

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman anggrek merupakan tanaman dengan hasil biji yang tidak memiliki endosperm atau tidak memiliki 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. Biji anggrek yang telah disemai akan membentuk bulatan-bulatan berwarna hijau yang disebut dengan PLB (*protocorm like bodies*). Selanjutnya, PLB yang telah tumbuh harus segera dipindahkan ke media baru agar pertumbuhannya optimal.

PLB yang digunakan pada penelitian ini berasal dari biji anggrek *Vanda tricolor* yang disemai secara *in vitro* selama 1,5 bulan. Pengamatan dilakukan setiap minggu sampai dengan 8 minggu. PLB memberikan respon terhadap perlakuan yang diberikan dengan adanya perkembangan eksplan dari mulai pembengkakan sampai dengan tumbuhnya tunas, akar dan daun. Pertumbuhan dan perkembangan PLB anggrek *Vanda tricolor* dapat dilihat pada Lampiran 6 a.

Laju pertumbuhan dan perkembangan PLB selama 8 minggu inkubasi diamati dengan parameter persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning*, persentase kontaminasi, penambahan diameter PLB, waktu muncul tunas, persentase eksplan bertunas, jumlah tunas, persentase eksplan berdaun, persentase eksplan berakar, dan waktu muncul akar.

### **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 PLB steril hasil dari persemaian secara *in vitro*. Selain itu, dalam penanaman tidak memerlukan adanya perlakuan pada eksplan yang dapat menimbulkan kontaminasi maupun *browning* pada eksplan.

Penambahan arang aktif pada media dalam perlakuan juga mempengaruhi persentase eksplan *browning*. Menurut Widiastoety dkk. (2012), pada kultur *in vitro* angrek biasanya media ditambah dengan arang aktif atau karbon yang berfungsi menyerap senyawa racun dalam media 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 patogen. Hasil pengamatan persentase

eksplan hidup, persentase eksplan *browning* dan persentase eksplan kontaminasi disajikan pada Tabel 2,

Tabel 1. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Hidup, Persentase Eksplan *Browning* dan Persentase Eksplan Kontaminasi (%) PLB Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)	Persentase Eksplan <i>Browning</i> (%)	Persentase Eksplan Kontaminasi (%)
MS + TDZ 0 mg/l	100	0	0
MS + TDZ 0,5 mg/l	100	0	0
MS + TDZ 1 mg/l	100	0	0
VW + TDZ 0 mg/l	100	0	0
VW + TDZ 0,5 mg/l	100	0	0
VW + TDZ 1 mg/l	100	0	0
NDM + TDZ 0 mg/l	100	0	0
NDM + TDZ 0,5 mg/l	100	0	0
NDM + TDZ 1 mg/l	100	0	0

### 1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan parameter yang diukur untuk mengetahui kemampuan eksplan dalam beradaptasi terhadap medium yang digunakan. Eksplan yang ditanam pada semua perlakuan menunjukkan hasil persentase hidup 100% (Tabel 2). Persentase eksplan hidup merupakan eksplan yang tetap hidup dan tidak mengalami *browning* maupun kontaminasi.

Tingginya persentase hidup eksplan disebabkan karena eksplan yang digunakan berupa PLB 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 (1990), 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 PLB tersebut. Perkembangan meliputi pembesaran dan munculnya bakal tunas berbentuk bulir 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 PLB yang dipindahkan dari media awal ke media 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. Pencoklatan ini sangat umum terjadi pada spesies tanaman berkayu, terutama bila eksplan diambil dari pohon dewasa.

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 tidak terjadinya *browning* pada PLB disemua perlakuan sampai dengan 8 MST. Hal tersebut dikarenakan eksplan yang digunakan tidak memerlukan adanya pemotongan serta eksplan yang digunakan memiliki umur yang muda. Penggunaan arang aktif juga berpengaruh pada tingkat *browning* dari eksplan. Hutami (2006), menyatakan bahwa penambahan arang aktif ke dalam media kultur seringkali dapat menghindari pembentukan inhibitor fenolat.

### **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 tidak adanya eksplan yang terkontaminasi. Hal ini menunjukkan sudah 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 media 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 and Weathers (2006), PPM merupakan salah satu bahan biosida cair yang termasuk dalam golongan isotiazolon yang mampu menghambat mikroba dan jamur dalam perbanyakan 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 PLB dan Tunas**

Berdasarkan hasil analisis, menunjukkan bahwa perlakuan macam media dan konsentrasi Thidiazuron tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap semua parameter. Hasil sidik ragam terhadap parameter pertambahan diameter PLB, waktu muncul tunas, jumlah tunas dan waktu muncul akar tersaji pada Tabel 3,

Tabel 2. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Pertumbuhan PLB Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Pertambahan Diameter	Waktu Muncul Tunas	Jumlah Tunas	Waktu Muncul Akar
<b>Macam Media</b>				
MS	0,98a	1,90a	1,70a	1,56a
VW	0,83a	1,40a	1,53a	1,43a
NDM	1,12a	1,93a	1,66a	0,90a
<b>Konsentrasi TDZ</b>				
0 mg/L	0,98p	2,00p	1,56p	1,30p
0,5 mg/L	0,93p	1,76p	1,80p	1,40p
1 mg/L	1,02p	1,46p	1,53p	1,20p
<b>Interaksi</b>	(-)	(-)	(-)	(-)

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.

Pertumbuhan dan perkembangan merupakan proses penting yang terjadi di dalam kehidupan suatu organisme. Menurut Gardner *et al.* (1991) dalam Agriani (2010), pertumbuhan dan perkembangan suatu organisme akan bergantung pada tersedianya meristem, hasil asimilasi, hormon dan substansi lain, serta lingkungan yang mendukung pertumbuhan. Pertumbuhan diartikan sebagai pertambahan ukuran yang ditandai dengan pertambahan volume, bobot, jumlah sel, banyaknya protoplasma, dan tingkat kerumitan. Sementara perkembangan adalah pertumbuhan serta spesialisasi sel (diferensiasi) menjadi jaringan, organ, dan organisme (Salisbury dan Ross, 1995).

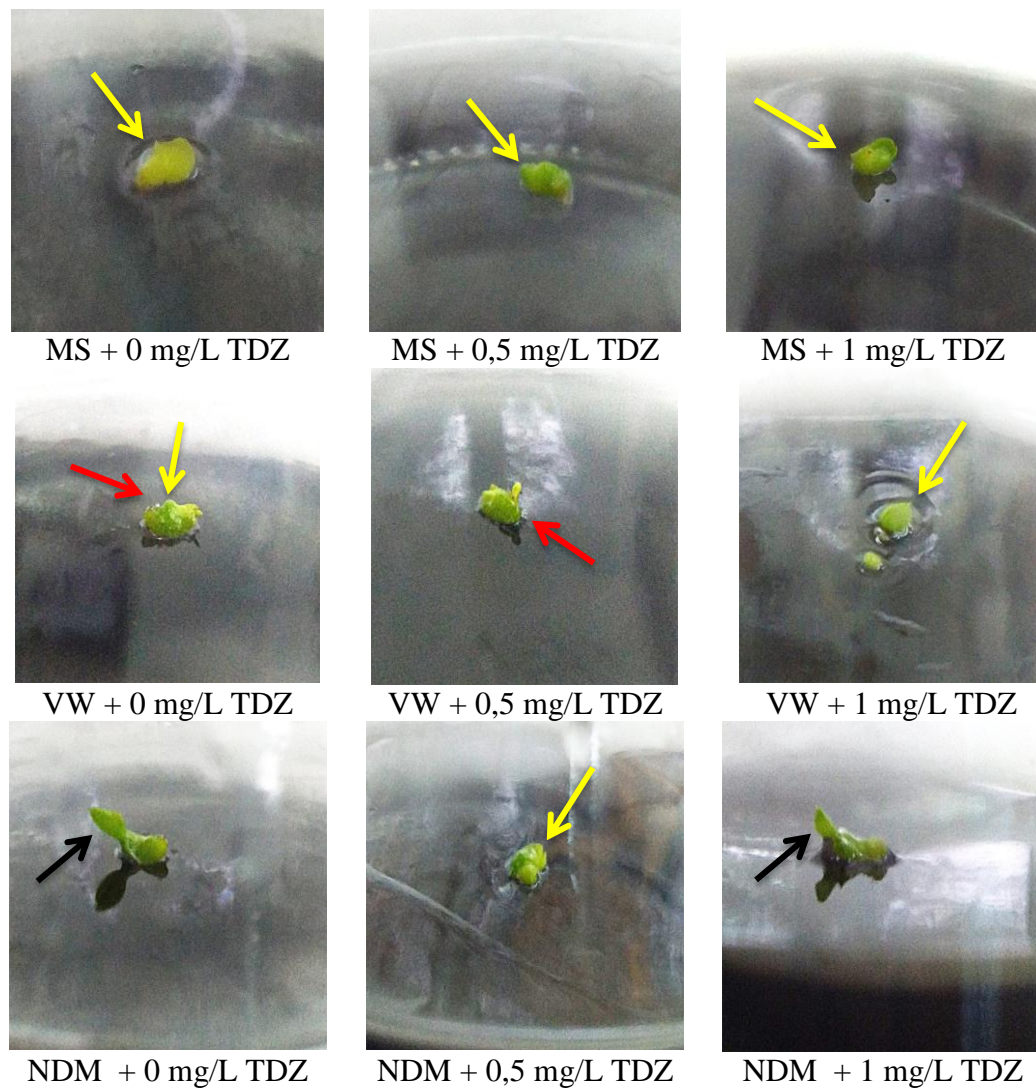
Dalam kultur *in vitro*, pertumbuhan tunas yang berasal dari PLB pada tanaman anggrek, dibagi menjadi 5 kategori perubahan morfologi, yaitu (1) *yellowish* PLB adalah PLB dengan warna putih kekuningan, transparan, kompak, dan keras; (2) *greenish* PLB adalah PLB dengan warna kehijauan; (3) *shootlike*

*bodies* adalah PLB yang telah membentuk primordia daun tunggal dan memiliki warna hijau muda; (4) tunas adalah PLB yang telah membentuk satu atau dua calon daun dengan lamina yang jelas, memiliki warna hijau tua, kadang-kadang disertai dengan tumbuhnya nodul calon akar pada bagian basal; dan (5) planlet adalah bentuk pertumbuhan lebih lanjut dari tunas yang telah membentuk daun dan akar yang jelas (Dorusposari, 2003).

Sementara itu, proses dalam perbanyakan PLB dengan kultur *in vitro* mencakup proses imbibisi, proliferasi dan maturasi (*maturation*). Faktor utama yang menentukan keberhasilan rangkaian ketiga proses tersebut adalah media kultur dan ZPT yang digunakan. Kombinasi antara unsur hara, karbon, dan zat pengatur tumbuh dalam media akan menentukan tingkat keberhasilan proses perbanyakan.




PLB adalah struktur yang berbentuk seperti *corm*, memiliki karakter pembelahan sel yang cepat dengan kutub bipolar yang nantinya akan terinduksi menjadi tunas dan akar, sehingga akan berkembang menjadi planlet dengan jumlah yang banyak dan dalam waktu yang cepat (Gunawan, 1992). Menurut Niedz dan Evans (2007), kecepatan pertumbuhan eksplan akan dipengaruhi oleh jenis media dan kandungan unsur hara yang digunakan. Penelitian ini menggunakan parameter pertambahan diameter, waktu muncul tunas, persentase eksplan bertunas dan persentase eksplan berdaun untuk mengetahui pertumbuhan dari PLB anggrek *Vanda tricolor*. Gambar pertumbuhan PLB Anggrek *Vanda tricolor* pada minggu ke-8 disajikan pada Gambar 1,





Gambar 1. Pertumbuhan PLB Anggrek *Vanda tricolor* umur 8 minggu setelah tanam pada semua perlakuan.

Keterangan gambar :

-  : Menunjukkan kemunculan tunas
-  : Menunjukkan kemunculan akar
-  : Menunjukkan kemunculan daun

#### 4. Pertambahan Diameter PLB

Pertambahan diameter merupakan salah satu parameter penting yang perlu diamati pada kultur *in vitro* dengan eksplan berupa PLB. Pertambahan diameter PLB diketahui dengan cara pengurangan hasil pengukuran PLB pada minggu 8 dikurangi hasil pengukuran minggu 1. Vinogradova dan Andronova (2002) menyatakan bahwa pada saat perkecambahan pada media yang sesuai, embrio dari anggrek akan mengalami pembengkakan, pembesaran ukuran, pecahnya testa dan terbentuknya protokorm globular berwarna putih.

Hasil sidik ragam pada pertambahan diameter PLB anggrek *Vanda tricolor* dengan taraf kesalahan 5% (Tabel 3 dan lampiran 4 a) menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antar perlakuan. Hal tersebut menunjukkan perlakuan berbagai macam media dengan pemberian konsentrasi *Thidiazuron* tidak memberikan pengaruh terhadap pertambahan diameter PLB pada minggu ke-8. Hal ini dapat disebabkan oleh persamaan respon pertumbuhan PLB pada setiap ulangan.

Pembesaran pada PLB merupakan kemampuan PLB dalam menyerap unsur hara pada media dan ZPT baru setelah dipindahkan. Menurut Rineksane dan Sukarjan (2015), pembengkakan pada eksplan disebabkan oleh respon tanaman terhadap perlakuan, yaitu terjadinya imbibisi yang menunjukkan bahwa eksplan melakukan penyerapan air dan hara dari medium.

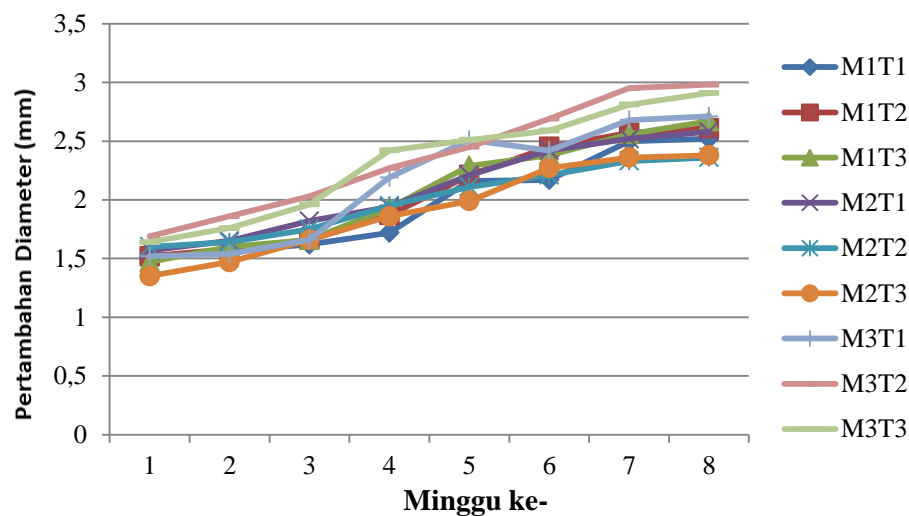
Pertambahan ukuran ini juga dapat dipengaruhi oleh adanya proses imbibisi dan proliferasi, dimana proliferasi dapat terjadi melalui fase kalus

maupun langsung membentuk tunas. Kalus merupakan struktur yang muncul setelah eksplan ditanam, namun belum terdiferensiasi secara sempurna. Dalam penelitian ini, diketahui terjadi proses proliferasi dengan pembentukan tunas maupun kalus yang menyebabkan tidak ada beda nyata antara perlakuan yang diberikan terhadap penambahan diameter PLB.

Berdasarkan Tabel 3 dan lampiran 4 a, hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan macam media tidak menyebabkan beda nyata terhadap penambahan ukuran diameter PLB, tetapi NDM cenderung menghasilkan penambahan diameter paling besar (1,12 mm) dibandingkan dengan media MS dan VW. Media NDM merupakan media yang memiliki kandungan bahan organik lebih banyak dibandingkan media MS dan VW (Lampiran 1). Hal ini sesuai dengan pernyataan Rineksane dan Sukarjan (2015), yang menyebutkan bahwa pembentukan kalus tercepat pada eksplan daun anggrek *Vanda tricolor* terjadi pada media NDM yang diduga karena pada media NDM, vitamin dan bahan organik seperti asam-asam amino yang dimiliki lebih kompleks, sehingga mampu membantu dalam menginduksi kalus lebih cepat.

Hasil pada Tabel 3 juga menunjukkan bahwa perlakuan penambahan TDZ menghasilkan analisis yang tidak berbeda nyata terhadap penambahan ukuran diameter PLB, namun penambahan TDZ dengan konsentrasi 1 mg/L cenderung menghasilkan penambahan diameter yang paling besar (1,02 mm) dibanding dengan tanpa penambahan TDZ dan TDZ pada konsentrasi 0,5 mg/L

Hasil penelitian yang dilakukan Hoesen, dkk. (2008), menyatakan dari nilai rata-rata ukuran diameter kalus PLB *D. lineale* teramati bahwa penambahan TDZ (0,1 hingga 0,5) mg/L pada media MS dapat meningkatkan ukuran diameter kalus dibandingkan dengan perlakuan TDZ konsentrasi 1 mg/L. Menurut Litz dkk. (1995), penggunaan kombinasi antara auksin dengan sitokinin akan meningkatkan proses induksi kalus. Sejalan dengan hal tersebut, Yusnita (2004) menyebutkan bahwa penggunaan auksin dan sitokinin serta nisbah antara keduanya yang seimbang akan memacu pembentukan kalus, sehingga membuat pertambahan ukuran pada diameter PLB. Ketidaksesuaian ini dapat disebabkan oleh perbedaan jenis tanaman anggrek yang digunakan. Pertambahan diameter PLB anggrek *Vanda tricolor* setiap minggu dapat dilihat pada Gambar 2,



Gambar 2. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Pertambahan Diameter PLB Anggrek *Vanda tricolor* Setiap Minggu.

Keterangan gambar :

- M1T1 = Media MS + TDZ konsentrasi 0 mg/l
- M1T2 = Media MS + TDZ konsentrasi 0,5 mg/l
- M1T3 = Media MS + TDZ konsentrasi 1 mg/l
- M2T1 = Media VW + TDZ konsentrasi 0 mg/l
- M2T2 = Media VW + TDZ konsentrasi 0,5 mg/l
- M2T3 = Media VW + TDZ konsentrasi 1 mg/l
- M3T1 = Media NDM + TDZ konsentrasi 0 mg/l
- M3T2 = Media NDM + TDZ konsentrasi 0,5 mg/l
- M3T3 = Media NDM + TDZ konsentrasi 1 mg/l

Peningkatan pertambahan ukuran diameter PLB sudah dimulai dari minggu 1 dan terus bertambah sampai dengan minggu 8 pada semua perlakuan. Dalam perkembangannya, ada PLB yang hanya mengalami imbibisi namun ada pula yang mengalami proliferasi dengan pembentukan kalus maupun tunas (lampiran 6 b). Menurut Endress (1994), *protocorm* mempunyai potensi regenerasi yang tinggi. *Protocorm* yang ditanam sebagai eksplan pada media akan mengalami proliferasi dengan membentuk *protocorm* baru, kemudian akan berkembang membentuk tunas dan akar.

## 5. 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. Selanjutnya, PLB yang telah bertunas akan dihitung pada akhir pengamatan untuk parameter persentase eksplan bertunas.

Hasil sidik ragam parameter waktu muncul tunas pada PLB anggrek *Vanda tricolor* dengan taraf kesalahan 5% (Lampiran 4 b) menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara macam media dengan konsentrasi TDZ terhadap kecepatan waktu muncul tunas PLB sampai dengan minggu ke-8. Menurut Rineksane dan Sukarjan (2015), faktor lain selain *browning* yang menyebabkan tidak terjadinya perkembangan adalah respon dari tanaman *V. tricolor* yang sangat lambat sehingga tidak terjadi perkembangan yang signifikan, bahkan dari beberapa perlakuan yang ditelitinya hanya menunjukkan respon pembengkakan saja dan belum menunjukkan perkembangan kalus pada eksplan potongan daun.

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 perbanyakan dengan menggunakan kultur *in vitro* dimana

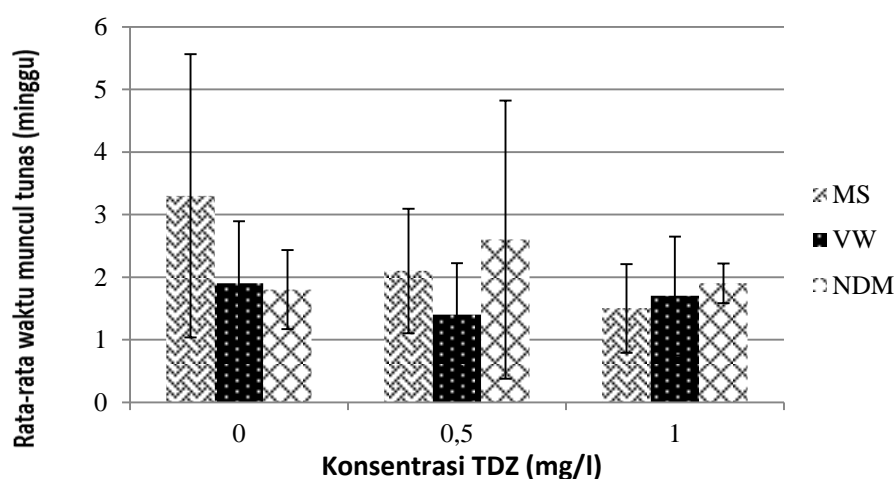
pertumbuhan *Vanda tricolor Lindl.* varietas *suavis* cukup lambat dalam pertumbuhan maupun pembentukan kalus maupun tunas.

Hasil sidik ragam pada Tabel 3 dan lampiran 4 b, menunjukkan bahwa perlakuan macam media yang diberikan menghasilkan analisis yang tidak beda nyata terhadap kecepatan waktu muncul tunas PLB, tetapi VW cenderung menghasilkan waktu muncul tunas yang lebih cepat (1,40 minggu) dibandingkan dengan media MS dan NDM. Soetopo (2012), melaporkan bahwa pembentukan kalus dan tunas dapat terjadi pada perlakuan media VW dibandingkan dengan perlakuan media  $\frac{1}{2}$  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).

Menurut George dan Sherrington (1984), Media KC (Knudson C) dan VW (*Vacin and Went*) merupakan media yang paling umum digunakan dalam perbanyakan anggrek secara *in vitro*, baik untuk perkecambahan biji maupun perbanyakan klonal menggunakan jaringan meristem. Kedua media tersebut didesain secara khusus untuk perkecambahan pada biji anggrek, karena komposisi hara mineralnya lebih sederhana dibandingkan dengan media yang digunakan untuk kultur jaringan tanaman lain, salah satunya media MS (Goh, 1990).

Data pada Tabel 3 juga menunjukkan bahwa perlakuan penambahan TDZ menghasilkan analisis yang tidak berbeda nyata terhadap pertumbuhan ukuran diameter PLB, namun penambahan TDZ dengan konsentrasi 1 mg/L cenderung menghasilkan pertambahan diameter yang paling besar (1,46

minggu) dibanding dengan tanpa penambahan TDZ dan TDZ pada konsentrasi 0,5 mg/L. Menurut Imanudin (2016), manfaat dari hormon sitokinin ini diantaranya adalah untuk mempercepat pertumbuhan tunas, mempercepat penambahan jumlah daun, memperbanyak anakan, dan menghambat penuaan pada organ tanaman. Sesuai dengan penelitian yang dilakukannya, bahwa penambahan konsentrasi TDZ akan memberikan pengaruh pada kecepatan waktu muncul tunas PLB anggrek *Vanda tricolor*. Chen dan Piluek (1995), melaporkan bahwa TDZ lebih efektif dalam mendorong pembentukan tunas pada *Phalaenopsis* hibrida dibandingkan BAP selama 8 MST. Pengaruh yang sama dari TDZ dilaporkan oleh Jen Tsung dan Wei Chin (2000), dimana 1 mg/l TDZ mampu menginduksi tunas dari eksplan kalus yang berasal dari tangkai bunga *Oncidium Sweet Sugar* selama 8 MST. Grafik hasil dari waktu munculnya tunas pada PLB disajikan pada Gambar 3.



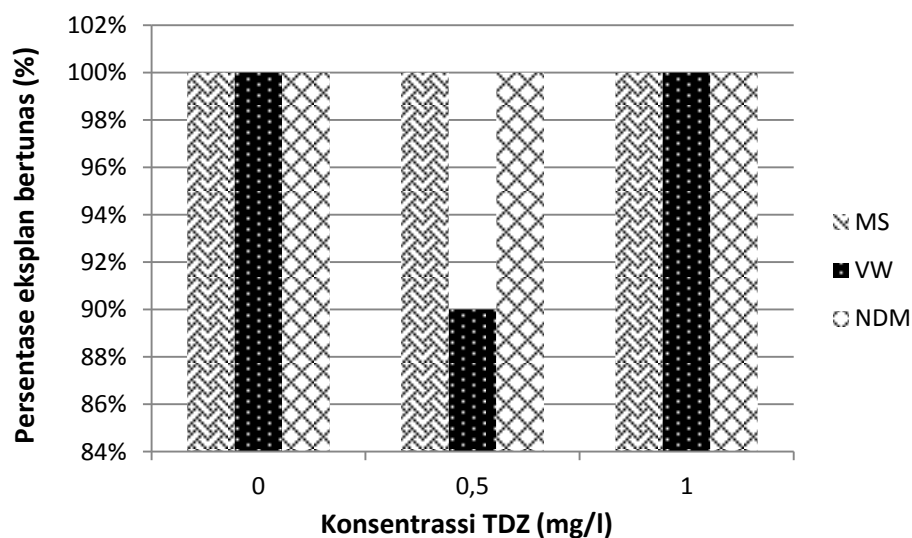
Gambar 3. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Rata-rata Waktu Muncul Tunas PLB Anggrek *Vanda tricolor*.



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 PLB. Kecepatan eksplan bertunas dipengaruhi oleh genotip tanaman yang digunakan, kombinasi media 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.

#### 6. 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 MST) disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Bertunas PLB 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 PLB bertunas yang tinggi (Gambar 3), kecuali pada perlakuan media VW dengan pemberian TDZ 0,5 mg/L, yaitu sebesar 90%. Hal tersebut karena PLB 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 PLB. Meskipun mengalami pencoklatan, namun PLB masih menunjukkan respon pertumbuhan berupa pembengkakan.

Tang and 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. Kemunculan tunas pada PLB disajikan pada Gambar 1.

## **7. Jumlah Tunas**

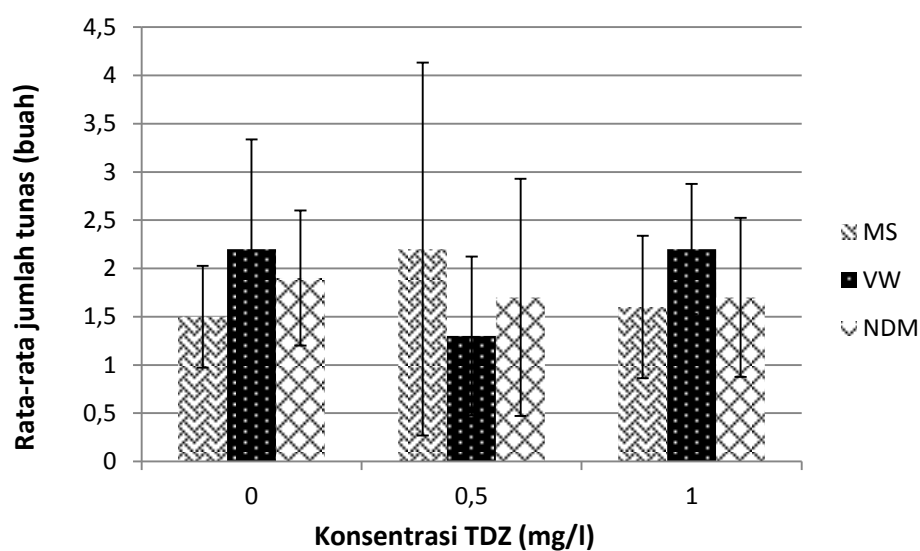
Jumlah tunas merupakan parameter lanjutan dari waktu muncul tunas dan persentase eksplan bertunas. Jumlah tunas ini sangat penting diamati karena semakin banyak tunas yang terbentuk akan berpeluang mendapatkan bibit yang banyak pula. Bhojwani and Razdan (1983), menyatakan bahwa eksplan yang ditanam pada media yang mengandung sitokinin dengan konsentrasi tertentu, maka eksplan akan berdiferensiasi membentuk tunas. Parameter ini diamati pada setiap minggunya.

Hasil sidik ragam pada parameter rata-rata jumlah tunas PLB anggrek *Vanda tricolor* dengan taraf kesalahan 5% (Lampiran 4 c) menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara macam media dengan konsentrasi *Thidiazuron* terhadap rata-rata jumlah tunas PLB pada minggu ke-8. Seperti pada parameter waktu muncul tunas sebelumnya, tidak adanya beda nyata pada parameter jumlah tunas dapat disebabkan karena waktu yang dibutuhkan dalam perbanyakan dengan menggunakan kultur *in vitro* pada *Vanda tricolor Lindl.* varietas *suavis* cukup lambat, baik dalam pertumbuhan maupun pembentukan kalus maupun tunas (Rineksane dan Sukarjan 2015).

Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa perlakuan macam media yang diberikan tidak menghasilkan analisis yang beda nyata terhadap jumlah tunas, tetapi MS cenderung menghasilkan jumlah tunas per PLB yang lebih banyak (1,70 tunas) dibandingkan dengan media VW dan NDM.

Data pada Tabel 3 juga menunjukkan bahwa perlakuan penambahan TDZ menghasilkan analisis yang tidak berbeda nyata terhadap parameter jumlah tunas, namun penambahan TDZ dengan konsentrasi 0,5 mg/L cenderung menghasilkan jumlah tunas per PLB yang lebih banyak (1,80 tunas) dibanding dengan tanpa penambahan TDZ dan TDZ pada konsentrasi 1 mg/L. Penelitian yang dilakukan oleh Karyanti (2017), yang menguji tunas steril dari anggrek *Vanda douglas* pada media MS dengan perlakuan konsentrasi sitokinin TDZ dan BAP. Dalam penelitian ini, dihasilkan perlakuan terbaik parameter pertumbuhan 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 angrek *V. tricolor* var. *pallida* yang menunjukkan hasil proliferasi terbaik terjadi pada pemberian TDZ konsentrasi 0,5 mg/l. Semakin tinggi konsentrasi TDZ berakibat menurunnya pembelahan sel karena terjadi akumulasi TDZ di jaringan. Grafik rata-rata jumlah tunas pada angrek *Vanda tricolor* disajikan pada Gambar 5.



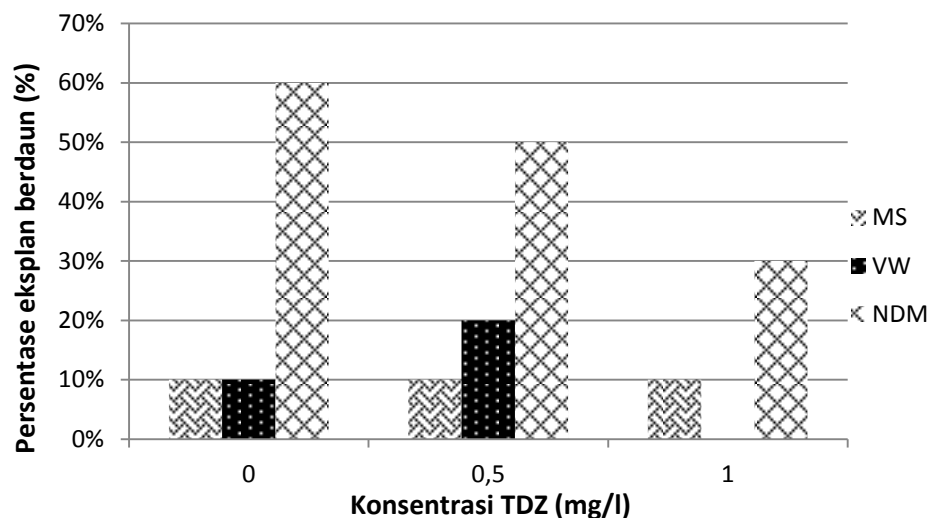
Gambar 5. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Rata-rata Jumlah Tunas per PLB Angrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perbedaan jumlah tunas yang terbentuk pada tiap perlakuan dipengaruhi oleh kombinasi TDZ 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 TDZ 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 media kultur menyebabkan pembelahan sel pada permulaan kultur berjalan lambat, akan tetapi populasi sel tetap terjaga dan kemudian jumlahnya ditingkatkan.

#### **8. Persentase Eksplan Berdaun**

Parameter persentase eksplan berdaun penting untuk diamati karena daun yang tumbuh pada PLB merupakan diferensiasi lebih lanjut ketika PLB sudah bertunas. PLB mempunyai titik tumbuh pada bagian atas tunas yang nantinya akan menjadi daun. Daun merupakan bagian yang penting dalam tanaman. Diketahui tanaman merupakan organisme autotrof, dimana tanaman dapat memproduksi makanan sendiri melalui daun dengan proses fotosintesis. Dengan demikian, pertumbuhan daun akan mempengaruhi siklus hidup di kemudian hari tanaman tersebut. Parameter persentase eksplan berdaun ini diamati dengan menghitung jumlah eksplan yang berdaun pada hari terakhir pengamatan. Grafik persentase eksplan berdaun pada akhir pengamatan (8 MST) tersaji pada Gambar 6.



Gambar 6. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Persentase Kemunculan Daun PLB Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST).

Berdasarkan hasil pengamatan, PLB anggrek *V. tricolor* mulai terlihat tumbuh daun pada minggu ke-4. Persentase muncul daun tertinggi didapatkan pada media NDM tanpa penambahan TDZ, yang kemudian disusul dengan konsentrasi 0,5 mg/l dan terakhir konsentrasi 1 mg/l pada media yang sama. Hal tersebut dapat dikarenakan pada PLB sudah memiliki bakal calon tunas dan calon akar, sehingga pada medium NDM (yang memiliki bahan organik lebih banyak) tanpa penambahan sitokinin (TDZ) sudah mampu untuk mendorong terbentuknya daun. Peran TDZ adalah untuk mendorong terbentuknya tunas-tunas baru dari PLB, sehingga ada atau meningkatnya TDZ dalam media tidak mendorong pembukaan daun yang diduga karena TDZ tersebut digunakan untuk menginduksi tunas-tunas baru yang belum jelas perbedaannya sampai minggu ke-8. Kemuculan daun pada PLB dapat dilihat pada lampiran 6 c.

Penelitian yang dilakukan Supriyadi, dkk. (2014) menghasilkan rerata jumlah daun terbanyak pada kultur *in vitro* biji sarang semut adalah pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA, yang diduga karena pemberian hormon eksogen auksin dalam kurun waktu yang lama (7 minggu) bersimbiosis dengan hormon endogen pada eksplan, sehingga menginisiasi pembentukan akar dan daun. Meskipun waktu pembentukan daun lama, namun pembentukan akar yang banyak dari auksin ini akan memicu laju translokasi unsur hara ke seluruh tanaman yang memicu pertumbuhan daun dan jumlah daun akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia dari eksplan.

### **C. Pertumbuhan Akar**

Keberadaan akar bagi pertumbuhan tanaman memegang peranan sangat penting, sebab akar langsung berkombinasi dengan media tanam dan ZPT yang menyimpan nutrisi untuk kebutuhan hidupnya. Selain berfungsi sebagai penyerap nutrisi dan air, akar juga berperan sebagai penopang tumbuh tegaknya tanaman. Parameter yang digunakan untuk pertumbuhan akar adalah waktu muncul akar dan persentase eksplan berakar.

#### **9. Waktu Muncul Akar**

Waktu muncul akar merupakan parameter akhir yang menentukan pertumbuhan PLB secara kultur *in vitro*. Dalam kultur *in vitro*, planlet merupakan fase tanaman yang siap untuk dilakukannya aklimatisasi. Eksplan dapat disebut planlet apabila telah memiliki minimal 2 daun dan telah tumbuh akar.

Hasil sidik ragam pada rata-rata waktu muncul tunas PLB anggrek *Vanda tricolor* dengan taraf kesalahan 5% pada Tabel 3 dan lampiran 4 d menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara macam media dengan konsentrasi *Thidiazuron* terhadap kecepatan waktu muncul tunas PLB pada minggu ke-8. Hal ini dapat disebabkan waktu yang dibutuhkan untuk proses pembentukan akar lebih lama. Nazi (2014), menyatakan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan akar lebih lama dibandingkan dengan waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan daun.

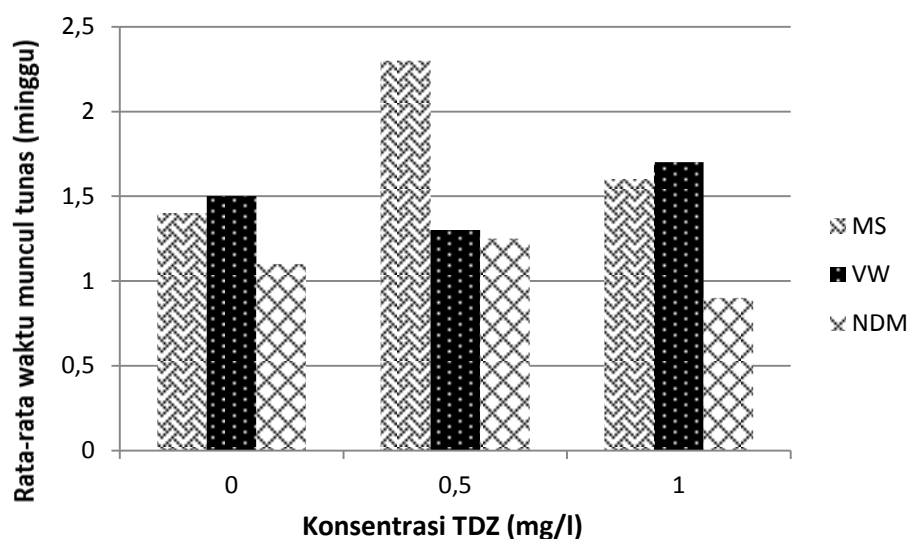
Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa perlakuan macam media yang diberikan menghasilkan analisis yang tidak beda nyata terhadap kecepatan waktu muncul akar PLB, tetapi NDM cenderung menghasilkan waktu kemunculan akar yang lebih cepat (0,90 minggu) dibandingkan dengan media MS dan VW. Hal ini dapat dipengaruhi oleh kandungan bahan organik yang terdapat pada media NDM lebih banyak (lampiran 1).

Hasil data pada Tabel 3 juga menunjukkan bahwa perlakuan penambahan TDZ menghasilkan analisis yang tidak berbeda nyata terhadap kecepatan waktu muncul akar PLB, akan tetapi penambahan TDZ dengan konsentrasi 1 mg/L cenderung menghasilkan waktu muncul tunas yang lebih cepat (1,20 tunas) dibanding dengan tanpa penambahan TDZ dan TDZ pada konsentrasi 0,5 mg/L. Hal ini kurang sesuai karena sitokinin memiliki fungsi dalam pembelahan dan pembesaran sel. Level sitokinin yang rendah akan menurunkan tingkat pertumbuhan tunas dan meningkatkan proliferasi akar (Maxwell & Kieber 2004 dalam Aryati, 2015). Penelitian yang dilakukan



oleh Saliemi (2013), yang menguji PLB anggrek *Onchidium* pada media padat menghasilkan perlakuan kontrol (0 mg/L TDZ) memberikan jumlah akar dan panjang akar terbaik dibandingkan dengan penambahan konsentrasi TDZ 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L dan 5 mg/L. Ketidaksesuaian ini dapat disebabkan karena jenis anggrek yang digunakan berbeda.

Pembentukan akar sendiri sebenarnya memiliki kaitan yang sangat erat dengan penambahan auksin, dimana dalam penelitian ini ditambahkan hormon auksin dengan konsentrasi 0,5 mg/l pada semua perlakuan. Menurut Hendaryono, dkk. (1994), penambahan sejenis hormon auksin seperti NAA berfungsi untuk merangsang pemanjangan sel karena auksin terdapat pada pucuk-pucuk tunas muda atau pada *in vitro* meristem di pucuk, menyebar luas ke dalam seluruh tubuh tanaman. Grafik waktu muncul akar selama pengamatan (8 MST) disajikan pada Gambar 7,

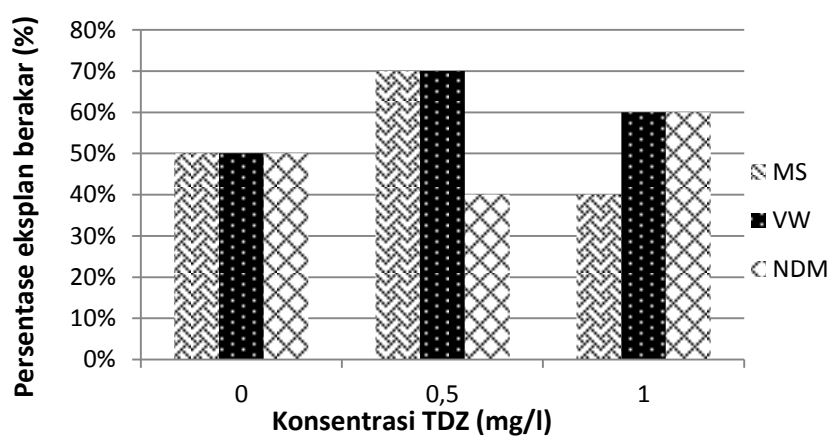


Gambar 7. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Waktu Muncul Akar PLB Anggrek *Vanda tricolor* Sampai dengan 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Kemunculan akar sudah terlihat pada minggu pertama pengamatan. Konsentrasi NAA yang digunakan sangat berpengaruh pada kecepatan munculnya tunas pada PLB anggrek *Vanda tricolor*. Winarsih dan Priyono (2000) menyatakan bahwa interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel-sel secara endogen menentukan perkembangan suatu kultur. Auksin yang ditambahkan pada media bersama-sama dengan auksin endogen yang diproduksi oleh apeks berperan menginduksi pembelahan sel untuk membentuk akar. Kemunculan akar pada PLB dapat dilihat pada lampiran 6 d.

#### 10. Persentase Eksplan Berakar

Persentase eksplan berakar merupakan pengamatan lanjutan yang dilakukan setelah waktu muncul akar. Pengamatan ini dilakukan pada akhir pengamatan, dihitung dengan menggunakan rumus jumlah eksplan yang muncul akar dibagi dengan ulangan dan dikalikan 100%. Grafik persentase eksplan berakar disajikan pada Gambar 8,



Gambar 8. Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Berakar PLB Anggrek *Vanda tricolor* pada 8 Minggu Setelah Tanam (MST)

Pada penelitian ini, pembentukan akar terus terjadi dari minggu pertama sampai dengan akhir pengamatan (8 minggu). Hal ini membuktikan bahwa media dan ZPT yang digunakan mampu memunculkan akar hingga akhir pengamatan. Pembentukan akar ini diduga berasal dari diferensiasi sel-sel PLB yang masih bersifat meristematik, karena eksplan berasal dari PLB steril. Dari penelitian ini, didapatkan persentase eksplan berakar terbanyak ada pada media MS dan VW dengan konsentrasi TDZ 0,5 mg/l. Perlakuan media MS dan VW dengan pemberian TDZ konsentrasi 0,5 mg/l dan NAA konsentrasi 0,5 mg/l ini diduga sudah dapat menyebabkan sel-sel PLB berdiferensiasi ke arah pembentukan akar pada eksplan. Media NDM merupakan perlakuan media yang cenderung lebih cepat dalam memunculkan akar, namun rendah dalam memunculkan akar pada semua ulangan.

Penggunaan konsentrasi TDZ yang lebih rendah menunjukkan hasil lebih baik dalam pertumbuhan akar. Tanaman dengan konsentrasi TDZ yang tinggi ini akan sulit membentuk akar (Gribaudo dan Fronda, 1991). Hal ini karena sitokinin bekerja pada pembentukan tunas pada PLB.

Rostiana dan Seswita (2007) menyatakan bahwa auksin sangat berperan dalam pembentukan akar dengan meningkatkan jumlah dan panjang akar. Meningkatnya jumlah dan panjang akar akan meningkatkan peran akar dalam proses absorpsi nutrisi tanaman. Tomia (2011), menambahkan bahwa fungsi dari hormon auksin adalah membantu dalam proses pertumbuhan, baik itu pertumbuhan akar maupun pertumbuhan

batang. Konsentrasi NAA 0,5 mg/l ini terbukti mampu menumbuhkan akar, meskipun tidak semua eksplan mengalami pertumbuhan akar sampai minggu ke-8.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa PLB memberikan respon pertumbuhan terhadap perlakuan yang diberikan, meskipun hasil analisis menunjukkan tidak ada interaksi atau tidak ada beda nyata pada parameter pertambahan diameter, waktu muncul tunas, jumlah tunas dan waktu muncul tunas. Media NDM + 0,5 mg/l TDZ merupakan perlakuan yang memiliki hasil lebih tinggi dalam pertambahan ukuran diameter PLB, media MS + 0,5 mg/l TDZ cenderung menghasilkan jumlah tunas lebih banyak, media VW + 0,5 mg/l TDZ merupakan perlakuan dengan kecepatan waktu muncul tunas lebih cepat dan persentase eksplan berakar lebih tinggi, media NDM + 0 mg/l TDZ merupakan perlakuan dengan persentase eksplan berdaun yang lebih tinggi, media NDM + 1 mg/l TDZ merupakan perlakuan dengan kecepatan waktu muncul akar yang tercepat.