada eksplan yang ditanam dalam medium NDM + 0 mg/l Thidiazuron (kontrol) dan NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron. Kalus tumbuh pada medium NDM kontrol Thidiazuron 2 MST, sedangkan pada perlakuan NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron kalus tumbuh setelah 6 MST.

Munculnya kalus pada medium NDM kontrol menunjukkan bahwa kandungan zat pengatur tumbuh 2,4-D dalam medium mampu menginduksi kalus pada eksplan. Zat pengatur tumbuh 2,4-D yang merupakan auksin kuat sehingga mampu merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat dibandingkan terjadinya *browning* pada eksplan sehingga eksplan dapat merespon zat pengatur tumbuh dan unsur hara yang terkandung dalam medium.

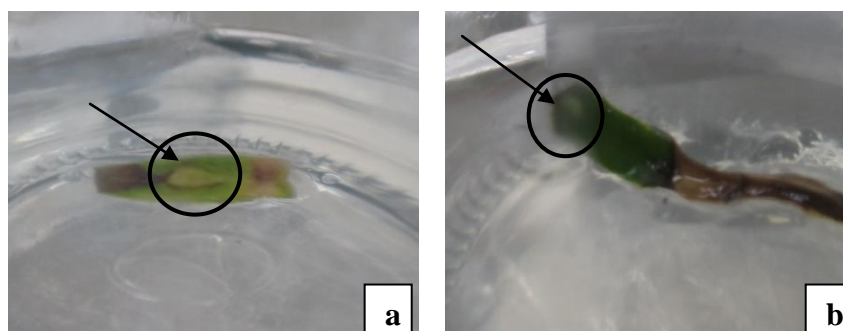
Menurut Endang *dkk.*, (2013) auksin yang terdapat pada 2,4-D menginisiasi pemanjangan sel dengan cara mempengaruhi pengendoran atau pelenturan dinding sel. Auksin akan memacu protein yang telah mengalami sintesis berupa *operon* (kombinasi antara gen struktural dan gen operator) yang aktif. *Operon* yang aktif menandakan dapat terjadinya transkripsi mRNA yang

kemudian akan mengarahkan transisi protein enzim ATP-ase. Transisi protein enzim ATP-ase yang ada di membran plasma sel tumbuhan untuk memompa ion H^+ ke dinding sel. Peristiwa ini akan menyebabkan lingkungan menjadi asam. Pada kondisi asam, enzim-enzim yang dapat memotong ikatan dinding sel akan teraktifkan, diantaranya *glukanase* yang akan menghidrolisis rantai utama *hemiselulosa*, *xylosidase* berperan dalam rantai cabang dari rantai utama *xyloglukan*, *transglukosidase* yang dapat memotong dan menggabungkan selulase dan pektinase yang akan menghidrolisis rantai penyusun pektin. Proses ini menyebabkan pelonggaran dinding sel sehingga sel tumbuhan kemudian memanjang akibat air yang masuk secara osmosis. Setelah pemanjangan ini, sel terus tumbuh dengan mensintesis kembali material dinding sel dan sitoplasma dan akan membentuk kalus yang merupakan kumpulan sel-sel yang telah berkembang.

Perlakuan NDM kontrol lebih cepat dalam merangsang pertumbuhan kalus dibandingkan dengan perlakuan dengan menggunakan Thidiazuron yaitu perlakuan NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron. Kecepatan berkalus pada medium NDM kontrol diduga pada perlakuan NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron eksplan mengalami *browning* sebagian sehingga berpengaruh terhadap respon perlakuan yang diberikan. Pertumbuhan kalus pada eksplan yang mengalami *browning* sebagian lebih lama tumbuh dibandingkan dengan NDM kontrol yang tidak mengalami *browning*.

Tumbuhnya kalus pada perlakuan NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron menunjukkan konsentrasi yang mampu memicu pertumbuhan kalus. Selain itu, kandungan 2,4-D yang terkandung dalam medium membantu memicu

pertumbuhan kalus, sehingga dalam hal ini perlakuan dengan penambahan 0,5 mg/l Thidiazuron merupakan perlakuan yang menunjukkan adanya interaksi antara Thidiazuron dengan 2,4-D pada medium sehingga mampu menginduksi kalus eksplan *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis*. Penggunaan kombinasi antara auksin dengan sitokinin akan meningkatkan proses induksi kalus (Litz *dkk.*, 1995 *dalam* Kartika *dkk.*, 2013). Sejalan dengan itu Yusnita (2004) *dalam* Rosdiana (2010) menyebutkan bahwa penggunaan auksin dan sitokinin serta nisbah antara keduanya yang seimbang akan memacu pembentukan kalus.



Gambar 3 (a) Kalus tumbuh dari bagian tulang daun pada medium NDM kontrol 2 MST (b) Kalus tumbuh dari bagian tepi daun pada medium NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron 6 MST

Pembentukan kalus pada medium NDM diduga karena NDM memiliki vitamin dan bahan organik yang lebih kompleks seperti asam-asam amino dan bahan organik lainnya yang mampu membantu dalam menginduksi kalus lebih cepat (lampiran II) dibandingkan dengan medium $\frac{1}{2}$ MS yang mengandung bahan organik lebih sedikit sehingga medium NDM yang digunakan dengan penambahan zat pengatur tumbuh mampu merangsang pertumbuhan kalus.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perkembangan kalus pada medium NDM tidak menunjukkan respon lagi pada pengamatan minggu ke-8.

Perkembangan eksplan berhenti pada 8 MST karena terjadinya *browning* pada eksplan yang ditandai dengan berubahnya warna eksplan menjadi hijau kecoklatan. *Browning* disebabkan oleh tingginya atau meningkatnya senyawa fenolik dalam eksplan *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang teroksidasi karena pemotongan eksplan sehingga mengakibatkan terjadinya *browning*. Tang dan Newton (2004) dalam Hutami (2008) menjelaskan bahwa pencoklatan jaringan sangat menurunkan regenerasi kultur kalus secara *in vitro*. Eksplan yang mengalami *browning* sebagian masih menunjukkan adanya pertumbuhan kalus (Gambar 3b). Tumbuhnya kalus pada eksplan yang mengalami *browning* sebagian menunjukkan bahwa eksplan masih mampu melakukan penyerapan unsur hara. Rineksane (2012) menyatakan bahwa eksplan daun *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang mengalami *browning* sebagian masih memiliki sel hidup yang dapat menyerap unsur hara dan senyawa organik dari medium sehingga dapat tumbuh menjadi kalus atau tunas baru.

Selain *browning*, faktor lain yang menyebabkan tidak terjadinya perkembangan pada kalus adalah respon dari tanaman *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang sangat lambat sehingga tidak terjadi perkembangan yang signifikan bahkan beberapa perlakuan hanya menunjukkan respon pembengkakan saja dan belum menunjukkan perkembangan kalus. Menurut Dwiyani (2013) 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 *suavisi* ni membutuhkan waktu kurang lebih 5 tahun setelah disemai untuk menghasilkan bunga pertama kali. Begitu pula

dengan perbanyakkan dengan menggunakan kultur *in vitro* dimana pertumbuhan *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* cukup lambat dalam pertumbuhan atau pembentukan kalus maupun tunas.

Kecepatan respon terhadap perlakuan yang diberikan pada eksplan *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis* cenderung lebih lama dibandingkan kecepatan *browning*. Kecepatan *browning* yang lebih tinggi mengakibatkan eksplan tidak mengalami pembentukan kalus yang disebabkan oleh terhambatnya proses penyerapan unsur hara sehingga perlakuan yang diberikan belum dapat direspon oleh eksplan.

C. Persentase Eksplan Hidup, *Browning* dan Vitrifikasi

Persentase eksplan hidup menunjukkan kemampuan eksplan untuk bertahan hidup dan beradaptasi terhadap medium tempat tumbuhnya. Persentase hidup dipengaruhi oleh persentase kontaminasi, persentase *browning* dan persentase vitrifikasi serta kemampuan eksplan dalam menyerap unsur hara maupun zat pengatur tumbuh pada medium. Eksplan yang mengalami *browning* dan vitrifikasi berlanjut menyebabkan kematian sel yang pada akhirnya persentase eksplan hidup menjadi rendah. Semua eksplan pada medium penelitian ini tidak mengalami kontaminasi sehingga persentase eksplan hidup tidak dihambat atau dipengaruhi oleh kontaminasi pada eksplan. Kontaminasi eksplan tidak terjadi karena eksplan yang digunakan merupakan daun steril yang berasal dari perbanyakkan kultur *in vitro* sehingga tanaman tidak mudah terkontaminasi. Penggunaan *Plant Preservative Mixture* (PPM) pada medium di penelitian ini juga membantu menghambat pertumbuhan patogen. Menurut Probowati (2011)

Plant Preservative Mixture (PPM) merupakan antibiotika sintetik yang memiliki spektrum luas sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif.

Selain PPM, betadin juga digunakan sebagai bahan sterilisasi saat pemotongan eksplan untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Sterilisasi merupakan bagian terpenting pada perbanyakan *in vitro*. Sandra dan Karyaningsih (2000) dalam Kartika dkk., (2013) menjelaskan sterilisasi merupakan proses untuk mematikan atau menonaktifkan spora dan mikroorganisme sampai ke tingkat yang tidak memungkinkan lagi berkembang biak atau menjadi sumber kontaminan selama proses perkembangan berlangsung. Betadine merupakan desinfektan yang mengandung senyawa aktif *Povidone Iodine* 10%. Penggunaan betadine tiga tetes yang dilarutkan dalam aquadest steril dapat membantu dalam menghambat terjadinya kontaminasi akibat jamur yang menghambat pertumbuhan eksplan *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis*. Hasil pengamatan persentase hidup, persentase *browning* dan vitrifikasi disajikan pada tabel 2.

Tabel 2 Pengaruh Jenis Medium dengan Kombinasi Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Hidup, Persentase *Browning*, dan Persentase Vitrifikasi Anggrek *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* pada 8 MST

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)	Persentase <i>Browning</i> (%)	Persentase Vitrifikasi (%)
½ MS + 0 mg/l Thidiazuron	7	93	93
½ MS + 0,5 mg/l Thidiazuron	13	87	73
½ MS + 1 mg/l Thidiazuron	40	60	60
NDM + 0 mg/l Thidiazuron	0	100	100
NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron	33	67	53
NDM + 1 mg/l Thidiazuron	27	67	60

Data pada tabel 2 menunjukkan hubungan yang sangat erat dan saling terkait antara persentase *browning* dan vitrifikasi terhadap persentase eksplan hidup.

a. Persentase Eksplan Hidup

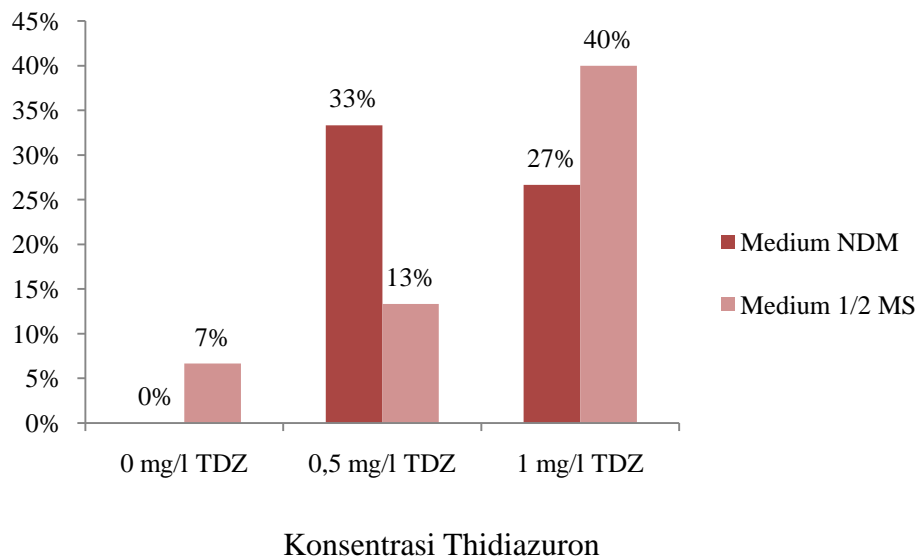
Eksplan yang ditanam pada semua perlakuan medium dengan penambahan zat pengatur tumbuh menghasilkan persentase eksplan hidup < 50 %. Rendahnya persentase eskplan hidup dalam kultur *in vitro* tidak berpengaruh terhadap keberhasilan penelitian. Persentase eksplan hidup rendah (tabel 2), meskipun demikian, eksplan masih memberikan respon terhadap perlakuan yang diberikan. Persentase eksplan hidup merupakan jumlah eksplan yang hidup dan tidak mengalami *browning* maupun vitrifikasi. Persentase *browning* dan persentase vitrifikasi yang tinggi mengakibatkan semakin kecil persentase eksplan hidup (tabel 2). Hal ini disebabkan oleh hilangnya kemampuan eksplan dalam penyerapan unsur hara karena eksplan mengalami *browning*.

Persentase eksplan hidup yang rendah dalam penelitian ini disebabkan oleh adanya penghambat pertumbuhan eksplan. Penghambat pertumbuhan eksplan tersebut terjadi akibat kandungan fenolik yang kuat pada eksplan *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang menyebabkan terjadinya *browning* sehingga menghambat pertumbuhan dan menyebabkan terjadinya kematian pada eksplan. Kandungan fenolik yang terkandung pada eksplan dipicu oleh aktivitas *Phenilalanin amonia liase* (PAL) yang disebabkan pelukaan pada eksplan yang kemudian senyawa fenol teroksidasi oleh

oksigen melalui enzim PPO dan mengakibatkan *browning*. Selain *browning*, eksplan juga mengalami vitrifikasi sehingga eksplan yang mengalami *browning* tidak mampu untuk melakukan *recovery* dan mengakibatkan kematian.

Eksplan yang hidup ditandai dengan warna eksplan yaitu berwarna hijau atau hijau muda dan tidak mengalami kontaminasi. Pada penelitian ini tanaman *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* yang hidup hanya bisa dilihat dari warna daun, terjadinya pembengkakan eksplan, serta tumbuhnya kalus. Hal ini karena pertumbuhan eksplan lambat sehingga persentase eksplan hidup hanya dapat dilihat dari warna eksplan saja.

Kandungan senyawa dalam medium sangat menentukan persentase hidup eksplan. Penggunaan medium yang berbeda akan berpengaruh terhadap kandungan unsur hara dan bahan organik yang terkandung di dalamnya. Selain medium, penambahan zat pengatur tumbuh juga berpengaruh dalam merangsang pertumbuhan eksplan. Satyavathi *et al.*,(2004) dalam Fibriyanty (2013) menyatakan bahwa proses pembentukan organ seperti tunas atau akar dipengaruhi oleh interaksi antara zat pengatur tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam medium dengan zat pengatur tumbuh endogen yang diproduksi oleh jaringan tanaman. Persentase eksplan hidup *V.tricolor* Lindl. varietas *suavis* pada penelitian ini disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh Jenis Medium dengan Kombinasi Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Hidup pada 8 MST

Berdasarkan Gambar 4, persentase eksplan hidup mencapai 0-40%. persentase eksplan hidup pada medium NDM + 0 mg/l Thidiazuron (kontrol) merupakan persentase terendah dan kemudian mengalami kenaikan *trend* pada konsentrasi NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron, namun *trend* kembali menurun pada konsentrasi NDM + 1 mg/l Thidiazuron. Berbeda dengan persentase eksplan hidup, pada medium ½ MS menunjukkan adanya *trend* yang terus meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi Thidiazuron. Persentase eksplan hidup pada medium ½ MS menunjukkan persentase tertinggi dibandingkan dengan persentase pada medium NDM, hal ini diduga oleh kandungan dari medium MS yang memiliki kandungan unsur hara makro dan mikro yang tinggi (lampiran I) yang membantu dalam menekan terjadinya *browning*. Ahmad *et al.*, (1995) dalam Hutami (2008) menyatakan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk pencoklatan *Pistacia vera* dipengaruhi

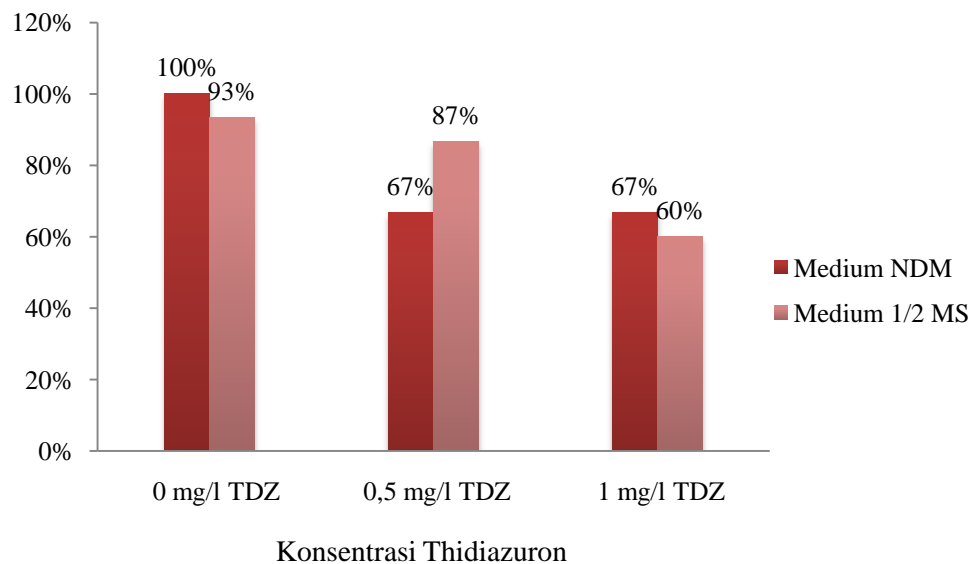
oleh konsentrasi dan kombinasi zat pengatur tumbuh dalam medium induksi. Induksi kalus dalam medium yang mengandung NAA (2 atau 5 mg/l) atau NAA (5 mg/l)+ kinetin (2,5 mg/l) dapat mempertahankan kalus tetap putih kehijauan selama 10-13 minggu.

Persentase eksplan hidup dalam penelitian ini tidak ditentukan dari jenis medium yang digunakan. Hal ini disebabkan oleh kecepatan *browning* yang lebih cepat dibandingkan proses penyerapan unsur hara yang ada pada medium sehingga eksplan tidak mengalami pembentukan kalus dan mengalami kematian. Faktor yang mempengaruhi persentase eksplan hidup salah satunya adalah persentase *browning*.

b. Persentase Eksplan *Browning*

Pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* dapat dihambat dengan terjadinya *browning*. Hasil penelitian ini menunjukkan terjadinya *browning* yang disebabkan oleh senyawa fenolik yang teroksidasi melalui aktivitas enzim *polifenol oksidase*. Pencoklatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti *polifenol oksidase* dan *tirosinase* (Lerch, 1981 dalam Hutami, 2008). Salah satu penyebab utama pencoklatan dalam kultur *in vitro* adalah luka karena pemotongan pada jaringan. Luka tersebut memacu aktivitas *Phenilalanin amonia liase* (PAL) yang memicu produktivitas senyawa fenolik (Hutami, 2008). Sejalan dengan itu Rineksane (2012) menyatakan bahwa pertumbuhan eksplan kultur *in vitro* dapat dihambat oleh senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh eksplan karena

bereaksi dengan oksigen yang mengakibatkan pencoklatan atau *browning* pada permukaan eksplan.



Gambar 5 Pengaruh Jenis Medium dengan Kombinasi Thidiazuron terhadap Persentase *Browning* pada 8 MST

Hasil penelitian ini menunjukkan persentase *browning* mencapai 60-100% (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan daun muda yang berasal dari tunas sebagai eksplan memiliki kandungan fenolik yang tinggi sehingga menyebabkan terjadinya *browning* pada eksplan. Menurut Dwiyani *dkk.*, (2012) permasalahan yang spesifik dimiliki dengan riset *V. tricolor* Lindl. varietas *suavis* di laboratorium yaitu seringkali terjadi pencoklatan (*browning*) dengan intensitas yang tinggi pada eksplan karena kandungan fenolik yang relatif tinggi pada jaringan tanaman sehingga memicu terjadinya pencoklatan tersebut.

Pada penelitian ini *browning* terjadi pada setiap perlakuan. Persentase *browning* tertinggi terjadi pada medium NDM mengandung 0 mg/l Thidiazuron (kontrol). Hasil analisis menunjukkan bahwa penggunaan

Thidiazuron dalam medium dapat membantu mencegah terjadinya *browning*, hal ini dapat dilihat pada data yang ditampilkan pada Gambar 5 yang menunjukkan bahwa medium yang menggunakan Thidiazuron pada medium $\frac{1}{2}$ MS dan NDM mengalami persentase *browning* yang lebih rendah dibandingkan dengan medium yang tidak menggunakan Thidiazuron. *Browning* yang terjadi pada setiap perlakuan menunjukkan adanya *trend* yang sama antara kedua medium $\frac{1}{2}$ MS dan NDM dimana *browning* mengalami penurunan seiring peningkatan konsentrasi Thidiazuron. Yelnitis dan Komar (2010) menyatakan bahwa penggunaan 2,4-D yang dikombinasikan dengan Thidiazuron yang mempunyai daya aktif tinggi menyebabkan kandungan zat pengatur tumbuh di dalam jaringan meningkat. Peningkatan Zat pengatur tumbuh dalam medium diduga mampu menghambat terjadinya *browning*.

Browning pada eksplan dapat menghambat pertumbuhan eksplan karena terhambatnya penyerapan unsur hara sehingga eksplan tidak mampu tumbuh. Sukmadjaja dan Mariska (2003) mengemukakan oksidasi senyawa fenolik dapat menghambat dan bersifat toksik bagi pertumbuhan eksplan, serta mengakibatkan kematian eksplan. Menurut Sabar (2013) pembentukan tunas secara normal terjadi pada eksplan yang bebas dari kontaminasi dan *browning*, tunas yang berkembang secara normal memiliki kandungan klorofil yang lebih tinggi yang disebabkan oleh penyerapan unsur hara yang sempurna. Hal itu sama seperti Haris *et al.*, (2011) dalam Sabar (2013) eksplan karet dengan warna daun yang lebih hijau memiliki kandungan klorofil yang lebih tinggi. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh

Syammiah (2006) dalam Sabar (2013) yang mengamati *protocorm like bodies* (PLB) *dendrobium* yaitu PLB mengalami perubahan warna menjadi hijau kekuningan karena proses penyerapan unsur hara yang ditambahkan berupa 0,2% ekstrak ragi dan 15% air kelapa berjalan dengan lambat dan PLB tidak mampu untuk membentuk klorofil.

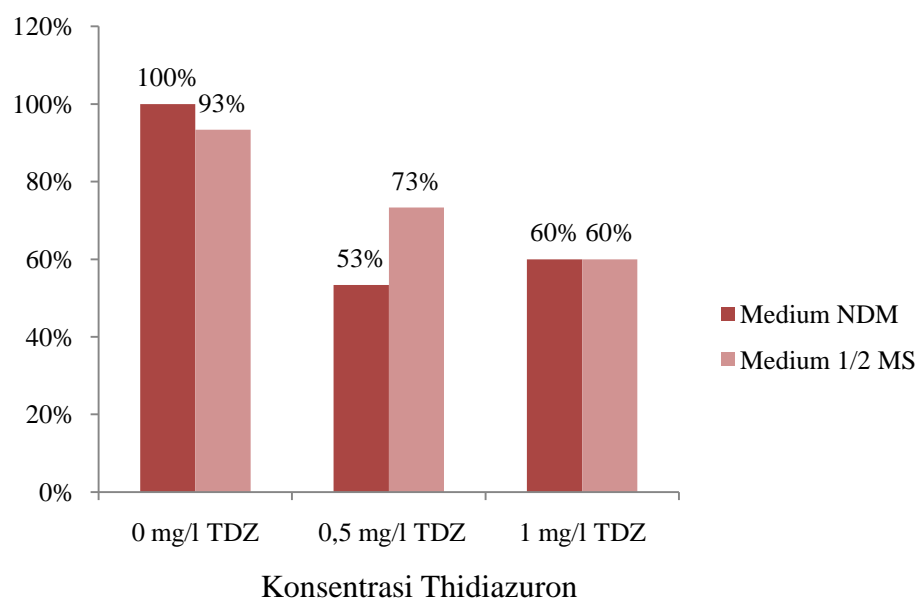
Eksplan yang mengalami *browning* akan mempengaruhi persentase eksplan vitrifikasi yang ditandai dengan berubahnya warna eksplan menjadi putih transparan. Eksplan yang telah *browning* tidak mampu berkembang sehingga kandungan air yang tinggi pada medium masuk ke dalam eksplan sehingga mengakibatkan terjadinya vitrifikasi.

c. Persentase Eksplan Vitrifikasi

Vitrifikasi yang terjadi dalam penelitian ini sangat tinggi yaitu 50-100% (Gambar 6), tingginya tingkat vitrifikasi ini mengakibatkan kematian pada eksplan yang tinggi. Phan *et al.*, (1986) dalam Karyanti *dkk.*, (2013) menyatakan bahwa penyebab dasar terjadinya vitrifikasi terletak pada potensial air di dalam jaringan tanaman, konsentrasi agar ataupun sitokinin yang digunakan. Sejalan dengan itu Yusnita (2003) dalam Fitriani (2008) juga menyebutkan bahwa vitrifikasi sering disebabkan oleh terlalu tingginya konsentrasi sitokinin, terlalu rendahnya konsentrasi agar, dan tingginya konsentrasi ion amonium.

Vitrifikasi yang terjadi pada umumnya berhubungan dengan eksplan yang mengalami *browning*. Eksplan yang *browning* akan mengalami vitrifikasi. Vitrifikasi umumnya terjadi pada 2-4 minggu setelah eksplan

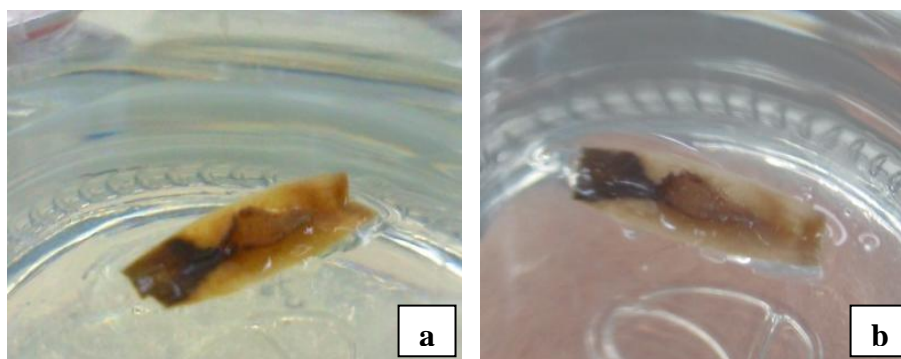
mengalami *browning*. Tingginya kandungan fenolik yang menyebabkan terjadinya *browning* pada eksplan mengakibatkan menurunnya kemampuan eksplan dalam melakukan pertumbuhan dan potensial air yang terkandung dalam medium menyebabkan terjadinya vitrifikasi yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi kebeningan. Persentase eksplan yang mengalami vitrifikasi dapat dilihat pada data yang disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6 Pengaruh Jenis Medium dengan Kombinasi Thidiazuron terhadap Persentase Vitrifikasi pada 8 MST

Data pada Gambar 6 menunjukkan adanya *trend* yang terus menurun pada perlakuan dengan penggunaan Thidiazuron. Semakin tingginya persentase *browning* akan mempengaruhi persentase vitrifikasi. Melemahnya jaringan pada eksplan yang disebabkan oleh *browning* (Gambar 7a) dan potensial kandungan air pada medium mengakibatkan air akan bergerak masuk ke dalam eksplan dengan intensitas yang tinggi sehingga

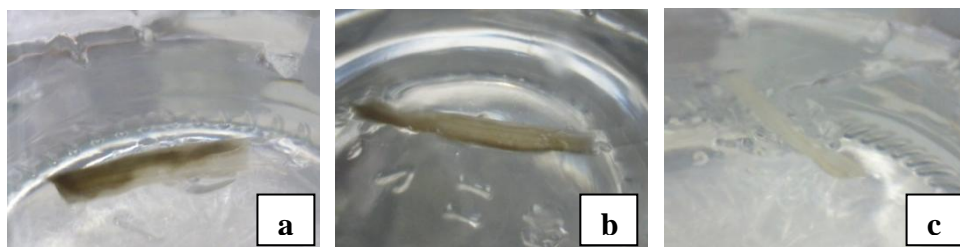
mengakibatkan hilangnya kandungan sel-sel tanaman yang mengakibatkan eksplan tidak dapat berkembang dan mengalami kematian. Potensial air yang terkandung dalam medium dan melemahnya jaringan eksplan yang diakibatkan oleh *browning* menyebabkan terjadinya peristiwa difusi dalam intensitas yang tinggi. Molekul air akan bergerak melewati membran sel menuju bagian dalam sel. Konsentrasi air di bagian luar sel yang lebih tinggi dan terlalu tinggi dibandingkan dengan konsentrasi air pada bagian dalam sel menyebabkan air cenderung bergerak ke dalam sel melalui membran sel dalam intensitas yang sangat tinggi dan mengakibatkan hilangnya kandungan sel pada eksplan (Gambar 7b).



Gambar 7 Pengaruh Jenis Medium dengan Kombinasi Thidiazuron terhadap Persentase Vitifikasi pada 6 MST

Melemahnya jaringan eksplan yang disebabkan oleh *browning* dan potensial air dalam medium mengakibatkan terjadinya vitifikasi dan mengakibatkan hilangnya klorofil dan kandungan sel tanaman dalam eksplan sehingga kemampuan eksplan dalam melakukan penyerapan unsur hara menjadi berhenti yang mengakibatkan eksplan tidak mampu tumbuh dan mengakibatkan eksplan menjadi mati.

Eksplan yang mengalami vitrifikasi tidak sepenuhnya diawali dengan *browning* pada eksplan. Sebagian kecil eksplan mengalami vitrifikasi secara langsung dimana eksplan yang berwarna hijau akan berubah menjadi putih transparan. Seperti halnya vitrifikasi terjadi pada eksplan yang mengalami *browning*, vitrifikasi yang terjadi secara langsung juga disebabkan oleh kandungan air yang cukup tinggi pada medium seperti tampak pada Gambar 8.



Gambar 8 a. Awal terjadinya Vitrifikasi Eksplan pada medium NDM 4 MST b. Eksplan Mengalami Vitrifikasi Sebagian pada Medium NDM 5MST c. Eksplan Mengalami Vitrifikasi secara Penuh pada Medium NDM 6 MST