

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kultur *in Vitro* *Vanda tricolor*

Vanda tricolor merupakan nama latin untuk anggrek Merapi spesies asli Indonesia yang tumbuh secara alami di kawasan lereng Gunung Merapi, Yogyakarta. Anggrek *Vanda tricolor* tumbuh baik pada ketinggian 800 - 1700 meter di atas permukaan laut (mdpl), khususnya di hutan yang cukup terbuka. Spesies ini mampu beradaptasi seperti pada saat fase berbunga dengan sempurna pada ketinggian 200 - 300 mdpl. Anggrek *Vanda tricolor* dapat dijumpai di Jawa Barat hingga Pulau Bali, bahkan dilaporkan ditemukan juga di Negara Laos (Metusala, 2006). Pola pertumbuhan anggrek ini tergolong tipe monopodial dimana batang tumbuh ke atas dan daun ikut tumbuh seiring dengan pertumbuhan batang selama hidupnya.

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 3 cm dan panjang mencapai 45 cm, tersusun saling bergantian pada batang yang tumbuh tegak. Tandan bunga bisa mencapai 50 cm, menyangga 10 - 20 kuntum bunga yang muncul dari ketiak daun, sepal dan petal berwarna dasar antara putih dan kuning dengan bercak berwarna merah keunguan. Diameter bunga anggrek *Vanda tricolor* bisa mencapai 10 cm dan mampu bertahan selama 20 - 25 hari. Bunga anggrek *Vanda tricolor* berbau harum. Aroma harum ini sangat dipengaruhi oleh ketinggian tempat hidup, di dataran tinggi aromanya sangat kuat dan semakin turun ke dataran rendah aromanya akan semakin berkurang (Metusala, 2006).

Anggrek *Vanda tricolor* tergolong tanaman anggrek langka dan dalam ancaman kepunahan karena bunganya yang eksotik mencolok dan mempunyai bentuk tanaman yang besar, sehingga mudah didapat oleh pemburu bunga. Adapun klasifikasi ilmiah dari tanaman anggrek *Vanda tricolor* sebagai berikut: *Kingdom Plantae; Divisi Magnoliophyta; Kelas Liliopsida; Ordo Aspargales; Famili Orchidaceae; Subfamili Epidendroideae; Tribe Vandae; Subtribe Sarcanthinae; Alliance Vanda; Genus Vanda; Species Vanda tricolor* (Dressler, 1990 dalam Dwiyani, 2014).

Anggrek *Vanda tricolor* sebenarnya cukup mudah untuk dibudidayakan, akan tetapi membutuhkan keterampilan dalam proses budidaya. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk memperbanyak tanaman anggrek *Vanda tricolor*, yaitu perbanyakan generatif dan perbanyakan vegetatif. Perbanyakan generatif pada anggrek *Vanda tricolor* yaitu dengan menggunakan biji. Secara alami, tempat penyebaran biji anggrek *Vanda tricolor* hanya di sekitar akar atau tempat tumbuh ketika buah terbelah dan biji bertebaran, namun terkadang anggrek *Vanda tricolor* bisa tumbuh di tempat yang agak jauh ketika biji terbawa oleh angin, serangga, atau hewan lainnya. Biji anggrek *Vanda tricolor* membutuhkan waktu yang relatif lama untuk tumbuh secara alami sebagai bibit. Sementara itu, penyebaran biji dengan teknologi yang cukup modern bisa dilakukan, seperti yang dilakukan di laboratorium khusus (Parnata, 2005).

Perbanyakan vegetatif dilakukan dengan cara mengambil bagian tanaman lalu menanamnya secara terpisah dari induknya. Perbanyakan ini dapat menghasilkan keturunan yang sifatnya sama dengan induknya. Beberapa cara perbanyakan vegetatif yang biasa dilakukan ialah pemisahan rumpun, stek, menggunakan tunas

anakan yang tumbuh pada batang, dan kultur *in vitro*. Perbanyak secara kultur *in vitro* dapat digunakan untuk perbanyak generatif dan juga perbanyak vegetatif.

Perbanyak generatif menggunakan biji membutuhkan waktu yang lama karena embrio atau biji angrek bukan merupakan biji yang sempurna dan tidak mempunyai cadangan makanan (endosperm) untuk pertumbuhan embrionya. Selain itu, ukuran biji yang sangat kecil dan halus sehingga tingkat keberhasilan rendah juga menjadi salah satu faktor perbanyak tanaman angrek ini jarang dilakukan. Perbanyak tanaman angrek *Vanda tricolor* melalui kultur *in vitro* merupakan teknik perbanyak yang tepat.

Kultur *in vitro* merupakan teknik perbanyak dengan mengisolasi bagian tanaman dan menumbuhkannya pada medium buatan yang mengandung nutrisi lengkap di lingkungan steril, sehingga bagian tanaman tersebut mampu beregenerasi dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap (George, 1993). Perbanyak secara kultur *in vitro* merupakan cara yang paling sering dilakukan untuk mendapatkan bibit angrek *Vanda tricolor* dalam jumlah yang banyak dan memiliki tingkat keberhasilan yang cukup tinggi dibanding perbanyak dengan cara lain (Republika, 2015). Keuntungan lain yang diperoleh dari perbanyak kultur *in vitro* antara lain adanya keseragaman bibit tanaman, kesehatan dan mutu bibit lebih terjamin, serta kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibandingkan dengan perbanyak konvensional (Mutafawwiqin, 2012).

Ada 2 cara yang dapat dilakukan dalam kultur *in vitro* yaitu melalui induksi organogenesis dan induksi embriogenesis. Organogenesis adalah regenerasi yang berasal dari organ atau jaringan tanpa terlebih dahulu membentuk embrio somatik.

Organogenesis dapat dilakukan melalui multiplikasi tunas dari mata tunas aksilar dan melalui pembentukan tunas adventif baik secara langsung ataupun tidak langsung (Gunawan, 1987). Embriogenesis merupakan proses induksi sel-sel somatik menjadi embrio untuk berkembang dan berdiferensiasi membentuk tanaman utuh secara langsung maupun tidak langsung (Wetherell, 1982).

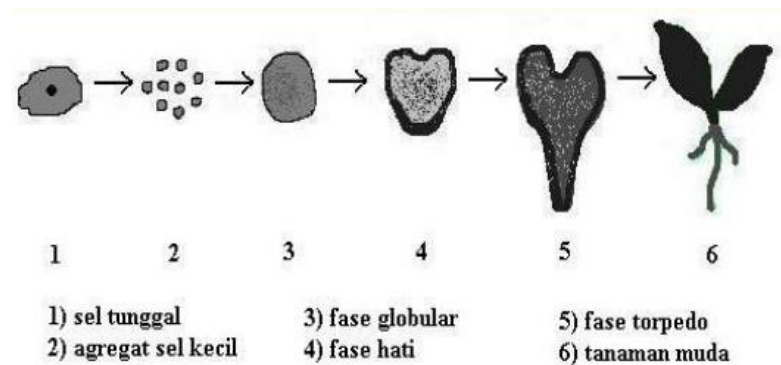
Dalam kultur *in vitro* terdapat beberapa proses yaitu kultur dengan menggunakan eksplan dari luar maupun kegiatan subkultur atau *over planting*. Subkultur merupakan kegiatan pemindahan eksplan anggrek ke dalam medium botol kultur baru, sehingga memperoleh kebutuhan nutrisi yang baru. Bila medium kultur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

B. Embrio Somatik Anggrek

Embriogenesis somatik atau embriogenesis aseksual adalah proses dimana sel-sel soma atau sel-sel tubuh berkembang menjadi embrio melalui tahap-tahap morfologi dan tanpa melalui fusi gamet. Embrio somatik yang berasal dari kultur sel, jaringan, atau organ dapat terbentuk secara langsung dan tidak langsung. Embrio somatik secara langsung meliputi pembentukan embrio dari sel tunggal atau kelompok sel yang menyusun jaringan eksplan tanpa melalui pembentukan kalus, sedangkan embrio somatik secara tidak langsung meliputi pembentukan

embrio melalui fase kalus (Dixon, 1985 dalam Edy dkk., 2007). Keuntungan embrio somatik adalah jumlah bibit yang diperoleh banyak, pertumbuhan tanaman lebih cepat, serta kepastian hasil tinggi.

Tahapan perkembangan embrio somatik (Gambar 1) dimulai dari embrio tahap globular, kemudian berkembang menjadi tahap hati, selanjutnya tumbuh menjadi embrio tahap torpedo, dan terus berkembang ke tahap pembentukan tunas dan akar atau disebut tahap perkecambahan. Tahap yang terakhir adalah tahap pembentukan plantlet dan pembesaran plantlet (Triatminingsih, 2015).



Gambar 1. Tahapan Perkembangan Embrio Somatik

Keberhasilan embrio somatik melalui kultur *in vitro* dipengaruhi beberapa faktor. Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan embrio somatik yaitu pemberian unsur hara yang lengkap dan tepat pada medium sesuai dengan kebutuhan eksplan. Ketepatan dalam pemberian takaran unsur hara karena pertumbuhan eksplan sangat bergantung pada susunan zat makanan yang terlarut dalam medium (Katuuk, 1989). Selain unsur hara, keberhasilan embrio somatik juga dipengaruhi oleh adanya zat pengatur tumbuh (ZPT) yaitu senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit tetapi dapat mendukung, menghambat, dan dapat mengubah proses fisiologis tumbuhan. Pemberian ZPT yang tepat juga menjadi salah satu faktor yang menentukan keberhasilan embrio somatik.

1. Medium Kultur *in Vitro*

Medium merupakan tempat tumbuh bagi tanaman dan salah satu faktor penting dalam keberhasilan kultur *in vitro*. Dalam kebanyakan kultur *in vitro*, pertumbuhan eksplan sangat dipengaruhi oleh medium tanam. Penggunaan jenis medium akan berpengaruh terhadap kandungan unsur hara yang terkandung di dalamnya. Unsur hara yang terkandung dalam suatu medium terdiri dari unsur makro dan mikro serta kandungan bahan organik dan vitamin, sehingga mampu merangsang pertumbuhan eksplan. Medium dibuat menjadi padat dengan menambahkan agar yang berguna untuk mencegah eksplan berpindah tempat (Widiastoety dan Santi, 1997).

Medium yang digunakan dalam kultur *in vitro* ada bermacam macam. Pemilihan medium tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, umur jaringan, tujuan, serta perhitungan masing-masing peneliti. Isi dan komposisi dari medium kultur dirancang secara khusus untuk tujuan berbeda. Penggunaan medium yang kompleks diharapkan mampu memberikan pertumbuhan yang baik pada tanaman. Salah satu medium yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* anggrek yaitu *New Dogashima Medium* (NDM).

NDM merupakan medium yang mengandung unsur hara lengkap baik makro dan mikro serta mengandung banyak komponen organik. Makro yaitu 200 mg/l KNO_3 , 480 mg/l NH_4NO_3 , 250 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 550 mg/l KH_2PO_4 , 470 mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, dan 150 mg/l KCl. Mikro yaitu 3 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg/l H_3BO_3 , 0,025 mg/l $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan 0,025 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Komponen organik yaitu 100 mg/l Myo-inositol, 1 mg/l Pyridoxine HCl, 1 mg/l Thiamine HCl, 0,1 mg/l d-Biotin, 1 mg/l Niacin, 1 mg/l Calcium pantothenate, 1 mg/l Adenine, 1 mg/l i-Cystein. Selain itu juga mengandung 21 mg/l Fe-EDTA.

Tokuhara dan Mii (1993) melaporkan bahwa NDM memberikan hasil terbaik dalam formasi pertumbuhan protocorm anggrek *Phalaenopsis*. Penelitian dengan menggunakan NDM yang dilakukan oleh Sukarjan (2015) pada anggrek *Vanda tricolor* dengan penambahan 0,5 TDZ merupakan perlakuan terbaik. Hasil penelitian Te-chato *et al.* (2010) menyatakan penggunaan NDM dapat mengubah struktur kalus nodular pada subkultur anggrek *Rhynchostylis rubrum* dalam kondisi kalus berubah menjadi hijau dan menghasilkan embrio somatik.

Medium yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* mengandung bahan kimia murni yang harganya cukup mahal, sehingga dibutuhkan medium alternatif yang mempunyai kandungan yang sama tetapi mempunyai harga yang relatif lebih murah. Medium alternatif tersebut ialah medium yang menggunakan bahan-bahan alami yang mengandung sumber hara dan nutrisi, salah satunya dengan menggunakan pupuk organik cair (POC). Pupuk organik memiliki unsur hara makro dan mikro yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman. Selain unsur hara, pupuk organik juga mengandung asam amino yang berfungsi sebagai sumber Nitrogen organik dan dapat dimanfaatkan langsung oleh jaringan tanaman, serta mengandung hormon yang dapat merangsang pertumbuhan pada jaringan tanaman.

Salah satu pupuk organik yang mengandung unsur hara makro dan mikro cukup lengkap yaitu DIGrow. Pupuk DIGrow dapat membantu merangsang pertumbuhan batang, tunas dan anak tanaman, meningkatkan penyerapan nutrisi dari dalam tanah oleh akar, mencegah kerontokan daun; bunga; dan buah sebelum waktunya, meningkatkan kualitas warna bunga dan rasa buah, memperpanjang masa produktif tanaman, mempercepat masa panen, meningkatkan hasil panen, memperpanjang masa penyimpanan hasil panen (bunga atau buah tidak cepat busuk), dan meningkatkan daya tahan terhadap serangan hama penyakit.

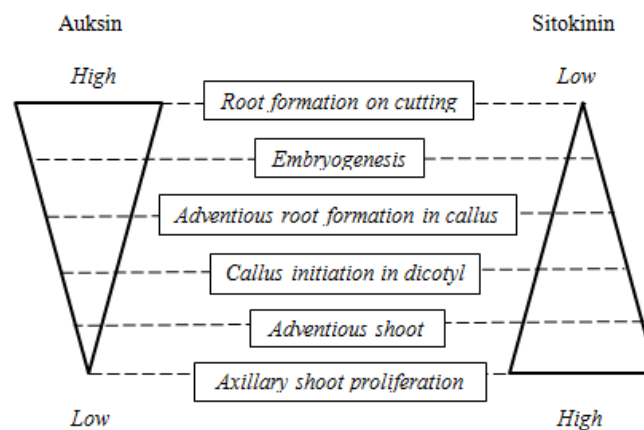
Pupuk DIGrow mengandung unsur hara lengkap baik makro dan mikro, dalam 250 ml yaitu 8,70 % C-organik, 4,45 % N, 4,92 % P₂O₅, 4,57 % K₂O, 0,03 % Mg, 0,69 % S, 0,005 % Ca, 0,50 % Cl, 397 ppm Fe, 2166 ppm Mn, 507 ppm Cu, 359 ppm Zn, 149 ppm B, 5 ppm Mo, 0,4 ppm Pb, 0,1 ppm Cd, 16 ppm Co, 0,1 ppm As, 0,282 % asam amino total, 0,150 % asam humik dan 0,030 % asam fulfik. Pupuk DIGrow juga mengandung ZPT yaitu 33,62 ppm IAA, 32,45 ppm Zeatin, 40,87 ppm Kinetin, dan 94,80 ppm GA-3 (DIGrow, 2015).

Hasil penelitian Yusnaeni (2012) menunjukkan bahwa pengaruh medium POC terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio anggrek menunjukkan respon yang berbeda-beda pada setiap fase pertumbuhan, sedangkan hasil penelitian Sahtiana (2016) menunjukkan bahwa penggunaan pupuk organik 3 ml/l + sukrosa 30 g/l dapat menggantikan medium VW + sukrosa 30 g/l dan menghasilkan pertumbuhan terbaik pada subkultur anggrek *Vanda tricolor*.

2. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh (ZPT) 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 eksplan. Pembentukan organ dipengaruhi oleh adanya keseimbangan antara auksin dan sitokinin (Katuuk, 1989).

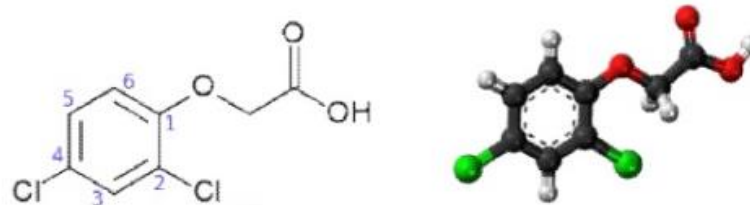
Imbangan konsentrasi auksin tinggi dan sitokinin yang lebih rendah dapat mendorong induksi embrio somatik pada tunas anggrek *Vanda tricolor* (Gambar 2). Penelitian ini akan menggunakan auksin 2,4-D dalam berbagai konsentrasi dengan penambahan sitokinin TDZ. Kedua ZPT ini biasa digunakan dalam medium kultur *in vitro*.



Gambar 2. Imbangan Konsentrasi Auksin dan Sitokinin

Menurut Aini (2014), 2,4-D adalah herbisida yang bersifat selektif (tidak berbahaya untuk tanaman utama) dan sistemik. Cara kerjanya menurunkan auksin (hormon pertumbuhan). Setelah terserap tanaman, produksi etilen akan meningkat dan perkembangan dinding sel menjadi abnormal. Akan tetapi, dalam konsentrasi rendah 2,4-D dapat berfungsi sebagai zat pengatur tumbuh

yang mampu merangsang dan menggiatkan pertumbuhan tanaman. 2,4-D adalah sintesis auksin dan karena itu sering digunakan dalam laboratorium untuk penelitian tanaman dan sebagai suplemen di pabrik kultur sel media (Gambar 3).



Gambar 3. Struktur Kimia 2,4-D (Asam Diklorofenoksiasetat)

2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman (Bhojwani dan Razdan, 1996 dalam Lizawati, 2012). Auksin merupakan salah satu ZPT yang sangat berperan dalam berbagai proses perkembangan tumbuhan, seperti pembelahan dan pemanjangan sel, diferensiasi sel dan inisiasi pembentukan akar lateral, pembesaran sel, dominansi apikal, perkembangan pembuluh (jaringan pengangkut), perkembangan aksis embrio, serta perkembangan embrio. Peran auksin dalam embriogenesis somatik antara lain untuk inisiasi embriogenesis somatik, induksi kalus embriogenik, proliferasi kalus embriogenik, dan induksi embrio somatik (Edy dkk., 2007).

Secara umum, hormon auksin sintesis seperti 2,4-D telah digunakan untuk induksi kalus embriogenik dalam banyak tanaman, salah satunya tanaman anggrek *Vanda tricolor*. Menurut Fannesbech (1992) dalam Widiastoety (2014) auksin tidak berfungsi bila tidak berinteraksi dengan hormon lainnya. Kombinasi antara auksin dengan sitokinin yang tepat pada kultur endosperm

dapat menginduksi pembentukan kalus (Miyashita *et al.*, 2009). Kombinasi auksin yang tinggi dengan sitokinin rendah akan menstimulir pembelahan sel dan membentuk kalus embriogenik.

Hasil penelitian Rianawati dkk. (2009) menunjukkan bahwa penggunaan $\frac{1}{2}$ MS + 0,2 mg/l TDZ + 0,5 mg/l 2,4-D dapat mempengaruhi pembentukan kalus dan regenerasi tanaman anggrek *Phalaenopsis sp* L. Wetherell (1982) menyatakan bahwa penambahan auksin seperti 2,4-D dalam jumlah yang lebih besar atau lebih stabil, cenderung menyebabkan adanya pertumbuhan kalus dan menghambat regenerasi pucuk tanaman. Hasil penelitian Saputra (2012) menunjukkan bahwa anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) pada medium *New Phalaenopsis* (NP) yang mengandung 20 g/l sukrosa, 10% air kelapa, dan 1 mg/l 2,4-D memberikan hasil paling baik untuk inisiasi embrio somatik anggrek bulan (mencapai 100%) pada tiga minggu setelah subkultur dengan rerata waktu 6 - 7 hari.

C. Hipotesis

Diduga penggunaan medium POC dengan pemberian 2,4-D pada konsentrasi 1 mg/l mampu merangsang pertumbuhan kalus terbaik anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro*.