

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Anggrek *Vanda tricolor*

Anggrek genus vanda merupakan anggrek dengan variasi bentuk dan warna yang banyak. Dengan demikian, anggrek ini diklasifikasikan menjadi 40 spesies yang keberadaannya tersebar mulai dari India bagian timur, Sri Lanka, Myanmar, Thailand, Indochina, Filipina, Malaysia, Papua Nugini, Indonesia hingga Australia. Dari ke-40 spesies yang ada, sekitar 20 spesies berada di kepulauan Indonesia yang menyebar di hutan-hutan tropis di Pulau Jawa, Bali, Sumatra, Kalimantan, Maluku dan Papua (Hardjo, 2017).

Anggrek *Vanda tricolor* merupakan spesies anggrek endemik di kawasan lereng Gunung Merapi. Di Indonesia sendiri, anggrek *Vanda tricolor* dapat tumbuh baik pada ketinggian 800-1.700 mdpl, khususnya di hutan yang cukup terbuka. Namun demikian, spesies ini mampu beradaptasi baik seperti pada saat fase berbunga dengan sempurna pada ketinggian 200-300 mdpl.

Anggrek *Vanda tricolor* memiliki batang bundar, panjang dan kokoh. Tinggi tanaman dapat mencapai 2 m, daun berbentuk pita agak melengkung dengan ujung daun rumpang bersudut tajam dengan lebar sekitar kurang lebih 3 cm dan panjang mencapai 45 cm yang tersusun saling bergantian pada batang yang tumbuh tegak. Tandan bunga dapat mencapai ukuran 50 cm yang menyangga 10 – 20 kuntum bunga, dimana kuntum – kuntum bunga ini tumbuh dari ketiak daun. Sepal dan petal bunga anggrek *Vanda tricolor* memiliki warna dasar antara putih dan kuning dengan corak totol berwarna coklat hingga kuning, dengan totol-totol merah keunguan. Bunga anggrek *Vanda tricolor* berbau harum,

aroma harum ini sangat dipengaruhi oleh ketinggian tempat hidupnya, di dataran tinggi aromanya sangat kuat dan semakin turun ke dataran yang lebih rendah maka aromanya akan semakin berkurang. Diameter bunga anggrek *Vanda tricolor* dapat mencapai ukuran 10 cm, serta bunga dapat bertahan hingga 20-25 hari (Metusala, 2006).

Secara umum, klasifikasi anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* menurut Dressler dan Dodson (1960) adalah sebagai berikut : Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta Sub Divisi : Angiospermae Kelas : Monocotyledoneae  
Ordo : Orchidales Familia : Orchidaceae Genus : *Vanda* Spesies : *Vanda tricolor*  
Lindl. var. *Suavis*.

Perbanyakan tanaman anggrek sendiri sebenarnya dapat dilakukan secara generatif maupun vegetatif. Perbanyakan secara vegetatif dilakukan dengan *repotting* (pemisahan rumpun) dan *kultur in vitro*, sedangkan perbanyakan secara generatif yaitu dengan menggunakan biji. Namun, perkembangbiakan secara generatif membutuhkan waktu yang lama karena embrio atau biji anggrek bukan merupakan biji yang sempurna dan tidak mempunyai cadangan makanan untuk pertumbuhan embrionya. Oleh karena itu, untuk mengecambahkan atau menumbuhkan biji anggrek mempunyai tingkat kesulitan yang tinggi (Susilo, 1990) dalam Handayani dan Isnawan, (2015). Dengan demikian, perbanyakan tanaman anggrek melalui kultur *in vitro* merupakan teknik perbanyakan yang lebih tepat.

## **B. Kultur *In vitro***

Kultur *in vitro* sendiri merupakan teknik mengisolasi bagian tanaman, kemudian menumbuhkannya dalam media buatan yang mengandung nutrisi lengkap di lingkungan yang steril sehingga bagian tanaman tersebut tumbuh menjadi tanaman sempurna (George, 1993).

Menurut Nursyami (2010), perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro* ini mempunyai keunggulan seperti: (a) tingginya homogenitas tanaman, (b) tingginya vigor tanaman, dan (c) memiliki genetik yang sama dengan induknya. Penggunaan bibit hasil kultur *in vitro* juga akan mengurangi biaya pemeliharaan seperti penyulaman dan umur produksinya lebih singkat. Namun, teknik kultur jaringan juga mempunyai beberapa kelemahan misalnya munculnya variasi somaklonal yang akan menyebabkan penyimpangan fenotip dari sifat genetik tanaman induknya. Hal ini terjadi karena subkultur yang berlebihan serta organogenesis tidak langsung (perbanyakan dari kalus) serta konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan terlalu tinggi (Mariska *et al.*, 1992). Masalah lain yang banyak dihadapi dalam aplikasi teknik kultur *in vitro* khususnya di Indonesia adalah modal investasi awal yang cukup besar dan masih terbatasnya sumberdaya manusia yang menguasai dan terampil dalam bidang kultur *in vitro*.

Menurut Nursyami (2010), tahapan dalam perbanyakan dengan kultur *in vitro* meliputi :

1. Tahap inisiasi, adalah tahap awal kultur yang bertujuan untuk mendapatkan eksplan yang bebas mikroorganisme serta inisiasi pertumbuhan baru.
2. Tahap multiplikasi atau biasa disebut tahap perbanyakan, tunas tunas yang tumbuh dari hasil induksi diperbanyak dengan cara memotong setiap ruas dan menanamnya pada media perbanyakan.
3. Tahap perakaran, yang memiliki tujuan untuk pembentukan akar dan pembentukan plantlet yang mandiri serta pucuk tanaman yang cukup kuat hingga dapat bertahan hidup sampai saat dipindahkan dari lingkungan *in-vitro* ke lingkungan alamiahnya. Tunas-tunas hasil multiplikasi yang belum mempunyai akar dipindahkan ke media yang mengandung lebih banyak auksin.
4. Tahap aklimatisasi, yang merupakan tahap akhir dari kultur jaringan tanaman adalah tahap aklimatisasi. Aklimatisasi dapat didefinisikan sebagai proses penyesuaian suatu organisme untuk beradaptasi pada lingkungan yang baru. Proses aklimatisasi sangat penting karena akan menentukan apakah tanaman yang berasal dari *in vitro* dapat beradaptasi atau tidak pada kondisi *in-vivo*.

Keberhasilan kultur *in vitro* sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti bahan tanam (eksplan), medium tumbuh, dan Zat Pengatur Tumbuh.

### 1. PLB (*Protocorm Like Bodies*)

Bahan tanam dalam kultur *in vitro* biasa disebut eksplan, yaitu bagian dari tanaman yang digunakan sebagai bahan untuk inisiasi suatu kultur (Vidyasagar, 2006). Dalam teknik kultur *in vitro*, semua bagian tanaman yang bebas mikroorganisme dapat dicoba sebagai eksplan, walaupun demikian tidak semua jaringan tanaman mudah ditumbuhkan (Wareing dan Phillips, 1976).

Menurut Hartmann *et al.*, (1990), hal yang harus diperhatikan dalam memilih bahan eksplan untuk kultur adalah ukuran eksplan, umur fisiologinya, dan organ yang menjadi sumber bahan tanaman. Ukuran eksplan ini akan mempengaruhi keberhasilan pertumbuhan planlet. Tunas dengan ukuran besar lebih tahan pada saat dipindahkan ke dalam kondisi kultur, pertumbuhannya lebih cepat serta menghasilkan lebih banyak mata tunas. Adapun kelemahan dari penggunaan eksplan yang berukuran besar adalah sulit mendapatkan kultur yang aseptik serta akan memerlukan bahan tanaman yang lebih banyak.

Embrio somatik tanaman anggrek lebih dikenal dengan nama *Protocorm like bodies* (PLB). Produksi PLB adalah salah satu metode yang digunakan dalam perbanyakan anggrek secara cepat. Hal ini karena PLB termasuk ke dalam jaringan meristematik yang masih aktif membelah. Gunawan (1992), menyebutkan bahwa PLB merupakan struktur seperti *corm*, yang memiliki karakter pembelahan sel yang cepat dengan kutub bipolar yang akan terinduksi menjadi tunas dan akar, sehingga akan berkembang menjadi planlet dalam jumlah yang banyak dan waktu yang cepat.

PLB berasal dari persemaian biji anggrek yang berbentuk seperti bulatan-bulatan berwarna hijau muda. Terbentuknya PLB ini mengindikasikan bahwa biji

anggrek yang awalnya tidak memiliki endosperm telah berkecambah. Di dalam PLB sendiri memiliki calon tunas dan calon akar yang jika ditumbuhkan dalam kondisi yang tepat akan mengalami pertumbuhan menjadi tanaman utuh.

## **2. Media Kultur *In Vitro***

Keberhasilan perbanyakan maupun perkembangbiakan tanaman dengan metode kultur *in vitro* secara umum sangat tergantung pada jenis medium yang digunakan. Menurut Gunawan (1992), ada tiga penggolongan medium tumbuh, yaitu medium padat, semi padat dan cair. Unsur-unsur hara yang terkandung dalam ketiga media tersebut sama, namun yang membedakan adalah penggunaan pematat berupa agar pada media padat dan semi padat.

Pemilihan media kultur *in vitro* ini tergantung pada spesies tanaman, jaringan atau organ yang akan digunakan dan tujuan dilakukannya kultur *in vitro* tanaman. Pada proses perakaran, akan lebih baik dilakukan pada media padat. Pembentukan bagian tanaman (morfogenesis) langsung maupun tidak langsung juga akan tergantung pada jenis dan konsentrasi yang tepat dari senyawa organik, anorganik dan zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam suatu media kultur. Sementara media cair umumnya digunakan untuk keperluan suspensi sel, keperluan isolasi dan fusi protoplas.

Komposisi medium yang digunakan dalam kultur *in vitro* dapat berbeda. Perbedaan komposisi medium ini dapat mengakibatkan perbedaan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Beberapa media yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* adalah MS (*Murashige dan Skoog*), VW (*Vacin and Went*), dan NDM (*New Dogashima Medium*).

### a. Media MS

Media *Murashige & Skoog* (MS) merupakan perbaikan komposisi media Skoog, terutama kebutuhan garam anorganik yang mendukung pertumbuhan optimum pada kultur *in vitro* tembakau. Media MS mengandung 40 mM Nitrogen dan 29 mM Nitrogen dalam bentuk  $\text{NH}_4^+$ . Kandungan lainnya berupa Kalium 20 mM dan Fosfor 1,25 mM (Erwin dalam Sutriani, 2014). Pertama kali unsur-unsur makro dalam media MS dibuat untuk kultur kalus tembakau, namun komposisi pada media MS ini sudah umum digunakan untuk kultur *in vitro* jenis tanaman lain, termasuk anggrek karena memiliki kandungan nitrogen yang lebih tinggi.

Seperti dalam penelitian yang telah dilakukan oleh Pasanda, (2016). Penelitian ini menggunakan anak semai anggrek hibrida *Phalaenopsis* Sogo Yokidian, yang dilakukan secara *in vitro*. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa media MS memberikan respon terbaik terhadap pertumbuhan tinggi anak semai, panjang daun, panjang akar, jumlah daun, jumlah akar, dan berat segar individu anggrek hibrida *Phalaenopsis* dibandingkan dengan media Knudson C.

### b. Media VW

Media VW (*Vacin and Went*) digunakan pertama kali oleh Knudson (1922), yang menemukan penambahan 7,6 mM  $\text{NH}_4^+$  disamping 8,5 mM  $\text{NO}_3$ , sangat baik untuk perkecambahan dan pertumbuhan biji anggrek. Penambahan  $\text{NH}_4^+$  ternyata dibutuhkan untuk perkembangan *protocorm*. Selain itu, Bey dkk (2006) melaporkan bahwa penggunaan media VW yang ditambahkan ZPT

jenis giberelin dapat mempercepat pembentukan *Protocorm Like Bodies* (PLB) pada tanaman anggrek.

Penelitian pada kultur *in vitro* anggrek dengan menggunakan media VW telah banyak dilakukan. Salah satu contohnya adalah penelitian oleh Rupawan, dkk., (2014), yang menggunakan planlet anggrek dengan perlakuan media MS dan VW serta ZPT giberelin yang dikombinasi dengan air kelapa. Hasil penelitian menunjukkan komposisi media VW yang ditambahkan 2 ppm giberelin dan 250 mL air kelapa per liter media lebih sesuai bagi pertumbuhan anggrek bulan. Rata-rata tinggi planlet, jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar anggrek bulan yang tumbuh pada komposisi media tersebut masing-masing 1,82 cm, 2,55 tunas, 2,00 helai daun dan 2,25 helai akar per planlet.

Penelitian media VW pada anggrek *Vanda tricolor* dilakukan oleh Rineksane dan Sukarjan (2015). Penelitian ini menggunakan potongan daun anggrek *V. tricolor* yang sudah pernah berbunga dan ditumbuhkan pada rumah kaca. Hasil penelitian menunjukkan belum terbentuknya kalus pada 6 Minggu setelah tanam meskipun dalam perlakuan, ditambahkan ZPT berupa BAP dan NAA.

### **c. Media NDM**

Media NDM (*New Dogashima Medium*) merupakan medium yang mengandung banyak komponen organik. Penelitian mengenai media NDM sebagai media untuk kultur *in vitro* sebelumnya telah dilakukan oleh Tokuhara dan Mii (1993). Dari hasil penelitian, didapatkan lebih dari 10.000



PLB pada angrek *Phalaenopsis* dan *Doritaenopsis* selama 1 tahun dengan mengkulturkan eksplan potongan pucuk.

Penelitian angrek *Vanda tricolor* dengan menggunakan media NDM secara kultur *in vitro* telah dilakukan oleh Rineksane dan Sukarjan (2015). Penelitian ini menggunakan medium yaitu  $\frac{1}{2}$  MS dan NDM dengan penambahan thidiazuron dengan konsentrasi 0 mg/l, 0,5 mg/l serta 1 mg/l. Hasil penelitian Rineksane dan Sukarjan (2015) ini menunjukkan bahwa medium NDM dengan penambahan Thidiazuron mampu menghasilkan kalus angrek Merapi. Medium NDM dengan penambahan 0,5 mg/l Thidiazuron merupakan perlakuan terbaik dalam menginduksi kalus angrek *Vanda tricolor*.

Penelitian lain menggunakan media NDM dilakukan oleh Rahim, dkk. (2009) yang meneliti angrek endemik Sulawesi Selatan yaitu *Phalaenopsis amboinensis*, dengan menggunakan PLB. Perlakuan yang digunakan adalah medium NDM dan ZPT berupa NAA serta TDZ. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan TDZ 1,0 mg/l tanpa penambahan 2,4-D merupakan konsentrasi terbaik untuk mendorong inisiasi multiplikasi tunas dan daun. Terdapat indikasi bahwa penggunaan 2,4-D menekan efek TDZ bila penggunaannya dikombinasikan.

### **3. Zat Pengatur Tumbuh**

Faktor terakhir yang mempengaruhi keberhasilan kultur *in vitro* adalah ZPT. Zat pengatur tumbuh adalah senyawa organik yang dalam konsentrasi rendah mampu mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah

pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Gunawan (1988) mengatakan bahwa dalam kultur jaringan, dua golongan zat pengatur tumbuh yang sangat penting adalah sitokinin dan auksin.

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologis tumbuhan (Abidin, 1990). Zat pengatur tumbuh dalam teknik kultur jaringan memberikan pengaruh sangat nyata. Zurkarnain (2009) menyatakan bahwa sangat sulit untuk menerapkan teknik kultur jaringan pada upaya perbanyakan tanaman tanpa melibatkan zat pengatur tumbuh. Dalam kultur *in vitro* dua golongan zat pengatur tumbuh yang sangat penting adalah sitokinin dan auksin.

#### **a. Thidiazuron**

Thidiazuron atau yang sering disingkat menjadi TDZ merupakan salah satu contoh ZPT golongan sitokinin. Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang mempengaruhi dan mendorong pembelahan sel dan memperlambat proses penghancuran butir-butir klorofil pada daun yang terlepas dari tanaman. Sitokinin juga berperan dalam perkembangan dominasi apikal, perkembangan tunas adventif dan diferensiasi tunas.

TDZ merupakan senyawa yang dapat diserap secara langsung dari medium oleh eksplan atau tanaman *in vitro*. Oleh karena pengaruhnya yang sangat kuat, hormon ini digunakan dalam konsentrasi yang rendah dibanding jenis sitokinin yang lain. Selain itu penelitian lainnya membuktikan bahwa TDZ sebagai salah satu senyawa Phenylurea sintetik (Hamidah *et al.*, 1997),

yang mana ZPT ini banyak menentukan dalam inisiasi kalus (Singh dan Syamal, 2001).

Thidiazuron pertama kali diperkenalkan pada tahun 1976 Oleh Schering. Thidiazuron berpotensi memacu frekuensi regenerasi pada kacang tanah (*Arachis hipogaea*) secara *in vitro*, dan memacu pembentukan tunas adventif pada beberapa jenis tumbuhan (Huetterman dan Prece, 1993) karena dapat menginduksi proses pembelahan sel secara cepat pada kumpulan sel meristem sehingga terbentuk primordia tunas (George dan Sherington, 1984). Thomas dan Katterman (1986) juga menduga bahwa TDZ mempunyai kemampuan memacu sintesis sitokinin endogen atau menghambat perombakan sitokinin. Murthy *et al.* (1998) menyatakan bahwa aktivitas TDZ berhubungan erat dengan metabolisme purin sebagai rantai dasar sitokinin dan auksin.

Menurut Rineksane dan Sukarjan (2015), Thidiazuron merupakan senyawa kimia yang mempunyai sifat termolabil, yaitu senyawa yang bekerja pada suhu tertentu dan akan mengalami penurunan kualitas bahkan rusak pada suhu tinggi, sehingga penggunaan Thidiazuron sebaiknya dilakukan menggunakan *milipore* agar cendawan penyebab kontaminasi tersaring dan aplikasinya dapat dilakukan di LAF.

Fungsi sitokinin dalam kultur *in vitro* adalah mendorong pembelahan sel-sel. Perbandingan konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi daripada auksin akan merangsang pertumbuhan dan pembentukan tunas, akan tetapi jika auksin lebih tinggi daripada sitokinin akan merangsang pertumbuhan dan

pembentukan akar. Bila sitokinin dan auksin memiliki konsentrasi yang sama, maka akan merangsang pertumbuhan dan pembentukan kalus.

Sitokinin mendorong pembelahan dengan cara meningkatkan peralihan G2 ke mitosis, dan dalam hal ini sitokinin juga meningkatkan laju sintesis protein. Bererapa protein itu adalah protein pembangun yang dibutuhkan untuk mitosis. Sitokinin juga dapat memperpendek fase S yaitu dengan cara mengaktifkan DNA, sehingga ukuran salinan DNA menjadi dua kali lebih besar, kemudian terjadi sintesis DNA (Dwiyati, 2016).

#### **b. NAA**

Salah satu jenis auksin yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* adalah NAA (*Naphthalene Acetic Acid*). Auksin merupakan salah satu hormon tumbuh yang tidak terlepas dari proses pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman. Auksin berpengaruh terhadap perkembangan sel yang menunjukkan adanya indikasi bahwa auksin dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesa protein, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, dan melunakkan dinding sel yang diikuti menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel yang disertai dengan kenaikan volume sel (Hendaryono, dkk. 1994).

Menurut Salisbury dan Ross (1995) bahwa NAA merupakan hormon tiruan dari IAA (Indol Acetic Acid) dan tidak dihasilkan oleh tanaman tetapi memiliki daya kerja seperti auksin. NAA juga lebih sering digunakan daripada IAA karena NAA tidak terurai oleh enzim IAA oksidase atau enzim yang

dikeluarkan oleh sel saat proses sterilisasi melalui pemanasan. Dengan kata lain, NAA mempunyai sifat lebih stabil dari pada IAA (Fitrianti, 2006).

Menurut Dwiwati (2016), secara umum sistem kerja hormon auksin yaitu menginisiasi pemanjangan dan pembesaran sel serta memacu protein tertentu yg ada di membran plasma sel untuk memompa ion  $H^+$  ke dinding sel. Ion  $H^+$  akan mengaktifkan enzim tertentu sehingga memutuskan beberapa ikatan silang hidrogen dengan rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Sel tumbuhan kemudian memanjang akibat air yang masuk secara osmosis melalui dinding sel.

### **C. Hipotesis**

Diduga hasil pertumbuhan PLB terbaik pada anggrek *Vanda tricolor* yaitu media NDM dengan konsentrasi TDZ 0,5 mg/l.