

**Bidang Unggulan\* : Lingkungan dan Bencana/Pertanian Berkelanjutan Berbasis  
Kearifan Lokal  
Kode>Nama Rumpun Ilmu :168/Bioteknologi Pertanian dan Perkebunan**

**LAPORAN KEMAJUAN**

**PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**REKAYASA PERBANYAKAN DAN BUDIDAYA ANGGREK *Vanda tricolor*  
IN VITRO DAN EX VITRO UNTUK KONSERVASI DI KAWASAN  
TERDAMPAK ERUPSI MERAPI**

**TIM PENGUSUL**

**Ketua :**

**Dr. Innaka Ageng Rineksane, SP, MP**

**NIDN: 0512107201**

**Anggota :**

**Dr.Ir. Gatot Supangkat, MP**

**NIDN: 0023106201**

**Ir. Agung Astuti, M.Si**

**NIDN: 0523096201**

**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA**

**Agustus, 2017**

## IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian : Rekayasa Perbanyakan dan Budidaya Anggrek *Vanda tricolor* In Vitro dan Ex Vitro untuk Konservasi di Kawasan Terdampak Erupsi Merapi

2. Tim Peneliti

No	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Instansi Asal	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1	INNAKA AGENG RINEKSANE S.P., M.P.	Ketua Pengusul	Kultur In Vitro	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta	10.00
2	GATOT SUPANGKAT SAMIDJO	Anggota Pengusul	-	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta	5.00
3	Ir AGUNG ASTUTI	Anggota Pengusul	-	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta	5.00

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):

Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* dan bagiannya seperti biji, potongan daun, potongan tunas sebagai bahan tanam

4. Masa Pelaksanaan

Mulai tahun: 2017  
Berakhir tahun: 2021

5. Usulan Biaya DRPM Ditjen Penguatan Risbang

- Tahun ke-1: Rp107,000,000
- Tahun ke-2: Rp112,000,000
- Tahun ke-3: Rp145,000,000
- Tahun ke-4: Rp105,000,000
- Tahun ke-5: Rp102,000,000

6. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan)

Laboratorium Kultur In Vitro, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta; Lereng Gunung Merapi

7. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)

Tidak ada

8. Temuan yang ditargetkan (produk atau masukan untuk kebijakan)

plantlet Anggrek *Vanda tricolor* hasil organogenesis dan embriogenesis, metode perbanyakan *Vanda tricolor* melalui organogenesis dan embriogenesis

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang mendukung pengembangan iptek)

Hasil penelitian ini akan diperoleh eksplan dan metode terbaik untuk mendapatkan plantlet *Vanda tricolor*. Bahan tanam yang mudah diperoleh dan tersedia sepanjang tahun serta teknik pemeliharaan untuk meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan *Vanda tricolor* pasca aklimatisasi diharapkan dapat meningkatkan daya hidup anggrek tersebut sehingga *Vanda tricolor* dapat dikembalikan ke habitat aslinya.

10. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran (tuliskan nama terbitan berkala ilmiah internasional bereputasi, nasional terakreditasi, atau nasional tidak terakreditasi dan tahun rencana publikasi)

Jurnal *Agrivita* (nasional terakreditasi), *Hayati Journal of Bioscience* (internasional bereputasi), *Planta Tropika* (nasional tidak terakreditasi),

11. Rencana luaran HKI, buku, purwarupa atau luaran lainnya yang ditargetkan, tahun rencana perolehan atau penyelesaiannya

- Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional, tahun ke-1 Target: draft
- Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional, tahun ke-2 Target: submitted
- Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional, tahun ke-3 Target: accepted/published
- Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional, tahun ke-4 Target: submitted
- Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional, tahun ke-5 Target: accepted/published
- Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi, tahun ke-1 Target: draft
- Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi, tahun ke-2 Target: accepted/published
- Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi, tahun ke-3 Target: draft
- Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi, tahun ke-4 Target: submitted
- Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi, tahun ke-5 Target: accepted/published
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-1 Target: sudah dilaksanakan
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-2 Target: draft
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-3 Target: sudah dilaksanakan
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-1 Target: draft
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-2 Target: sudah dilaksanakan
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-3 Target: draft
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-4 Target: sudah dilaksanakan
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Visiting Lecturer Internasional, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Visiting Lecturer Internasional, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Visiting Lecturer Internasional, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Visiting Lecturer Internasional, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Visiting Lecturer Internasional, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Paten, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Paten, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Paten, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Paten, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Paten, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Paten Sederhana, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Paten Sederhana, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Paten Sederhana, tahun ke-3 Target: draft
- Paten Sederhana, tahun ke-4 Target: draft
- Paten Sederhana, tahun ke-5 Target: terdaftar/granted
- Hak Cipta, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Hak Cipta, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Hak Cipta, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Hak Cipta, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Hak Cipta, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Merk Dagang, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Merk Dagang, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Merk Dagang, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Merk Dagang, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Merk Dagang, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Rahasia Dagang, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Rahasia Dagang, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Rahasia Dagang, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Rahasia Dagang, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Rahasia Dagang, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Desain Produk Industri, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Desain Produk Industri, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Desain Produk Industri, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Desain Produk Industri, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Desain Produk Industri, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Indikasi Geografis, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Indikasi Geografis, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Indikasi Geografis, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Indikasi Geografis, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Indikasi Geografis, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Varietas Tanaman, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Varietas Tanaman, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Varietas Tanaman, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Varietas Tanaman, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Varietas Tanaman, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Topografi Sirkuit, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Topografi Sirkuit, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Topografi Sirkuit, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada

- Perlindungan Topografi Sirkuit , tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Topografi Sirkuit , tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Teknologi Tepat Guna, tahun ke-1 Target: draft
- Teknologi Tepat Guna, tahun ke-2 Target: draft
- Teknologi Tepat Guna, tahun ke-3 Target: penerapan
- Teknologi Tepat Guna, tahun ke-4 Target: penerapan
- Teknologi Tepat Guna, tahun ke-5 Target: produk
- Model/Purwarupa/Desain/Karya Seni/Rekayasa Sosial, tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Model/Purwarupa/Desain/Karya Seni/Rekayasa Sosial, tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Model/Purwarupa/Desain/Karya Seni/Rekayasa Sosial, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Model/Purwarupa/Desain/Karya Seni/Rekayasa Sosial, tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Model/Purwarupa/Desain/Karya Seni/Rekayasa Sosial, tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Buku Ajar (ISBN), tahun ke-1 Target: belum/tidak ada
- Buku Ajar (ISBN), tahun ke-2 Target: belum/tidak ada
- Buku Ajar (ISBN), tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Buku Ajar (ISBN), tahun ke-4 Target: belum/tidak ada
- Buku Ajar (ISBN), tahun ke-5 Target: belum/tidak ada
- Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT), tahun ke-1 Target: Skala 1
- Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT), tahun ke-2 Target: Skala 2
- Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT), tahun ke-3 Target: Skala 3
- Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT), tahun ke-4 Target: Skala 4
- Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT), tahun ke-5 Target: Skala 5

## DAFTAR ISI

Halaman Pengesahan.....	ii
Identitas dan Uraian Umum .....	1
Daftar Isi .....	4
Ringkasan.....	4
Bab 1. Pendahuluan .....	4
Bab 2. Tinjauan Pustaka .....	9
Bab 3. Metode Penelitian .....	12
Bab 4. Biaya dan Jadwal Penelitian....	17
4.1. Anggaran Biaya.....	17
4.2. Jadwal Penelitian.....	18
Referensi .....	19
Lampiran -Lampiran.....	20

## RINGKASAN

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk menghasilkan plantlet anggrek *Vanda tricolor* dari eksplan biji, daun dan tunas melalui proses organogenesis dan embriogenesis dengan menggunakan teknik kultur *in vitro*. Dalam penelitian ini akan dilakukan induksi plantlet *Vanda tricolor* dengan menggunakan media kultur padat dan cair secara *in vitro* melalui organogenesis maupun embriogenesis. Rekayasa dilakukan dengan menggunakan beberapa jenis eksplan, medium dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda sehingga plantlet dapat diproduksi dalam kultur padat maupun cair. Penelitian ini juga bertujuan untuk memformulasikan teknik pemeliharaan anggrek *Vanda tricolor* pasca aklimatisasi untuk meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan dari anggrek tersebut. Rekayasa dilakukan dengan menggunakan variasi jenis medium dan senyawa organik atau anorganik sehingga plantlet mampu beradaptasi di lingkungan yang non steril. Target khusus yang akan dicapai dari penelitian ini adalah tanaman Anggrek *Vanda tricolor* hasil kultur *in vitro* yang telah beradaptasi dengan habitat aslinya di lereng Gunung Merapi. Plantlet-plantlet yang diperoleh melalui kultur *in vitro* dan telah beradaptasi pada lingkungan terbuka melalui proses aklimatisasi akan menjadi tonggak pengembalian *Vanda tricolor* ke habitat aslinya di lereng Gunung Merapi. Upaya penyesuaian *Vanda tricolor* dengan lingkungan habitat aslinya juga akan dilakukan pada tahun kelima penelitian ini. Target lain yang akan dicapai dari penelitian ini adalah dua publikasi di jurnal internasional, 2 publikasi di jurnal nasional dan makalah yang dipresentasikan di forum ilmiah nasional maupun internasional. Penelitian ini sejalan dengan *roadmap* penelitian unggulan perguruan tinggi yaitu pada bidang lingkungan dan bencana dengan tema Pertanian Berkelanjutan Berbasis Kearifan Lokal. Penelitian ini akan menjadi bagian dari upaya penyelamatan plasma nutfah pasca bencana alam erupsi Gunung Merapi sebagai bagian tidak terpisahkan dari Daerah Istimewa Yogyakarta dimana perguruan tinggi pengusul berada.

## BAB 1. PENDAHULUAN

Anggrek *Vanda tricolor* merupakan anggrek endemik kawasan lereng Gunung Merapi. Anggrek berbunga putih dengan bercak totol ungu kemerahan ini hidup secara epifit dan banyak dijumpai menempel pada batang pohon yang ada di hutan Gunung Merapi. Akan tetapi, semburan awan panas, kebakaran hutan di lereng gunung tersebut dan erupsi pada

tahun 2006 telah menghancurkan 80 % habitat dan mengancam keberadaan anggrek ini. Selain itu, eksploitasi *Vanda tricolor* keluar dari habitat aslinya oleh masyarakat untuk koleksi atau menjualnya ke luar daerah telah mengurangi populasi anggrek tersebut (Metusala, 2006).

Upaya konservasi *Vanda tricolor* telah dilakukan oleh Badan Koordinasi Sumber Daya Alam dengan memberikan tanaman anggrek ini kepada kelompok tani di sekitar kawasan Gunung Merapi. Akan tetapi, pemeliharaan dan metode perbanyakan konvensional yang dilakukan oleh kelompok tani belum dapat meningkatkan jumlah populasi anggrek tersebut bahkan sebaliknya persentase kematian tanaman masih cukup tinggi. Sebagai contoh, sebanyak 80 tanaman anggrek yang diberikan, tersisa 36 tanaman setelah 1 tahun (Metusala, 2006). Erupsi Merapi pada tahun 2010 mengurangi lagi populasi anggrek *Vanda tricolor* di kawasan Gunung Merapi. Oleh karena itu perlu diupayakan perbaikan teknologi untuk memperbanyak dan meregenerasikan kembali anggrek *Vanda tricolor*. Teknik perbanyakan yang dapat digunakan adalah melalui kultur *in vitro* dan *ex vitro*.

Kultur *in vitro* merupakan teknik mengisolasi bagian tanaman, menumbuhkannya dalam media buatan yang mengandung nutrisi lengkap di lingkungan steril sehingga bagian tanaman tersebut tumbuh menjadi tanaman sempurna (Pierik, 1997; George, 1993). Perbanyakan anggrek melalui kultur *in vitro* telah banyak dilakukan untuk menumbuhkan biji anggrek. Biji anggrek tidak memiliki endosperm yang menyebabkan biji tersebut tidak dapat tumbuh apabila disebarkan langsung ke tanah sebagaimana biji tanaman lain yang berendosperm. Biji anggrek memerlukan nutrisi untuk tumbuh dan ini dapat disediakan oleh media yang digunakan dalam kultur *in vitro*. Perbanyakan biji anggrek akan menghasilkan *protocorm like bodies* (PLB) atau plantlet yang memiliki sifat bervariasi jika dibandingkan dengan induknya.

Selain menggunakan biji, perbanyakan anggrek secara *in vitro* juga dapat dilakukan dengan menggunakan bagian vegetatif sebagai eksplan seperti buku batang, primordia tunas atau pucuk sehingga menghasilkan *protocorm like bodies* (PLB) atau plantlet yang bersifat sama dengan induknya. Metode ini menguntungkan terutama apabila sudah diketahui bentuk, ukuran dan warna bunga dari tanaman induk yang dijadikan sumber eksplan, karena anakan atau hasil regenerasi yang diperoleh akan bersifat sama dengan induknya. Tokuhara dan Mii (1993) telah menghasilkan lebih dari 10.000 PLB anggrek *Phalaenopsis* dan *Doritaenopsis* selama 1 tahun dengan mengkulturkan eksplan potongan pucuk pada media New Dogashima Medium (NDM) yang mengandung 1 mg/L BAP dan 0,1 mg/L NAA. Media NDM

mengandung beberapa vitamin dan bahan organik yang mendorong pembentukan PLB pada eksplan anggrek.

Upaya perbanyak anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro* telah dilakukan oleh Rineksane (2012) dan Sukarjan (2015) dengan menggunakan eksplan daun. Kalus telah diperoleh dari eksplan daun steril *Vanda tricolor* yang dikulturkan pada medium NDM dengan penambahan 0,5 mg/l Thidiazuron (Sukarjan, 2015). Namun demikian, kalus tersebut belum berkembang dan beregenerasi membentuk tunas. Oleh karena itu upaya memperbanyak *Vanda tricolor* akan dilakukan dengan menggunakan metode kultur *in vitro* dengan variasi eksplan, medium dan senyawa organik maupun anorganik untuk mendorong pertumbuhan dan multiplikasi anggrek. Silviasari (2010) menggunakan ekstrak ubi jalar 150 g/l efektif mempercepat saat muncul akar pada anggrek hasil persilangan intergenerik *Phalaenopsis 'pinlong' cinderella* x *V. tricolor*. Emulsi ikan sebanyak 2 ml/l juga menghasilkan akar terbanyak, daun terbanyak dan daun terlebar pada anggrek *Phalaenopsis 'pinlong' cinderella* x *V. tricolor*. Sementara David *et al.* (2015) menyatakan bahwa penggunaan medium Knudson C yang ditambah ekstrak tomat 10% atau 15% merupakan perlakuan terbaik untuk perkecambahan biji anggrek *Vanda helvola* Blume. Upaya perbanyak *Vanda tricolor* secara *in vitro* dapat dilakukan melalui proses organogenesis maupun embriogenesis dari eksplan biji maupun bagian vegetatif seperti daun, pucuk dan ujung akar.

Selain perbanyak bahan tanam, upaya pembesaran dan pemeliharaan plantlet *V. tricolor* selama aklimatisasi dan sesudahnya juga perlu dilakukan agar plantlet dan bibit anggrek yang dihasilkan dapat beradaptasi dengan lingkungan dan dikembalikan ke habitat aslinya di kawasan lereng Merapi. Tirta (2006) menyatakan bahwa media campuran pakis dan kadaka (1:1) ditambah pupuk daun inabio 2,5 ml/l mampu meningkatkan pertumbuhan vegetatif anggrek *Dendrobium macrophyllum* secara *ex vitro*. Sementara Andalasari dkk (2014) menyatakan bahwa arang, serbuk gergaji + sekam, kulit pohon akasia dan kulit pohon kelapa dapat digunakan sebagai media tanam anggrek *ex vitro* sebagaimana media pakis. Penggunaan pupuk daun Gandasil lebih baik daripada Hyponex. Hasil penelitian Sari dkk (2011) menunjukkan bahwa konsentrasi pupuk daun sebesar 1g/l dan pemberian air 10 ml/pot secara nyata berpengaruh terhadap bobot segar tanaman anggrek *Dendrobium undulatum* umur 7 bulan setelah aklimatisasi. Volume pemberian air sebanyak 10 ml/pot memberikan pertumbuhan luas daun, tinggi tanaman dan bobot segar tanaman anggrek *Dendrobium undulatum* yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian air 15 ml/pot atau 20 ml/pot.

## **Tujuan Khusus**

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk menghasilkan plantlet anggrek *Vanda tricolor* dari eksplan biji, daun dan tunas melalui proses organogenesis dan embriogenesis dengan menggunakan teknik kultur *in vitro*. Teknik produksi plantlet tersebut diharapkan akan menjadi alternatif penyediaan bahan tanam yang lebih baik, lebih banyak dan lebih cepat untuk konservasi atau pengembalian anggrek *Vanda tricolor* ke habitat aslinya. Penelitian ini juga bertujuan untuk memformulasikan teknik pemeliharaan anggrek *Vanda tricolor* pasca aklimatisasi untuk meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan dari anggrek tersebut.

## **Urgensi Penelitian**

Penelitian ini akan mempunyai pengaruh sangat penting, baik dari segi aplikasi praktis maupun ilmiah, karena penelitian akan diarahkan untuk menghasilkan bahan tanam yang lebih banyak, lebih cepat dan lebih baik untuk konservasi anggrek *Vanda tricolor*. Hasil penelitian ini akan diperoleh eksplan dan metode terbaik untuk mendapatkan plantlet *Vanda tricolor*. Dengan menggunakan teknik perbanyakan *in vitro*, maka diharapkan penyediaan bahan tanam *Vanda tricolor* menjadi lebih mudah dan tersedia sepanjang tahun. Bahan tanam yang tersedia dengan mudah dapat digunakan untuk mengembalikan populasi *Vanda tricolor* di habitat aslinya. Teknik pemeliharaan untuk meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan *Vanda tricolor* pasca aklimatisasi diharapkan dapat meningkatkan daya hidup anggrek tersebut sehingga upaya pengembalian populasi *Vanda tricolor* ke habitat aslinya di lereng Merapi dapat terwujud. Teknik perbanyakan *ex vitro* yang juga digunakan dan metode yang diperoleh dalam penelitian ini dapat diterapkan oleh petani anggrek atau masyarakat di lereng Merapi sehingga konservasi anggrek *Vanda tricolor* dapat dilakukan secara mandiri oleh masyarakat di lingkungan habitat anggrek tersebut.

Selain penting dari sisi penerapan, penelitian ini juga berkontribusi dalam pengembangan ilmu. Penelitian ini akan memberikan sumbangan penting terhadap pemahaman kultur *in vitro* dan *ex vitro* *Vanda tricolor*, metode pemeliharaan untuk meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan dari anggrek yang diperoleh dan metode konservasi yang dilakukan dapat dijadikan acuan untuk konservasi dan pemeliharaan anggrek asli lainnya. Bagi perguruan tinggi penelitian ini penting karena hasil penelitian ini akan menunjukkan keterlibatan langsung dari perguruan tinggi dalam mengembangkan teknologi berkelanjutan yang dapat diterapkan pada lingkungan atau masyarakat sekitar. Penelitian ini juga sesuai dengan salah satu tema penelitian unggulan dalam *roadmap* penelitian perguruan

tinggi maupun program studi, yaitu pertanian berkelanjutan berdasar pada kearifan lokal. Bahan tanam yang diperoleh akan dikembalikan hasil perbanyakannya ke kawasan Lereng Gunung Merapi sebagai kearifan lokal di mana Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY) berada dan akan menjadi bukti peran serta keterlibatan UMY dalam melestarikan tanaman di habitatnya.

### Temuan dan Luaran

Temuan yang diharapkan dari penelitian ini adalah plantlet Anggrek *Vanda tricolor* dari organogenesis maupun embriogenesis hasil perpaduan eksplan terbaik, medium tumbuh dan kombinasi hormon terbaik. Luaran yang ditargetkan adalah publikasi di jurnal nasional, internasional serta prosiding seminar ilmiah nasional maupun internasional (Tabel 1).

**Tabel 1. Rencana Target Capaian Tahunan**

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian				
			TS0	TS+1	TS+2	TS+3	TS+4
1	Publikasi Ilmiah <sup>2)</sup>	Internasional	Draf	Submitted	Accepted dan Draf	Published dan Accepted	Published 2 artikel
		Nasional terakreditasi	Draf	Accepted dan Draf	Published dan Submitted	Accepted	Published 2 artikel
2	Pemakalah dalam temu ilmiah <sup>3)</sup>	Internasional	Draft	Sudah dilaksanakan	Draft	Sudah dilaksanakan	Tidak ada
		Nasional	Sudah dilaksanakan	Draft	Sudah dilaksanakan	Tidak ada	Tidak ada
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu ilmiah <sup>4)</sup>	Internasional	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Nasional	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
4	<i>Visiting Lecturer</i> <sup>5)</sup>	Internasional	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
5	Hak Kekayaan Intelektual (HAKI) <sup>6)</sup>	Paten	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Paten Sederhana	Tidak ada	Tidak ada	draf	terdaftar	Granted
		Hak Cipta	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Merek Dagang	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Rahasia Dagang	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada

		Desain Produk Industri	Tidak ada				
		Indikasi Geografis	Tidak ada				
		Perlindungan Varietas Tanaman	Tidak ada				
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu	Tidak ada				
6	Teknologi Tepat Guna <sup>7)</sup>		draf	draft	penerapan	penerapan	produk
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial <sup>8)</sup>		Tidak ada				
8	Buku Ajar (ISBN) <sup>9)</sup>		Tidak ada				
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) <sup>10)</sup>		1	2	3	4	5

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### *Anggrek Vanda tricolor*

*Vanda tricolor* merupakan nama latin untuk anggrek Merapi yang merupakan tanaman anggrek spesies asli Indonesia yang tumbuh secara alami di tanah humus hutan yang lembab. Pola pertumbuhan anggrek ini tergolong tipe monopodial dimana batang tumbuh ke atas dan daunnya akan ikut tumbuh seiring dengan pertumbuhan batang selama hidupnya. Tanaman anggrek Merapi tergolong tanaman anggrek langka dan dalam ancaman kepunahan karena bunganya yang eksotik mencolok dan mempunyai bentuk tubuh yang besar sehingga mudah didapat oleh pemburu bunga. Selain itu, pengembangbiakan anggrek Merapi sulit karena untuk memperoleh biji tanaman ini memerlukan rentang waktu yang lama. *Vanda tricolor* forma Merapi terkenal dengan sebutan anggrek Merapi karena tanaman ini tumbuh subur di lereng Merapi, sehingga tanaman anggrek ini disebut dengan anggrek Merapi. Tanaman ini memiliki bunga berwarna putih dengan bentol berwarna ungu yang menjadi ciri khas dari anggrek ini. Perbanyakan tanaman anggrek Merapi ini belum banyak dilaporkan, perbanyakan secara konvensional yang membutuhkan waktu yang lama dan tingkat keberhasilan yang kecil merupakan salah satu faktor perbanyakan tanaman anggrek ini jarang dilakukan. Upaya memperbanyak *Vanda tricolor* dapat dilakukan salah satunya menggunakan metode kultur *in vitro*.

## **Kultur *In Vitro***

Tanaman umumnya dapat diperbanyak secara generatif maupun vegetatif. Perbanyak generatif akan menghasilkan tanaman baru yang secara genetik tidak sama dengan induknya, sementara melalui perbanyak vegetatif dapat diperoleh tanaman yang sama dengan induknya. Salah satu metode perbanyak vegetatif tanaman dapat dilakukan melalui kultur *in vitro*. Teknik kultur *in vitro* menurut Gunawan (1987) merupakan teknik untuk mengisolasi sel, jaringan atau organ dan menumbuhkannya dalam media yang kaya nutrisi dalam wadah gelas pada lingkungan aseptik dan terkendali sehingga bagian tanaman tersebut dapat beregenerasi dan berkembang menjadi tanaman utuh kembali. Keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh sumber eksplan, komposisi media yang tepat, zat pengatur tumbuh, sterilisasi dan lingkungan fisik seperti cahaya dan temperatur. Media kultur *in vitro* menyediakan tidak hanya unsur hara makro dan mikro, tetapi juga karbohidrat yang pada umumnya berupa gula untuk menggantikan karbon yang biasanya didapat dari atmosfer melalui fotosintesis. Di antara sekian banyak komposisi media yang sudah ditemukan, media VW (Vacint and Went) adalah media yang paling sering digunakan untuk perbanyak anggrek secara *in vitro* (George, 1993; Gunawan, 2007). Dalam perkembangannya, media tumbuh yang mengandung vitamin dan bahan organik lengkap telah digunakan dan berhasil menumbuhkan bagian vegetatif anggrek yaitu media New Dogashima Medium (NDM) (Tokuhara and Mii, 1993).

Mishiba *et al.* (2001) telah meningkatkan poliploidi pada anggrek *Doritaenopsis* yang dikulturkan dalam media NDM dengan penambahan 2,4-D. Sementara Benzylamino purine (BAP) dan Thidiazuron dapat melipatgandakan dan meningkatkan pertumbuhan PLB anggrek *Phalaenopsis gigantea* dalam media NDM (Latip *et al.*, 2010). Pembentukan PLB anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro* telah dilakukan dengan mengkulturkan mata tunas aksiler pada media MS yang mengandung 1/3 konsentrasi  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dan  $\text{KNO}_3$  serta 1 mg/L BAP (Tanjung dkk, 2010). Sementara penggunaan media NDM untuk memperbanyak anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro* belum dilaporkan.

Rineksane (2012) dan Sukarjan (2015) telah melakukan perbanyak anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro* dengan menggunakan eksplan daun. Kalus telah diperoleh dari eksplan daun steril *Vanda tricolor* yang dikulturkan pada medium NDM dengan penambahan 0,5 mg/l Thidiazuron (Sukarjan, 2015). Namun demikian, kalus tersebut belum berkembang dan beregenerasi membentuk tunas. Oleh karena itu upaya memperbanyak *Vanda tricolor* akan dilakukan dengan menggunakan metode kultur *in vitro* untuk mendorong pertumbuhan

dan multiplikasi anggrek dengan variasi eksplan, medium dan senyawa organik maupun anorganik. Silviasari (2010) menggunakan ekstrak ubi jalar 150 g/l efektif mempercepat saat muncul akar pada anggrek hasil persilangan intergenerik *Phalaenopsis 'pinlong' cinderella* x *V. tricolor*. Emulsi ikan sebanyak 2 ml/l juga menghasilkan akar terbanyak, daun terbanyak dan daun terlebar pada anggrek *Phalaenopsis 'pinlong' cinderella* x *V. tricolor*. Sementara David *et al.* (2015) menyatakan bahwa penggunaan medium Knudson C yang ditambah ekstrak tomat 10% atau 15% merupakan perlakuan terbaik untuk perkecambahan biji anggrek *Vanda helvola* Blume.

### **Aklimatisasi**

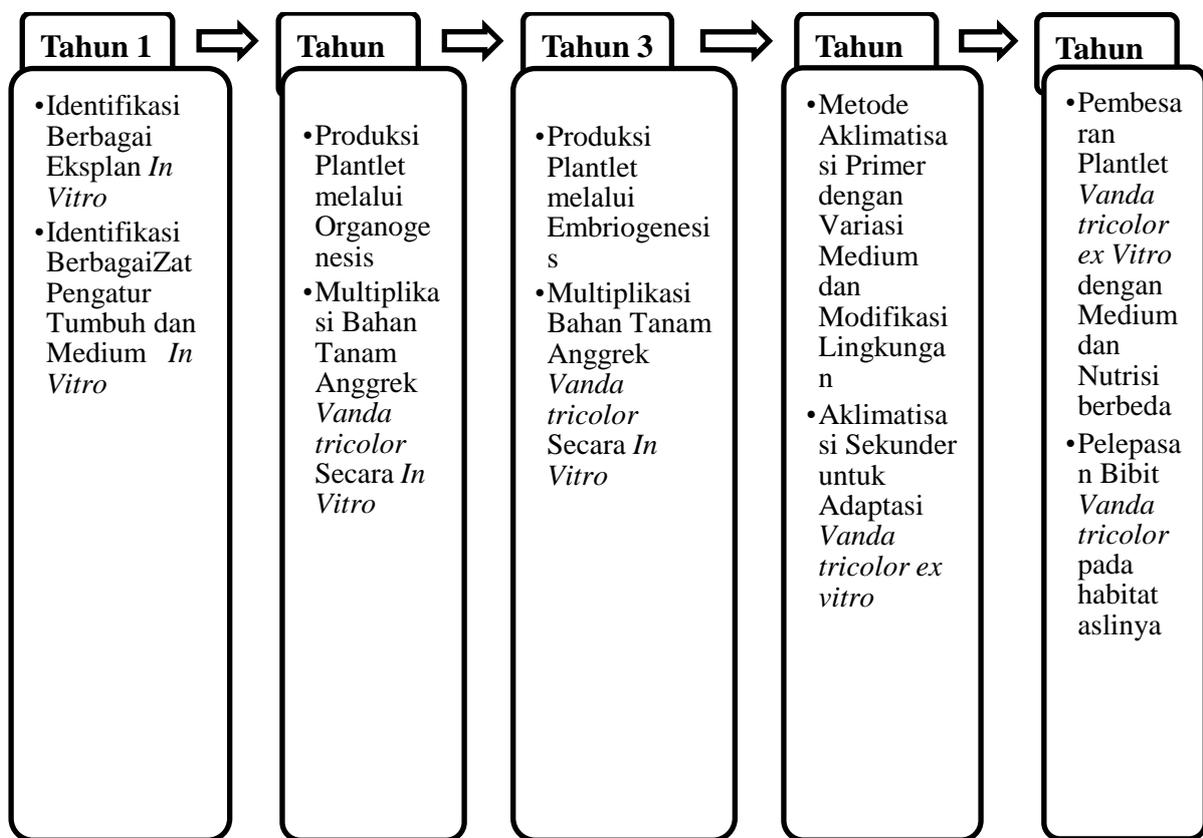
Keberhasilan perbanyak kultur *in vitro* salah satunya ditunjukkan oleh kemampuan plantlet beradaptasi dengan lingkungan tumbuh yang tidak steril pada tahap aklimatisasi. Oleh karena itu pembesaran dan pemeliharaan plantlet *V. tricolor* selama aklimatisasi dan sesudahnya juga perlu dilakukan agar plantlet dan bibit anggrek yang dihasilkan dapat beradaptasi dengan lingkungan dan dikembalikan ke habitat aslinya di kawasan lereng Merapi. Penelitian yang dilakukan oleh Tirta (2006) menunjukkan bahwa media campuran pakis dan kadaka (1:1) ditambah pupuk daun inabio 2,5 ml/l mampu meningkatkan pertumbuhan vegetatif anggrek *Dendrobium macrophyllum* secara *ex vitro*. Sementara arang, serbuk gergaji + sekam, kulit pohon akasia dan kulit pohon kelapa dapat digunakan sebagai media tanam anggrek *ex vitro* sebagaimana media pakis (Andalasari dkk, 2014). Penggunaan pupuk daun Gandasil lebih baik daripada Hyponex. Hasil penelitian Sari dkk (2011) menunjukkan bahwa konsentrasi pupuk daun sebesar 1g/l dan pemberian air 10 ml/pot secara nyata berpengaruh terhadap bobot segar tanaman anggrek *Dendrobium undulatum* umur 7 bulan setelah aklimatisasi. Volume pemberian air sebanyak 10 ml/pot memberikan pertumbuhan luas daun, tinggi tanaman dan bobot segar tanaman anggrek *Dendrobium undulatum* yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian air 15 ml/pot atau 20 ml/pot.

Pengusul tertarik meneliti *Vanda tricolor* karena merupakan anggrek endemik kawasan Merapi yang lokasinya relatif dekat dengan perguruan tinggi pengusul. Upaya memperbanyak dan mengembalikan *Vanda tricolor* ke habitat aslinya di lereng Merapi pasca erupsi Merapi telah mengacu pada salah satu bidang unggulan perguruan tinggi yaitu Lingkungan dan Bencana dengan tema Pertanian Berkelanjutan Berbasis Kearifan Lokal. Peneliti juga telah melakukan penelitian kultur *in vitro* *Vanda tricolor* (Rineksane, 2012) dengan *roadmap* yang jelas dan dilanjutkan pada usulan yang diajukan ini sehingga tujuan akhir penelitian akan tercapai.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian tahun pertama mendasari penggunaan bahan tanam pada tahun berikutnya. Penelitian tahun pertama dilaksanakan berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, yaitu penggunaan eksplan daun *Vanda tricolor in vitro* memberikan efek pembesaran daun lebih baik dibandingkan daun *ex vitro* (Rineksane, 2012). Selanjutnya potongan daun *Vanda tricolor in vitro* menghasilkan kalus pada medium NDM dengan penambahan Thidiazuron (Rineksane dan Sukarjan, 2015).

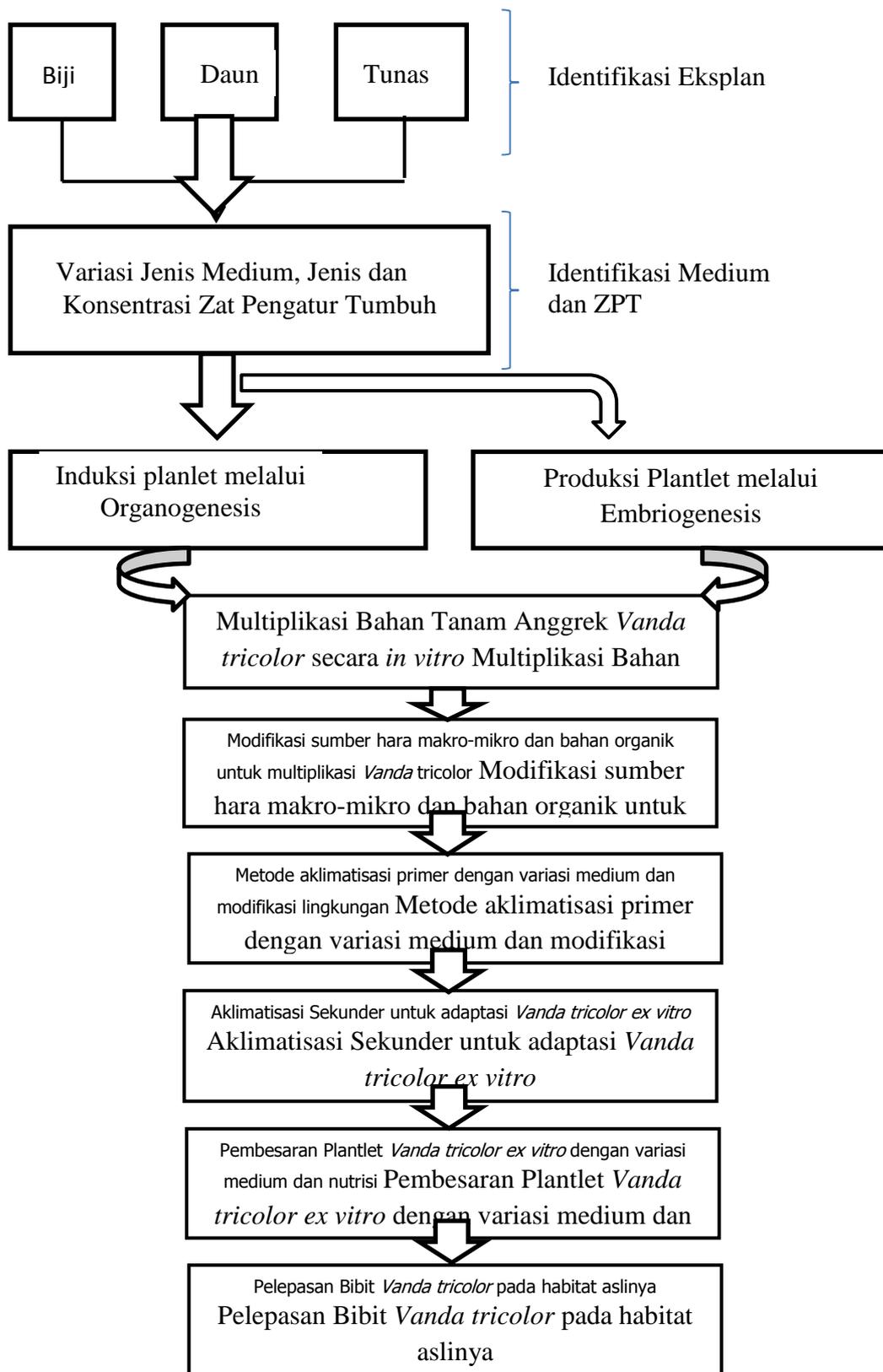
Secara ringkas, tahapan penelitian setiap tahun, luaran dan indikator capaian disajikan pada gambar 1 dan gambar 2.



<b>Tahun 1</b> <b>Luaran:</b> 1. Draf publikasi internasional dan nasional 2. Makalah pertemuan ilmiah nasional	<b>Tahun 2</b> <b>Luaran:</b> 1. Submitted publikasi internasional 2. Publikasi nasional 3. Makalah pertemuan ilmiah internasional	<b>Tahun 3</b> <b>Luaran:</b> 1. Publikasi internasional 2. Submitted publikasi nasional 3. Makalah pertemuan ilmiah nasional	<b>Tahun 4</b> <b>Luaran:</b> 1. Publikasi nasional dan internasional accepted 2. Makalah pertemuan ilmiah internasional	<b>Tahun 5</b> <b>Luaran:</b> 1. Publikasi nasional dan internasional
<b>Indikator Capaian:</b> 1. Diperoleh	<b>Indikator Capaian:</b> 1. Diperoleh	<b>Indikator Capaian:</b> 1. Diperoleh	<b>Indikator Capaian:</b> 1. Diperoleh	<b>Indikator Capaian:</b> 1. Diperoleh

eksplan terbaik untuk perbanyakkan <i>in vitro</i> 2. Diperoleh medium terbaik untuk perbanyakkan <i>in vitro</i> 3. Diperoleh Zat pengatur tumbuh terbaik untuk perbanyakkan <i>in vitro</i>	plantlet <i>Vanda tricolor</i> hasil organogenesis 2. Diperoleh hasil multiplikasi <i>Vanda tricolor</i>	plantlet <i>Vanda tricolor</i> hasil embriogenesis 2. Diperoleh hasil multiplikasi <i>Vanda tricolor</i>	metode aklimatisasi <i>Vanda tricolor</i> 2. Diperoleh <i>Vanda tricolor</i> yang telah beradaptasi dengan kondisi <i>ex vitro</i>	metode pemeliharaan <i>Vanda tricolor</i> pasca aklimatisasi pada habitat aslinya 2. Tanaman <i>Vanda tricolor</i> telah beradaptasi dengan habitat aslinya
---	---	---	---	--

Gambar 1. Tahapan, Luaran dan Indikator Capaian Penelitian Tahun 1- 5



Gambar 2. Bagan Alur Penelitian Tahun 1 – Tahun 5

## **Pelaksanaan Penelitian**

### **Tahun 1**

Identifikasi eksplan terbaik, medium terbaik dan zat pengatur tumbuh terbaik dilakukan melalui penelitian laboratorium dengan berbagai perlakuan eksplan (tunas, daun, potongan akar, biji), medium (MS, VW, NDM) dan ZPT (BAP, TDZ, NAA, IBA). Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktor tunggal dan faktorial. Setiap perlakuan yang diuji diulang 10 kali. Parameter pengamatan meliputi parameter pertumbuhan eksplan dalam medium kultur *in vitro*. Pengamatan dilakukan minimal 4 bulan agar dapat diperoleh pertumbuhan eksplan sesuai dengan tujuan percobaan.

#### **A. Persiapan Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Laminar Air Flow Cabinet*, Autoklaf, Pembagi Media, *Hot plate magnetic stirrer*, *syringe*, *milipore*, peralatan gelas dan *dissecting kits*.



Gambar 1. Eksplan *Vanda tricolor* steril berumur 6 bulan

#### **B. Pembuatan Media**

Pembuatan media dilakukan dengan mencampurkan medium *powder* yang meliputi medium Vacint and Went (VW), Murashige and Skoog (MS) maupun New Dogashima Medium (NDM) dengan akuades steril. Kemudian ke dalam media ditambahkan sukrosa, zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan. Selanjutnya medium diukur pH sehingga pH menjadi 6. Sebelum dituang dalam botol kultur dan diautoklaf, ke dalam medium ditambahkan agar sesuai kebutuhan.



Gambar 2. Medium VW dengan penambahan Thidiazuron (0 – 2 mg/l) dan NAA (0-0,5 mg/l)

### C. Inokulasi

Eksplan yang digunakan berupa tunas anggrek *Vanda tricolor* steril yang diambil dari koleksi anggrek botolan. Setiap tunas dihilangkan akar dan sebagian daun dipotong, sehingga diperoleh eksplan yang siap diinokulasi. Sebelum diinokulasi, eksplan tunas terlebih dahulu disterilkan dengan merendam tunas dalam larutan klorox 5% selama 5 menit.



Gambar 3. Eksplan tunas *Vanda tricolor in vitro* yang telah dihilangkan akar dan ujung daun

### D. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati meliputi persentase eksplan hidup, persentase eksplan terkontaminasi, persentase eksplan browning, persentase eksplan bertunas, saat muncul tunas,

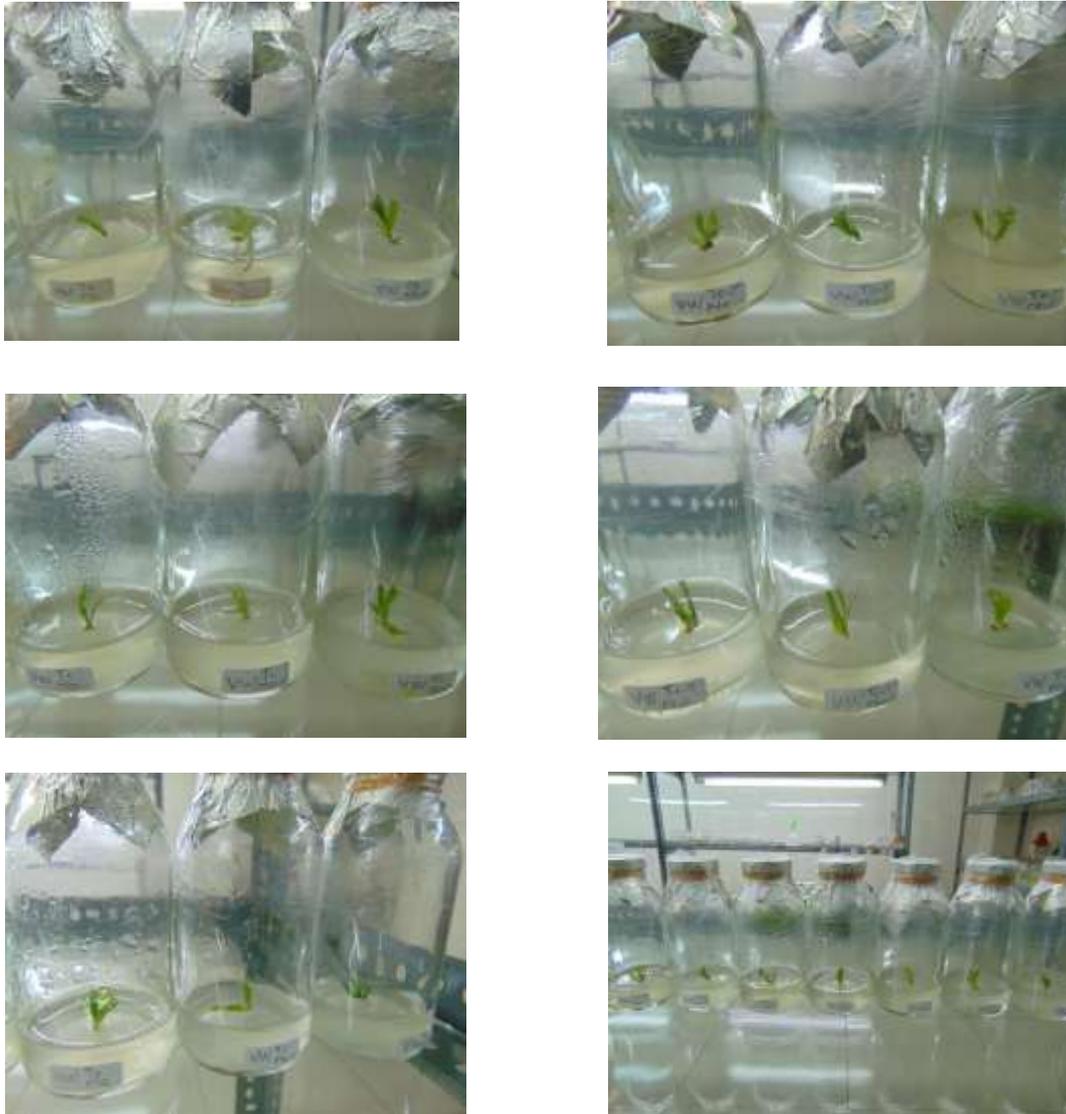
jumlah tunas, tinggi tunas, jumlah daun, saat muncul kalus, diameter kalus, saat eksplan berakar, jumlah akar, panjang akar.

### **E. Analisis Data**

Analisis Data dilakukan jika pengamatan sudah selesai sampai minggu ke-12. Analisis data belum dilakukan pada penelitian ini karena pengamatan belum selesai dilakukan.

#### BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian telah dilaksanakan mulai bulan Juni 2017, dan saat ini masih dalam tahap pengamatan. Hasil pengamatan sementara yang diperoleh ditunjukkan pada gambar berikut:



Gambar 4. Eksplan daun *Vanda tricolor in vitro* diinokulasi pada berbagai media perlakuan

## REFERENSI

- Andalasari, T.D., Yafisham dan Nuraini. 2014. Respon Pertumbuhan Anggrek *Dendrobium* terhadap Jenis Media Tanam dan Pupuk Daun. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan* Vol. 14(1):76-82.
- David, D., R. Jawan, H. Marbawi and J.A. Gansau. 2015. Organic Additives Improves the *in Vitro* Growth of Native Orchid *Vanda helvola* Blume. *Notulae Scientia Biologicae* &(2):192-197. DOI:10.15835/nsb.7.29546.
- George. E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd. England.
- Gunawan, L.W. 1987. *Teknik Kultur Jaringan*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB. Bogor.
- Latip dan Murdad. 2010. Effects of N-Benzyladenine and Thidiazuron on Proliferation of *Phalaenopsis gigantea* Protocorms. *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* Vol. 18(1).
- Metusala. 2006. Melirik Konservasi Anggrek *Vanda tricolor* L. var. *suavis* di Merapi. <http://www.anggrek.org/melirik-konservasi-anggrek-vanda-tricolor-di-merapi-2.html>.
- Pierik, L.R.M. 1997. *In Vitro Culture of Higher Plant*. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht. Netherland.
- Rineksane, I.A. 2012. Regenerasi Anggrek *Vanda tricolor* Pasca Erupsi Merapi Melalui Kultur *In Vitro*. Laporan Peneltian. Tidak dipublikasikan.
- Sari, E.R., C. Udayana dan T. Wardiyati. 2011. Pengaruh Volume Pemberian Air dan Konsentrasi Pupuk Daun terhadap Pertumbuhan Vegetatif Tanaman Anggrek *Dendrobium undulatum*. *Buana Sains* 11(1):77-82.
- Silviasari, A. D. (2010). Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Ubi Jalar dan Emulsi Ikan Terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek *Dendrobium Alice Noda X Dendrobium Tomie Dan Phalaenopsis Pinlong Cinderella X Vanda tricolor* Pada Medium Vacin Dan Went. Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Tirta. I.G. 2006. Pengaruh Beberapa Jenis Media Tanam dan Pupuk Daun terhadap Pertumbuhan Vegetatif Anggrek Jamrud (*Dendrobium macrophyllum* A. Rich.). *Biodiversitas* 7(1):81-84. DOI:10.13057/biodiv/d070120.
- Tokuhara, K dan M. Mii. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by Culturing Shoot Tips of Flower Stalk Buds. *Plant Cell Reports* 13:7-11.

## LAMPIRAN-LAMPIRAN

### Lampiran 2. Dukungan Sarana dan Prasarana Penelitian

No	Sarana dan Prasarana	Ketersediaan	Keterangan
1	Laminar Air Flow Cabinet	Ada	Milik institusi sendiri
2	Autoklaf kapasitas 50 L	Ada	Milik institusi sendiri
3	Shaker	Ada	Milik institusi sendiri
4	Microwave	Ada	Milik institusi sendiri
5	Ruang aklimatisasi	Ada	Milik institusi sendiri
6	Wheaton unispense untuk medium	Ada	Milik institusi sendiri
7	Hot plate magnetic stirer	Ada	Milik institusi sendiri
8	Mikroskop inverted	Tidak ada	Sewa di Fakultas Biologi UGM
9	Peralatan mikroteknik	Tidak ada	Sewa di Fakultas Biologi UGM
10	Lahan uji coba di lereng Gunung Merapi	Tidak ada	Sewa di Titi Orchid

### Lampiran 3. Susunan Organisasi dan Pembagian Tugas Tim Peneliti

No	Nama / NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu (jam/minggu)	Uraian Tugas
1	Dr. Innaka Ageng Rineksane, S.P., M.P. / 0512107201	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta	Kultur In Vitro / Hortikultura	10	<ul style="list-style-type: none"><li>- Mengkoordinasi persiapan, pelaksanaan dan pengambilan data penelitian di laboratorium maupun di lapangan</li><li>- Mengkoordinasi penyusunan laporan akhir penelitian, publikasi hasil penelitian dalam seminar nasional/prosiding.</li><li>- Bertanggung jawab terhadap hasil pelaporan penelitian mulai dari laporan harian, laporan kemajuan, laporan akhir dan penggunaan anggaran peneliti</li></ul>

					an
2	Dr. Ir. Gatot Supangkat, M.P. / 0023106201	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta	Agronomi/Fisiologi Tanaman	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Membantu ketua mengkoordinasi persiapan, pelaksanaan dan pengambilan data penelitian di laboratorium maupun di lapangan</li> <li>- Membantu ketua mengkoordinasi penyusunan laporan akhir penelitian, publikasi hasil penelitian dalam seminar nasional/prosiding.</li> <li>- Turut bertanggung jawab terhadap hasil pelaporan penelitian mulai dari laporan harian, laporan kemajuan, laporan akhir dan penggunaan anggaran penelitian</li> </ul>
3	Ir. Agung Astuti, M.Si / 0523096201	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta	Mikrobiologi / Bioteknologi Pertanian	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Membantu ketua mengkoordinasi persiapan, pelaksanaan dan pengambilan data penelitian di laboratorium maupun di lapangan</li> <li>- Membantu ketua mengkoordinasi penyusunan laporan akhir penelitian, publikasi hasil penelitian dalam seminar nasional/prosiding.</li> <li>- Turut</li> </ul>

					bertanggung jawab terhadap hasil pelaporan penelitian mulai dari laporan harian, laporan kemajuan, laporan akhir dan penggunaan anggaran penelitian
--	--	--	--	--	---