

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kultur *In Vitro* Anggrek *Vanda tricolor*

Anggrek genus vanda merupakan anggrek dengan variasi bentuk dan warna yang banyak. Anggrek ini diklasifikasikan menjadi 40 spesies yang keberadaannya tersebar mulai dari India bagian timur, Sri Langka, Myanmar, Thailand, Indochina, Filipina, Malaysia, Papua Nugini, Indonesia hingga Australia. Dari ke-40 spesies yang ada, sekitar 20 spesies berada di kepulauan Indonesia yang menyebar di hutan-hutan tropis di Pulau Jawa, Bali, Sumatra, Kalimantan, Maluku dan Papua (Hardjo, 2017). Anggrek *Vanda tricolor* memiliki bunga yang sangat indah berwarna dasar putih, dengan pola totol-totol berwarna ungu kecokelatan pada sepal dan *petalnya dan labellum* berwarna ungu bergradasi merah sampai merah muda, serta anggrek ini berbau harum.

Secara umum, klasifikasi anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* menurut Dressler dan Dodson (1960) sebagai berikut : Kingdom : *Plantae* ; Divisi : *Spermatophyta*; Sub Divisi : *Angiospermae* Kelas : *Monocotyledoneae* Ordo : *Orchidales* Famili : *Orchidaceae* Genus : *Vanda* Spesies : *Vanda tricolor* Lindl. var. *Suavis*. Anggrek *V. tricolor* merupakan tanaman monopodial, yaitu anggrek yang memiliki pola tumbuh dengan batang utamanya akan terus tumbuh ke atas dan akan memunculkan bunga di ketiak daunnya sebagai cabang samping (Lestari, 2006). Tanaman anggrek merupakan tanaman berbunga yang memiliki famili terbesar di dunia, yang mencakup kurang lebih 800 generasi yaitu meliputi lebih dari 5000 species dan di antaranya terdapat di Indonesia (Irawati, 2002). Menurut Hendaryono (1994) anggrek *Vanda tricolor* bersifat epifit yaitu tanaman yang bisa

tumbuh menempel pada batang, ranting, dan dahan tanaman yang masih hidup. Anggrek *Vanda tricolor* adalah jenis anggrek yang epifit, anggrek ini berkembang biak dengan menumpang pada tanaman lain, namun tidak merugikan tanaman yang ditumpanginya. Akarnya digunakan sebagai alat untuk menempel (Ashari, 1995). Akar yang menempel pada batang berbentuk mendatar mengikuti permukaan batang, rambut akarnya pendek. Didalam akar ini mempunyai jaringan velamen untuk memudahkan akar menyerap air hujan yang jatuh ke pohon inang. Velamen sebagai alat pernafasan. Velamen ini terdiri dari jaringan bunga karang dengan selubung luar selaput warna putih dan sel-selnya berisi udara (Gunadi, 1977).

Perbanyakan tanaman anggrek dapat dilakukan secara generatif (biji) maupun vegetatif. Perbanyakan secara vegetatif dilakukan dengan repotting (pemisahan rumpun) dan kultur *in vitro*, sedangkan perbanyakan secara generatif yaitu dengan menggunakan biji. Namun, perkembangbiakan secara generatif dengan menggunakan biji. Namun, perkembangbiakan generatif ini memerlukan waktu yang lama dikarenakan embrio atau biji anggrek bukan biji yang sempurna dan tidak punya cadangan makanan untuk pertumbuhan embrionya. Maka dari itu untuk menumbuhkan biji anggrek mempunyai tingkat kesulitan yang tinggi (Handayani dan Isnawan (2015). Dengan demikian, perbanyakan tanaman anggrek melalui *in vitro* merupakan cara atau teknik perbanyakan yang lebih tepat karena dengan teknik kultur *in vitro* mampu meregenerasi tanaman yang sama dengan induknya dan tidak memerlukan tempat yang luas.

Kultur *in vitro* adalah teknik mengisolasi bagian tanaman dengan menumbuhkannya didalam media buatan yang telah diisi nutrisi lengkap di

lingkungan yang steril sehingga bagian tanaman dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (George,1993). Perbanyak tanaman secara kultur *in vitro* antara lain dapat dilakukan melalui embriogenesis somatik, regenerasi organ adventif, pembentukan cabang aksilar dan kultur buku tunggal (Pierik, 1987).

Medium tumbuh sangat mempengaruhi keberhasilan dalam kultur *in vitro*. Unsur hara esensial adalah unsur hara yang diperlukan oleh tanaman untuk menyelesaikan siklus hidupnya, yang mana fungsi unsur hara tersebut tidak dapat digantikan oleh unsur yang lain dan diperlukan dalam proses metabolisme tanaman sebagai komponen molekul anorganik atau sebagai kofaktor dalam reaksi enzim (Orcutt and Nilsen, 2000).

Dalam medium kultur *in vitro* zat pengatur tumbuh umumnya selalu diberikan untuk memacu pertumbuhan dan perkembangan eksplan itu sendiri. Zat pengatur tumbuh atau ZPT yang umum digunakan untuk perbanyak tanaman ialah dari golongan auksin dan sitokinin (Husni, 1997). Komponen media yang menentukan keberhasilan dalam kultur *in vitro* yaitu dilihat dari konsentrasi dan jenis ZPT yang digunakan. BAP (*6-benzyl amino purine*) sangat baik dan aktif dalam memacu pertumbuhan tanaman karena tidak mudah dirombak oleh enzim didalam tanaman (George dan Sherrington, 1984).

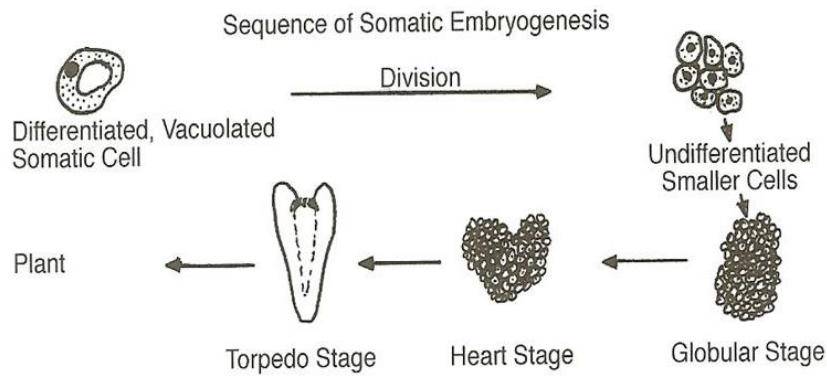
Hendaryono dan Wijayani (1994) mengemukakan bahwa kultur *in vitro* memiliki presentase keberhasilan lebih besar apabila menggunakan jaringan meristem. Jaringan meristem merupakan jaringan muda, yang terdiri dari sel-sel yang terus membelah, dindingnya tipis belum mempunyai penebalan dari zat pektin, plasma nya penuh dan vakuola kecil.

Penelitian ini akan menggunakan eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor*. Somatik embriogenesis menawarkan protokol alternatif dan efisien dalam regenerasi tanaman (Xie *et al.*, 2013).

B. Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik adalah proses di mana sel somatik berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio tanpa melalui fusi gamet. Embrio somatik dicirikan dengan struktur yang bipolar, yang mempunyai dua meristem yaitu meristem akar dan meristem tunas. Struktur tersebut maka perbanyak embrio somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif yang unipolar. Tahap perkembangan embrio somatik menyerupai embrio zigotik. Tahap perkembangan tersebut dimulai dari fase globular, fase hati, fase torpedo, dan planlet (Gaj, 2001).

Embriogenesis memiliki beberapa tahap yaitu (1) induksi sel dan kalus embriogenik, (2) pendewasaan, (3) perkecambahan, dan (4) hardening. Pada tahap induksi kalus embriogenik dilakukan isolasi eksplan dan penanaman pada media tumbuh. Induksi kalus embriogenik ditumbuhkan pada media yang mengandung auksin dengan konsentrasi tinggi. Hasil penelitian menunjukkan 2,4 D adalah auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik. Zat pengatur tumbuh tersebut adalah auksin sintesis yang kuat dan tahan terhadap degradasi enzimatik dan fotooksidasi. Selain auksin, sitokinin seperti benzil adenin (BA) atau kinetin secara bersamaan (Bhojwani dan Razdan, 1989).



Gambar 1. Perkembangan Embriosomatik

Pemilihan medium tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, selera, tujuan serta perhitungan masing-masing peneliti. Hal tersebut dikarenakan keadaan media akan mempengaruhi pertumbuhan kultur, maka dari itu isi dan komposisi dari medium kultur dirancang secara khusus untuk tujuan yang berbeda. Salah satu media yang umum digunakan dalam kultur *in vitro* yaitu medium padat dan cair. Media padat pada umumnya berupa padatan gel, seperti agar, dimana nutrisi dicampurkan pada agar sedangkan media cair adalah nutrisi yang dilarutkan di air. Media cair dapat bersifat tenang atau dalam kondisi selalu bergerak, tergantung kebutuhan (Anonim, 2018). Komposisi media yang digunakan dalam kultur jaringan dapat berbeda komposisinya. Perbedaan komposisi media dapat mengakibatkan perbedaan pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditumbuhkan secara *in vitro*. Jenis ZPT yang banyak digunakan pada perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik adalah dari golongan auksin dan sitokinin (Utami *et al.*, 2007). Penelitian terdapat pengaruh pemberian NAA terhadap embriogenesis somatik anggrek bulan *Ph amabilis (L) Bl*. Konsentrasi NAA yang optimal untuk induksi pembentukan kalus embriogenik dan inisiasi embrio somatik

adalah 2 mg/L. Embrio somatik terbentuk secara tidak langsung melalui tahap kalus (Utami dkk., 2007).

C. Zat Pengatur Tumbuh

Zat Pengatur Tumbuh yang dapat menunjang pertumbuhan tanaman merupakan senyawa organik yang bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat untuk mendukung dan menghambat serta merubah proses fisiologi tumbuhan (Abidin, 1995)

Salah satu zat pengatur tumbuh yang ditemukan pada tanaman adalah sitokinin. Salah satu jenisnya adalah BAP (6 Benzylaminopurine). Sitokinin berfungsi memacu pembesaran sel kotiledon dan daun tumbuhan dikotil. Kotiledon akan menjadi organ fotosintetis yang bagus. Bersama dengan auksin, sitokinin berfungsi dalam pertumbuhan sel meristem dan mempengaruhi perkembangan kuncup, batang, dan daun (Parnata, 2004).

BAP merupakan ZPT dalam golongan sitokinin yang berperan untuk menstimulasi pembelahan sel dan menginduksi pembentukan tunas (Suryowinoto, 1996). Peran khusus dari BAP adalah untuk induksi kalus, pertumbuhan kalus dan suspensi sel serta induksi morfogenesis. Pada konsentrasi yang lebih tinggi dapat digunakan untuk meningkatkan multiplikasi tunas, pucuk atau meristem.

George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa *6-Benzilaminopurine* atau BAP adalah salah satu sitokinin sintetik yang aktif dan daya rangsangannya lebih lama karena tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman. BAP memiliki struktur yang mirip dengan kinetin dan aktif dalam pertumbuhan

poliferasi kalus, sehingga BAP merupakan sitokinin yang paling aktif (Noggle dan Fritz, 1993).

Perbandingan konsentrasi sitokinin lebih besar dari auksin, maka akan menstimulasi pertumbuhan tunas dan daun. Namun apabila konsentrasi auksin lebih besar dari sitokinin maka akan mengakibatkan stimulasi pada pertumbuhan akar. Jika konsentrasi sitokinin itu sedang dan konsentrasi auksin rendah, maka akan terbentuk kalus (Abidin, 1993).

Sitokinin merupakan senyawa yang berfungsi untuk meningkatkan pembelahan sel dan pengaturan pertumbuhan. Sitokinin banyak ditemukan dalam tumbuhan, paling banyak ditemukan pada daerah meristem dan daerah dengan potensi tumbuh berkesinambungan termasuk akar, daun muda, buah yang berkembang, dan biji. Perannya dalam tumbuhan antara lain adalah untuk mengatur pembelahan sel, pembentukan organ, pembesaran sel dan organ, pencegahan kerusakan klorofil, pembentukan kloroplas, pembukaan dan penutupan stomata, dan perkembangan mata tunas dan pucuk (Harjadi, 2009).

2,4-dichlorophenoxy acid (2,4-D) merupakan ZPT dari golongan auksin yang sering digunakan pada teknik kultur jaringan tanaman karena bersifat stabil tidak mudah rusak oleh cahaya maupun pemanasan saat sterilisasi. Menurut Gill *et al.*, (2004) dalam Rianawati dkk., (2009), penggunaan ZPT 2,4-D pada *Phalaenopsis sp* L akan memicu terjadinya pembengkakan eksplan yang merupakan pemanjangan sel. Namun, tidak semua medium memberikan dampak yang sama pada irisan daun, medium yang memberikan respon pembengkakan hanya medium yang mengandung 0,5 mg/l

2,4-D. Dalam penelitian Winarto dkk., (2013) kalus sambiloto dengan eksplan potongan daun, menunjukkan bahwa 2,5 mg/l 2,4 D, 1,0 mg TDZ, 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l IAA dan 3% sukrosa mampu menginduksi pembentukan kalus lebih cepat dengan persentase regenerasi mencapai 32% dan jumlah embrio hingga 20 embrio per eksplan. Konsentrasi auksin yang paling baik dalam menginduksi perakaran pada tunas Anggrek *Dendrobium sp* adalah 2,4-D pada konsentrasi 0,75 ppm (Sulasiah dkk, 2015).

Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh sangat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman dalam kultur *in vitro*. Kandungan auksin seperti 2,4D yang tinggi berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus dan akar, kandungan sitokinin seperti BAP dan kinetin yang tinggi berpengaruh terhadap tunas (Neuenschwander dan Bauman, 1992; Castillo dan Smith, 1997; Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999).

Menurut Gati dan Mariska (1992), 2,4-D efektif dapat merangsang pembentukan kalus karena aktivitas yang kuat untuk memacu proses diferensiasi sel, organogenesis dan menjaga pertumbuhan kalus. Selain itu, studi tentang pengaruh asam 2,4-D terhadap pembentukan kalus dan pertumbuhan *Acalypha indica L.* menunjukkan bahwa kehadiran BAP di media juga mendukung pembentukan kalus (Rahayu *et al.*, 2002).

D. Hipotesis

Diduga kombinasi 2,4 D 2 mg/l + 0,5 mg/l BAP paling baik untuk pertumbuhan induksi embriosomatik Anggrek *Vanda tricolor*.