

REGENERASI ANGGREK *Vanda tricolor* PASCA ERUPSI MERAPI MELALUI KULTUR *IN VITRO*

8

Innaka Ageng Rineksane¹⁾, Masrukhan Sukarjan²⁾

¹⁾Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
email: rineksane@umy.ac.id

²⁾Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
email: masrukhan@gmail.com

Abstract

The eruption of the Merapi volcano and the exploitation of the orchid from its habitat had decreased the population of *Vanda tricolor*. The conservation of the orchid could be done through *in vitro* culture. The aim of the research was to determine the best of media and concentration of Benzyl Amino Purine, Naphtalene Acetic Acid and Thidiazuron on the callus growth of *Vanda tricolor*. The research was consisted of two experiments. First experiment was arranged in a completely randomized design factorial with nine treatments. The treatments were combination between media type (1/2 MS and NDM) and the concentration of BAP (0, 1, 2, 3, 4 mg/l) and NAA (0; 0,1; 0,5 mg/l). The second experiment was arranged in a completely randomized design, single factor, with six treatments (1/2 MS media + 0 mg/l Thidiazuron, 1/2 MS media + 0,5 mg/l Thidiazuron, 1/2 MS media + 1 mg/l Thidiazuron, NDM media + 0 mg/l Thidiazuron, NDM media + 0,5 mg/l Thidiazuron, and NDM media + 1 mg/l Thidiazuron. Each treatment was repeated 15 times, each replication consisted of one sample. The results showed that NDM media supplemented with 1 mg / l BAP + 0.1 mg / l NAA and 2 mg / l BAP + 0.1 mg / l NAA induced the callus of *Vanda tricolor* from *ex vitro* leaf explants. NDM Media supplemented with 0,5 mg/l Thidiazuron was the best treatment to induce the callus of *Vanda tricolor* from *in vitro* leaf explants.

Keywords: *Vanda tricolor*, *in vitro*, media, Benzyl Amino Purine, Thidiazuron

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 telah menghanguskan 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). Oleh karena itu perlu diupayakan perbaikan teknologi untuk memperbanyak dan meregenerasikan kembali anggrek *Vanda tricolor*. Alternatif teknik

perbanyakan yang dapat digunakan adalah melalui kultur *in 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, 1987; George, 1993). Perbanyakan anggrek secara *in vitro* dengan menggunakan bagian vegetatif sebagai eksplan seperti daun atau pucuk dapat menghasilkan *protocorm like bodies* (PLB) atau plantlet yang 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 Media (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. Metode yang dilakukan oleh Tokuhara dan Mii (1993) akan diadopsi untuk meregenerasikan anggrek *Vanda tricolor* secara *in vitro*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi yang bertujuan untuk memperoleh media tanam terbaik dengan penambahan BAP dan NAA serta Thidiazuron (TDZ) untuk menginduksi kalus dari

eksplan potongan daun anggrek *Vanda tricolor ex vitro* dan *in vitro*.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari eksplan anggrek *Vanda tricolor ex vitro* dan *in vitro*, media MS, NDM dan VW, Zat Pengatur Tumbuh (TDZ, BAP, NAA), *Plant Preservative Mixture* (PPM), gellan gum, sukrosa, alkohol dan akuades steril. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *glassware*, *dissecting kits*, pH meter, autoklaf, neraca analitik, stirer dan *Laminar Air Flow Cabinet*.

Penelitian ini terdiri dari 2 eksperimen.

A. Pengaruh Jenis Media dan Kombinasi BAP-NAA terhadap Pertumbuhan Anggrek *Vanda tricolor* Secara *In vitro*

Eksperimen 1 disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan perlakuan faktorial (2x9). Faktor 1 adalah jenis media yaitu : VW dan MS. Faktor 2 adalah konsentrasi BAP dan NAA yang terdiri dari 9 aras yaitu kombinasi 0, 1, 2, 3, 4 mg/l BAP dan 0; 0,1; 0,5 mg/l NAA. Setiap perlakuan diulang 10 kali sehingga total unit perlakuan adalah 180 unit. Eksplan yang digunakan adalah potongan ujung daun dari tanaman anggrek *Vanda tricolor* dewasa. Eksplan disterilisasi bertingkat dengan sterilan deterjen, bakterisida, fungisida dan NaClO. Eksplan dipelihara selama 4 bulan sampai terbentuk kalus dan PLB. Kultur diinkubasi dalam ruang dengan suhu ruang antara 23°C – 25°C dan dengan pencahayaan 1000 lux selama 24 jam. Variabel yang diamati adalah persentase eksplan membentuk kalus, persentase kontaminasi dan persentase hidup.

B. Pengaruh Jenis Media dan Thidiazuron terhadap Pertumbuhan Anggrek *Vanda tricolor* Secara *In vitro*

Eksperimen 2 menggunakan metode percobaan faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan enam perlakuan. Perlakuan yang diujikan yaitu Media ½ MS + 0 mg/l TDZ, ½ MS + 0,5 mg/l TDZ, ½ MS + 1 mg/l TDZ, Media NDM + 0 mg/l TDZ, NDM + 0,5 mg/l TDZ dan NDM + 1 mg/l TDZ. Sebanyak 0,5 mg/l 2,4-D ditambahkan ke dalam semua media perlakuan. Setiap perlakuan terdiri dari 15 ulangan, setiap ulangan terdiri dari satu sampel, sehingga jumlah keseluruhan sebanyak 90 unit. Variabel yang diamati persentase eksplan

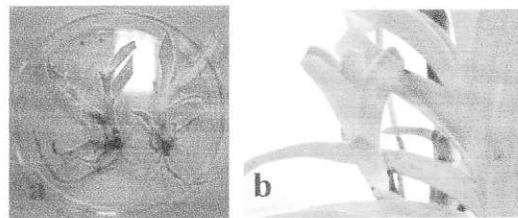
berkalus, persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning*.

Data yang diperoleh dari eksperimen 1 dan 2 dianalisis dengan menggunakan sidik ragam pada taraf α 5%, dan apabila hasilnya berbeda nyata dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf α 5%. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel, histogram dan gambar.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengaruh Jenis Media dan Kombinasi BAP-NAA terhadap Pertumbuhan Anggrek *Vanda tricolor* Secara *In vitro*

Daun anggrek *V. tricolor* yang digunakan sebagai eksplan pada penelitian ini adalah daun dari anggrek dewasa yang sudah pernah berbunga dan ditumbuhkan di rumah kaca. Daun anggrek ini kaku dan cukup tebal (Gambar 1b) apabila dibandingkan dengan daun anggrek yang berasal dari kultur *in vitro* (Gambar 1a).



Gambar 1. Perbandingan ketebalan daun anggrek asal *in vitro* (Dendrobium) (ketebalan 0,060 cm) (a) dan *V. tricolor* asal dari rumah kaca (ketebalan 0,125 cm)(b)

a. Persentase Kalus

Berdasar hasil pengamatan sampai minggu ke-6, kalus telah terbentuk pada daun yang ditanam dalam media NDM ditambah 1 atau 2 mg/l BAP masing-masing dikombinasikan dengan 0,1 mg/l NAA (Gambar 2 dan 3). Latip *et al.*, (2010) menggunakan BAP (0,5 – 3,5 mg/l) yang ditambahkan dalam media NDM untuk memultiplikasi protocorm anggrek *Phalaenopsis gigantia*. BAP merupakan golongan sitokinin yang stabil dan mempunyai spektrum luas untuk menginduksi terbentuknya tunas adventif pada banyak tanaman. Pada penelitian ini eksplan masih merespon adanya BAP dalam media dengan membentuk kalus dan belum menjadi tunas adventif disebabkan eksplan daun diambil dari tanaman dewasa sehingga responnya lebih lambat jika dibandingkan dengan eksplan yang diambil dari kultur *in vitro*. Selain itu waktu inkubasi masih pendek (6 minggu) untuk menginduksi tunas. Hasil penelitian Latip *et al.*, (2010) menyebutkan proliferasi protocorm anggrek

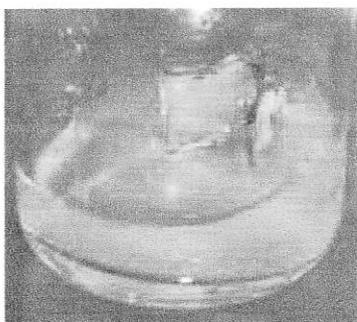
Phalaenopsis gigantea asal kultur *in vitro* memerlukan waktu 40 – 80 hari (6 – 12 minggu).



Keterangan

- A. 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA
- B. 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
- C. 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
- D. 3 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
- E. 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
- F. 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
- G. 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
- H. 3 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
- I. 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA

Gambar 2. Pengaruh Jenis media ditambah konsentrasi BAP dan NAA terhadap persentase eksplan berkalus setelah minggu ke-6

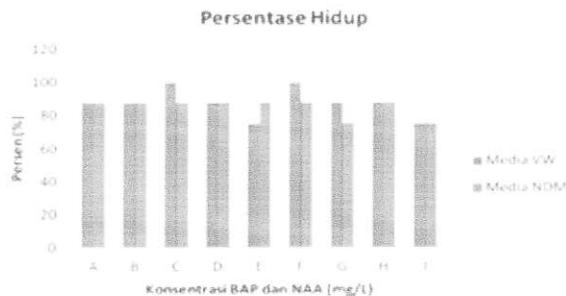


Gambar 3. Eksplan daun anggrek *V. tricolor* yang ditumbuhkan dalam media NDM + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA.

b. Persentase Hidup

Keberhasilan kultur *in vitro* salah satunya ditentukan oleh persentase eksplan yang hidup. Syarat lingkungan tumbuh yang aseptik bagi tanaman dalam kultur *in vitro* mempengaruhi persentase hidup eksplan. Media tanam mengandung senyawa organik maupun anorganik yang sangat disukai bakteri dan jamur penyebab kontaminasi yang dapat menyebabkan kematian eksplan, sehingga metode sterilisasi yang tepat diperlukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi

eksplan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase hidup eksplan yang ditumbuhkan dalam media VW maupun NDM paling sedikit 75% (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa metode sterilisasi yang digunakan mampu mencegah terjadinya kontaminasi tidak melebihi 50%.



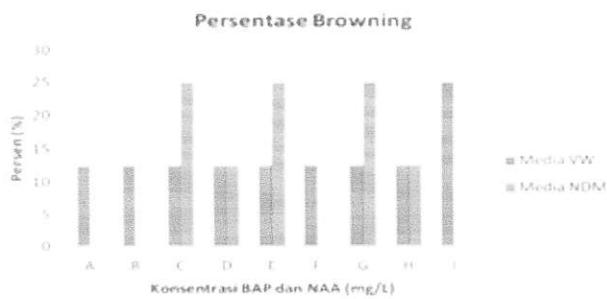
Keterangan

- A. 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA
- B. 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
- C. 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
- D. 3 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
- E. 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
- F. 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
- G. 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
- H. 3 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
- I. 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA

Gambar 4. Persentase hidup eksplan pada 6 minggu setelah tanam

c. Persentase Browning

Pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* dapat dihambat adanya senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh eksplan bereaksi dengan oksigen sehingga terjadi oksidasi yang mengakibatkan pencoklatan atau *browning* pada permukaan eksplan. Hasil penelitian ini menunjukkan persentase *browning* pada eksplan sebesar 0 – 25%. Potongan daun yang ditumbuhkan dalam media VW tanpa atau dengan BAP-NAA mengalami *browning* sebesar 12,5 – 25%. Sementara eksplan yang ditumbuhkan dalam media NDM hanya mengalami *browning* pada media yang mengandung kombinasi 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA dan 3 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA (Gambar 5).



Keterangan

- A. 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA
 B. 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
 C. 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
 D. 3 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
 E. 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA
 F. 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
 G. 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
 H. 3 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA
 I. 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA

Gambar 5. Persentase daun anggrek *V. tricolor* *browning* dalam media VW dan NDM pada 6 minggu setelah tanam

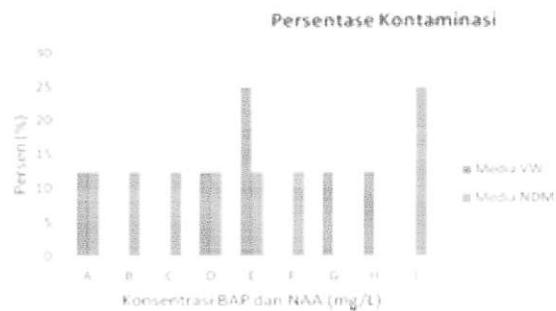
Eksplan daun yang digunakan pada penelitian ini berasal dari tanaman anggrek *V. tricolor* dewasa yang memiliki kandungan fenolik lebih tinggi jika dibandingkan dengan daun dari tanaman dalam kultur *in vitro*. Eksplan daun memiliki sel terbuka pada bagian yang dipotong sehingga senyawa fenolik terlepas ke udara dan bereaksi dengan oksigen menyebabkan terjadinya *browning*. *Browning* dapat terjadi pada semua bagian daun atau hanya sebagian sehingga bagian daun lainnya masih berwarna hijau.

Daun yang mengalami *browning* keseluruhan akan terhambat pertumbuhannya yang akhirnya tidak mampu membentuk kalus atau tunas baru. Sementara pada daun yang mengalami *browning* sebagian masih memiliki sel hidup yang dapat menyerap unsur hara dan senyawa organik dari media sehingga dapat tumbuh menjadi kalus atau tunas baru.

d. Persentase Kontaminasi

Ketidaksesuaian metode sterilisasi dapat menyebabkan eksplan terkontaminasi oleh bakteri maupun jamur sehingga eksplan tidak dapat tumbuh dan akhirnya mati. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode sterilisasi yang digunakan efektif mencegah terjadinya kontaminasi seperti yang terlihat pada gambar 6. Eksplan mengalami kontaminasi 0 – 25% pada media VW maupun NDM. Kontaminasi dapat terjadi disebabkan oleh jamur yang ditunjukkan

adanya benang-benang hifa ataupun oleh bakteri yang ditandai adanya lendir di sekeliling eksplan.



Gambar 6. Persentase kontaminasi daun *V. tricolor* pada media VW dan NDM 6 minggu setelah tanam

B. Pengaruh Jenis Media dan Thidiazuron terhadap Pertumbuhan Anggrek *Vanda tricolor* Secara *In vitro*

Pertumbuhan *V. tricolor* asal eksplan daun *in vitro* dimulai dari terjadinya pembengkakan pada permukaan eksplan yang teramati mulai minggu ke-4 dan terus menunjukkan pembesaran dengan pembengkakan pada eksplan. Pembengkakan pada daun disebabkan oleh respon tanaman terhadap perlakuan, yaitu terjadinya imbibisi yang menunjukkan bahwa eksplan melakukan penyerapan air dan hara dari media $\frac{1}{2}$ MS. Gill *et al.*, (2004) dalam Fibrianty (2013) menyatakan bahwa pembengkakan eksplan pada tanaman memberikan indikasi adanya pemanjangan atau pembesaran sel yang disebabkan adanya auksin. Hal tersebut juga terjadi pada eksplan di media NDM yang menunjukkan adanya pembengkakan dan pecah serta munculnya kalus pada permukaan eksplan yang berbentuk bulir kecil.

a. Persentase Eksplan Berkalus

Persentase eksplan berkalus menunjukkan adanya pengaruh perlakuan terhadap perkembangan eksplan yang diberikan. Perkembangan yang terjadi dalam penelitian ini yaitu munculnya pertumbuhan kalus pada eksplan pada beberapa media perlakuan. Hasil pengamatan persentase eksplan berkalus ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Pengaruh Jenis Media dengan Kombinasi Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Berkalus

Perlakuan	Persentase Eksplan Berkalus (%)
½ MS + 0 mg/l TDZ	0
½ MS + 0,5 mg/l TDZ	0
½ MS + 1 mg/l TDZ	0
NDM + 0 mg/l TDZ	7
NDM + 0,5 mg/l TDZ	7
NDM + 1 mg/l TDZ	0

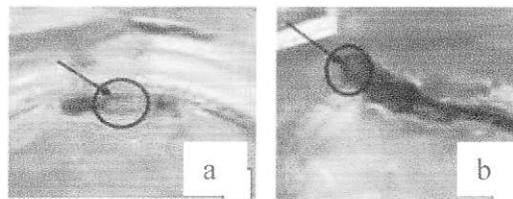
Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan pertumbuhan kalus kecuali pada eksplan yang ditanam dalam media NDM + 0 mg/l TDZ (kontrol) dan NDM + 0,5 mg/l TDZ. Kalus tumbuh pada media NDM kontrol tanpa TDZ 2 minggu setelah tanam (MST), sedangkan pada perlakuan NDM + 0,5 mg/l TDZ kalus tumbuh setelah 6 MST. Munculnya kalus pada media NDM kontrol menunjukkan bahwa kandungan zat pengatur tumbuh 2,4-D dalam media mampu menginduksi kalus pada eksplan. Ini karena semua media perlakuan ditambah 2,4-D sebanyak 0,5 mg/l. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin kuat yang mampu merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat dibandingkan terjadinya *browning* pada eksplan sehingga eksplan dapat merespon zat pengatur tumbuh dan unsur hara yang terkandung dalam media.

Menurut Endang *dkk.*, (2013) auksin yang terdapat pada 2,4-D menginisiasi pemanjangan sel dengan cara mempengaruhi pengenduran atau pelenturan dinding sel. Auksin akan memacu protein yang telah mengalami sintesis berupa *operon* (kombinasi antara gen struktural dan gen operator) yang aktif. *Operon* yang aktif menandakan dapat terjadinya transkripsi mRNA yang kemudian akan mengarahkan transisi protein enzim ATP-ase. Transisi protein enzim ATP-ase yang ada di membran plasma sel tumbuhan untuk memompa ion H⁺ ke dinding sel. Peristiwa ini akan menyebabkan lingkungan menjadi asam. Pada kondisi asam, enzim-enzim yang dapat memotong ikatan dinding sel akan teraktifkan, diantaranya *glukanase* yang akan menghidrolisis rantai utama *hemiselulosa*, *xylosidase* berperan dalam rantai cabang dari rantai utama *xyloglukan*, *transglukosidase* yang dapat memotong dan menggabungkan selulase dan pektinase yang akan menghidrolisis rantai penyusun pektin. Proses ini menyebabkan pelonggaran dinding sel sehingga sel tumbuhan kemudian memanjang akibat air yang masuk secara osmosis. Setelah pemanjangan ini, sel terus tumbuh dengan mensintesis kembali material dinding sel dan sitoplasma dan akan

membentuk kalus yang merupakan kumpulan sel-sel yang telah berkembang

Perlakuan NDM kontrol lebih cepat dalam merangsang pertumbuhan kalus dibandingkan dengan perlakuan dengan penambahan TDZ yaitu perlakuan NDM + 0,5 mg/l TDZ (Gambar 7). Kecepatan berkalus pada media NDM kontrol diduga pada perlakuan NDM + 0,5 mg/l TDZ eksplan mengalami *browning* sebagian sehingga berpengaruh terhadap respon perlakuan yang diberikan. Pertumbuhan kalus pada eksplan yang mengalami *browning* sebagian lebih lama tumbuh dibandingkan dengan NDM kontrol yang tidak mengalami *browning*.

Tumbuhnya kalus pada perlakuan NDM + 0,5 mg/l TDZ menunjukkan konsentrasi yang mampu memicu pertumbuhan kalus. Selain itu, kandungan 2,4-D yang terkandung dalam media membantu memicu pertumbuhan kalus, sehingga dalam hal ini perlakuan dengan penambahan 0,5 mg/l TDZ merupakan perlakuan yang menunjukkan adanya interaksi antara TDZ dengan 2,4-D pada media sehingga mampu menginduksi kalus eksplan *V. tricolor*. Penggunaan kombinasi antara auksin dengan sitokinin akan meningkatkan proses induksi kalus (Litz *dkk.*, 1995 dalam Kartika *dkk.*, 2013). Sejalan dengan itu Yusnita (2004) dalam Rosdiana (2010) menyebutkan bahwa penggunaan auksin dan sitokinin serta nisbah antara keduanya yang seimbang akan memacu pembentukan kalus.



Gambar 7. (a) Kalus tumbuh dari bagian tulang daun pada media NDM kontrol 2 MST (b) Kalus tumbuh dari bagian tepi daun pada media NDM + 0,5 mg/l TDZ 6 MST

Pembentukan kalus pada media NDM diduga karena NDM memiliki vitamin dan bahan organik yang lebih kompleks seperti asam-asam amino dan bahan organik lainnya yang mampu membantu dalam menginduksi kalus lebih cepat dibandingkan dengan media ½ MS yang mengandung bahan organik lebih sedikit sehingga media NDM yang digunakan dengan penambahan zat pengatur tumbuh mampu merangsang pertumbuhan kalus.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perkembangan kalus pada media NDM tidak

menunjukkan respon lagi pada pengamatan minggu ke-8. Perkembangan eksplan berhenti pada 8 MST karena terjadinya *browning* pada eksplan yang ditandai dengan berubahnya warna eksplan menjadi hijau kecoklatan. *Browning* disebabkan oleh tingginya atau meningkatnya senyawa fenolik dalam eksplan *V.tricolor* yang teroksidasi karena pemotongan eksplan sehingga mengakibatkan terjadinya *browning*. Tang dan Newton (2004) dalam Hutami (2008) menjelaskan bahwa pencoklatan jaringan sangat menurunkan regenerasi kultur kalus secara *in vitro*. Eksplan yang mengalami *browning* sebagian masih menunjukkan adanya pertumbuhan kalus (Gambar 7b). Tumbuhnya kalus pada eksplan yang mengalami *browning* sebagian menunjukkan bahwa eksplan masih mampu melakukan penyerapan unsur hara.

b. Persentase Eksplan Hidup dan *Browning*

Persentase eksplan hidup menunjukkan kemampuan eksplan untuk bertahan hidup dan beradaptasi terhadap media tempat tumbuhnya. Persentase hidup dipengaruhi oleh persentase kontaminasi dan persentase *browning* serta kemampuan eksplan dalam menyerap unsur hara maupun zat pengatur tumbuh pada media. Eksplan yang mengalami *browning* berlanjut menyebabkan kematian sel yang pada akhirnya persentase eksplan hidup menjadi rendah. Semua eksplan pada media penelitian ini tidak mengalami kontaminasi sehingga persentase eksplan hidup tidak dihambat atau dipengaruhi oleh kontaminasi pada eksplan. Kontaminasi eksplan tidak terjadi karena eksplan yang digunakan merupakan daun steril yang berasal dari perbanyakan kultur *in vitro* sehingga tanaman tidak mudah terkontaminasi. Penggunaan *Plant Preservative Mixture* (PPM) pada media di penelitian ini juga membantu menghambat pertumbuhan patogen. Menurut Probowati (2011) *Plant Preservative Mixture* (PPM) merupakan antibiotika sintetik yang memiliki spektrum luas sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif. Selain PPM, betadin juga digunakan sebagai bahan sterilisasi saat pemotongan eksplan untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Sterilisasi merupakan bagian terpenting pada perbanyakan *in vitro*. Sandra dan Karyaningsih (2000) dalam Kartika dkk., (2013) menjelaskan sterilisasi merupakan proses untuk mematikan atau menonaktifkan spora dan mikroorganisme sampai ke tingkat yang tidak memungkinkan lagi berkembang biak atau menjadi sumber kontaminan selama proses perkembangan berlangsung. Betadine merupakan desinfektan

yang mengandung senyawa aktif *Povidone Iodine* 10%. Penggunaan betadine tiga tetes yang dilarutkan dalam aquadest steril dapat membantu dalam menghambat terjadinya kontaminasi akibat jamur yang menghambat pertumbuhan eksplan *V.tricolor*. Hasil pengamatan persentase hidup dan persentase *browning* disajikan pada tabel 2.

Tabel 2 Pengaruh Jenis Media dengan Kombinasi Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Hidup dan Persentase *Browning* Anggrek *V.tricolor* pada 8 MST

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)	Persentase <i>Browning</i> (%)
½ MS + 0 mg/l TDZ	7	93
½ MS + 0,5 mg/l TDZ	13	87
½ MS + 1 mg/l TDZ	40	60
NDM + 0 mg/l TDZ	0	100
NDM + 0,5 mg/l TDZ	33	67
NDM + 1 mg/l TDZ	27	67

Eksplan yang ditanam pada semua perlakuan media dengan penambahan zat pengatur tumbuh menghasilkan persentase eksplan hidup < 50 %. Rendahnya persentase eksplan hidup dalam kultur *in vitro* tidak berpengaruh terhadap keberhasilan penelitian. Persentase eksplan hidup rendah (tabel 2), meskipun demikian, eksplan masih memberikan respon terhadap perlakuan yang diberikan. Persentase eksplan hidup yang rendah dalam penelitian ini disebabkan oleh adanya penghambat pertumbuhan eksplan. Penghambat pertumbuhan eksplan tersebut terjadi akibat kandungan fenolik yang kuat pada eksplan *V.tricolor* yang menyebabkan terjadinya *browning* sehingga menghambat pertumbuhan dan menyebabkan terjadinya kematian pada eksplan. Kandungan fenolik yang terkandung pada eksplan dipicu oleh aktivitas *Phenilalanin amonia liase* (PAL) yang disebabkan pelukaan pada eksplan yang kemudian senyawa fenol teroksidasi oleh oksigen melalui enzim PPO dan mengakibatkan *browning*.

4. KESIMPULAN

Media NDM dengan penambahan 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA dan 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA dapat menumbuhkan kalus dari eksplan daun dari anggrek *V. tricolor* dewasa.

Media NDM dengan penambahan 0,5 mg/l Thidiazuron mampu menghasilkan kalus dan merupakan perlakuan terbaik dalam menginduksi kalus anggrek *Vanda tricolor* dari eksplan daun *in vitro*.

5. REFERENSI

- Dwiyani R., 2013. Induksi Kalus Pada Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. Varietas Suavis, Upaya Penyediaan Target Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens* Jurnal Agrotropika 18(2): 73-76, Juli-Desember 2013.
- Endang, L., Tutik, N., dan Siti, N. 2013. Pengaruh Konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara *In vitro*. Jurnal Sains dan Seni Pomits (2)1 :2337-3520.
- Fibrianty, E. 2013. Induksi Protocorm-Like Bodies (Plbs) dan Karakterisasi Molekuler Populasi F2 Anggrek *Phalaenopsis*. TESIS Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor Bogor.
- George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture Part 1: The Technology. 2nd edition. Exegetics Limited, England. 574p.
- Hutami S. 2008. Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. Jurnal AgroBiogen 4(2):83-88
- Kartika, L., P. Kianto, A., L.M. Ekawati, P., 2013 Kecepatan Induksi Kalus Dan Kandungan Eugenol Sirih Merah (*Piper crocatum* ruiz and pav.) Yang Diperlakukan Menggunakan Varietas Jenis dan Konsentrasi Auksin. e-jurnal Universitas Atma Jaya Yogyakarta. <http://e-journal.uajy.ac.id/4836/1/naskah%20jurnal.pdf> akses 4 agustus 2014.
- Latip, M.A., R. Murdad, Z.A. Aziz, L.H. Ting, L.M. Govindasamy and R. Ripin. 2010. Effects of N6-Benzyladenine and Thidiazuron on Proliferation of *Phalaenopsis gigantea* Protocorms. Asia Pacific Journal of Molecular Biology Biotechnology 18(1):217-220.
- Metusala, D. 2006. Melirik Konservasi Anggrek *Vanda tricolor* di Merapi. <http://www.anggrek.org/melirik-konservasi-anggrek-vanda-tricolor-di-merapi-2.html>. Akses 17 September 2011.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. Netherlands.
- Probowati D.W.N., 2011. Pengaruh Pemberian Antibiotika Pada Kultur *In vitro* Pulau (*Alstonia scholaris* (L.) R. Br) [skripsi]. Bogor : Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor.
- Rosdiana. 2010. Pertumbuhan Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amboinensis*) Endemik Sulawesi, Pada Beberapa Jenis Dan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Secara *In vitro*. Jurnal Agrisistem, Vol. 6 No. 2.
- Tokuhara, K. And M. Mii. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Reports 13:7-11.