

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Persentase Eksplan Hidup, Kontaminasi, dan *Browning*

Keberhasilan kultur *In vitro* ditentukan oleh beberapa faktor diantaranya yaitu sumber eksplan, komposisi media yang tepat, dan sterilisasi. Penggunaan eksplan yang memiliki sifat cepat tumbuh sering memberikan keberhasilan pertumbuhan yang tinggi. Hasil pengamatan pengaruh pumpkin terhadap persentase eksplan hidup, kontaminasi, dan *browning* anggrek hitam disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh penambahan pumpkin dalam subkultur anggrek hitam secara *In vitro* terhadap persentase eksplan hidup, kontaminasi, dan *browning*

Perlakuan	Persentase Eksplan %		
	Hidup	Kontaminasi	<i>Browning</i>
PD 3 g/l + AK 150 ml/l + Pumpkin 5 g/l	77,8 %	0 %	22,2 %
PD 3 g/l+ AK 150 ml/l + Pumpkin 10 g/l	77,8 %	0 %	22,2 %
PD 3 g/l+ AK 150 ml/l + Pumpkin 15 g/l	100 %	0 %	0 %
PD 3 g/l+ AK 150 ml/l + Pumpkin 20 g/l	88,9 %	0 %	11,1 %
PD 3 g/l + AK 150 ml/l	77,8 %	0 %	22,2 %
MS + BAP + NAA	88,9 %	0 %	11,1 %
Rata-Rata	85, 12 %	0 %	14,88 %

Keterangan: PD, media pupuk daun tanpa penambahan pumpkin, AK, Air Kelapa, MS+BAP+NAA, media MS dengan penambahan NAA 0,5 ppm dan BAP 1 ppm

1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan parameter yang diukur untuk mengetahui eksplan dalam beradaptasi dengan suatu medium. Persentase eksplan hidup diamati untuk melihat jumlah eksplan yang bertahan hidup dalam media yang diberikan.

Persentase eksplan hidup merupakan eksplan yang mampu bertahan hidup yang ditandai dengan daun berwarna hijau dan tidak mengalami *Browning* maupun kontaminasi. Hasil analisis persentase eksplan hidup ditunjukkan pada tabel 1. Hasil analisis menunjukkan bahwa rerata persentase eksplan hidup tanaman anggrek hitam sebesar 85,1%.

Berdasarkan tabel 1 diketahui bahwa semua perlakuan memiliki persentase hidup yang cenderung tinggi yaitu diatas 50% (77,7-100%). Perlakuan penambahan pumpkin 15 g/l memiliki persentase eksplan hidup tertinggi yaitu 100%, sedangkan persentase eksplan cenderung rendah pada perlakuan penambahan pumpkin 5 g/l, 10 g/l dan perlakuan pupuk daun yaitu 77,7%. Pengaruh pemberian pumpkin terhadap persentase eksplan hidup dengan konsentrasi lebih rendah dari 15 g/l memberikan persentase eksplan hidup cenderung rendah, hal ini diduga bahwa kandungan vitamin serta nutrisi pada pumpkin dalam media tersebut belum mampu mencukupi kebutuhan vitamin dan nutrisi anggrek hitam. Sementara itu persentase eksplan hidup cenderung rendah juga pada pemberian pumpkin dengan konsentrasi lebih tinggi dari 15 g/l, hal ini diduga bahwa media menjadi lebih pekat sehingga dalam penyerapan nutrisi yang tersedia di dalam media, tanaman memerlukan energi yang lebih besar.

Dalam kultur *In vitro* eksplan merupakan faktor penting dalam pertumbuhan yang harus diperhatikan kesterilan dan kualitas eksplan, selain itu proses dalam melakukan inokulasi juga mempengaruhi persentase eksplan hidup suatu tanaman.

Eksplan yang digunakan dalam proses subkultur ini merupakan hasil kultur *In vitro* sebelumnya sehingga eksplan dalam keadaan steril. Selain itu, eksplan harus memiliki daya hidup tinggi dan mampu melakukan pertumbuhan secara terus menerus sehingga eksplan dapat bertahan hidup.

Persentase eksplan hidup juga dipengaruhi oleh media tanam yang digunakan. Eksplan dapat bertahan hidup disebabkan oleh reaksi positif tanaman terhadap media yang diberikan dan mampu beradaptasi dalam media tersebut. Berdasarkan tabel 1 diketahui bahwa persentase eksplan hidup pada semua perlakuan termasuk dalam kategori tinggi. Hal ini diduga bahwa kandungan nutrisi pada semua perlakuan dapat diterima dan mendukung anggrek hitam dalam bertahan hidup hingga akhir. Seperti yang ditunjukkan dalam penelitian Akbar dan Firza (2018) bahwa kombinasi pumpkin, pupuk daun dan air kelapa dapat mensubstitusi media MS dalam perbanyakan tanaman sarang semut secara *In vitro*.

2. Persentase Eksplan Kontaminasi

Persentase eksplan kontaminasi diamati untuk mengetahui adaptasi dari eksplan yang dipindahkan dari media awal ke media perlakuan. Kontaminasi merupakan kerusakan jaringan pada tanaman yang diakibatkan oleh sumber kontaminan berupa mikroorganisme yang menyebabkan terhalangnya tanaman untuk hidup. Kontaminasi adalah faktor pembatas dalam keberhasilan kultur *In vitro* yang berasal dari bahan tanaman baik internal maupun eksternal, organisme yang masuk ke dalam media, botol kultur dan peralatan inokulasi yang kurang steril, ruang inokulasi dan kesalahan teknis dari pelaksana dalam pelaksanaan inokulasi.

Kontaminasi dapat terjadi pada eksplan maupun media. Kontaminasi ditandai dengan adanya bakteri maupun jamur. Kontaminasi yang diakibatkan oleh jamur ditandai dengan adanya miselium berwarna, sementara kontaminasi akibat bakteri dilihat dengan adanya lendir pada sekitar eksplan. Sumber kontaminasi dapat berasal dari eksplan, peralatan, dan keadaan ruang yang tidak steril. Sumber kontaminasi berasal dari mikroorganisme yang tumbuh pada material tanaman yang dibiakkan dan peralatan yang digunakan (Imanudin, 2016).

Berdasarkan hasil persentase kontaminasi pada eksplan anggrek hitam 0%. Persentase eksplan kontaminasi 0% menunjukkan bahwa kegiatan sterilisasi semua bahan dan peralatan inokulasi serta teknis pelaksanaan inokulasi telah dilakukan secara baik. Hal ini juga karena beberapa faktor yaitu eksplan yang digunakan merupakan eksplan yang berasal dari kultur steril sehingga dapat mencegah terjadinya kontaminasi. Peralatan dan medium yang digunakan dalam inokulasi bersifat steril. Selain itu teknis inokulasi dilakukan dalam keadaan steril.

Pada saat inokulasi, pemisahan eksplan dilakukan didalam sebuah petri berisi larutan betadin. Larutan betadin berperan sebagai antimikroba sehingga eksplan bersifat steril. Betadin mengandung zat aktif berupa *iodine povidone* yang berkhasiat mematikan patogen utama dan sporanya. Selain eksplan yang steril media juga harus steril. Penggunaan PPM (*Plant Preservative Mixture*) dapat mencegah kontaminasi pada media. PPM ini ditambahkan dalam media tanam sebagai bahan tambahan yang mampu menghambat mikroba dan jamur dalam kultur *In vitro*. Penelitian ini menggunakan PPM dengan konsentrasi 0,1 ml/L ditambahkan dalam medium (Sharaf dan Weathers, 2006).

3. Persentase Eksplan *Browning*

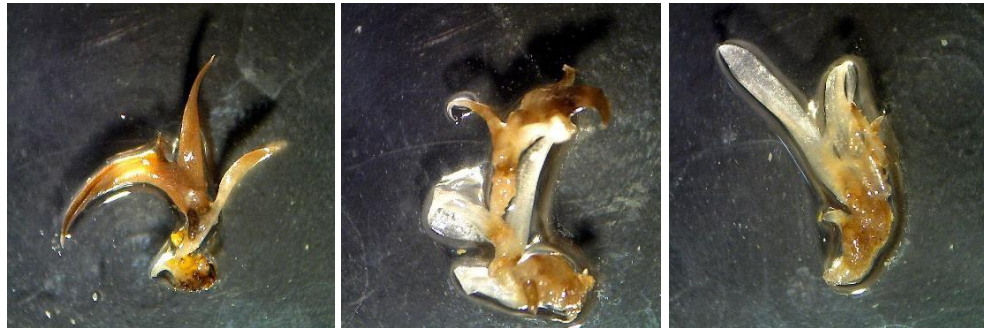
Persentase eksplan *browning* diamati dengan tujuan untuk mengetahui adaptasi dari eksplan anggrek hitam dari media awal ke media perlakuan. *Browning* adalah proses pencoklatan pada suatu organ tanaman yang disebabkan oleh proses oksidasi. Pencoklatan pada jaringan dapat terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti *polifenol oksidase* dan *tirosinase*. enzim tersebut disintesis pada kondisi oksidatif pada saat jaringan dilukai. Jaringan yang diisolasi akan berubah warna menjadi coklat atau kehitaman dan tidak dapat hidup (Lerch, 1981).

Persentase eksplan *browning* ditunjukkan pada tabel 1 rerata persentase *browning* pada eksplan tunas anggrek hitam cenderung rendah yaitu sebesar 14,8 %. Pencoklatan atau *browning* terjadi pada perlakuan Pumpkin 5 g/l pada minggu ke 7, perlakuan Pumpkin 10 g/l pada minggu ke 6, perlakuan Pumpkin 20 g/l pada minggu ke 6 dan diikuti dengan perlakuan MS pada minggu ke 7 dan perlakuan PD pada minggu ke 7.

Pencoklatan yang terjadi pada beberapa perlakuan pada penelitian ini dimungkinkan karena kandungan senyawa fenolik dari setiap individu eksplan yang berbeda-beda. Tabiyeh *et al.*, (2006) menjelaskan pencoklatan yang terjadi dalam kultur *In vitro* disebabkan karena meningkatnya produksi senyawa fenolat yang diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim *polifenol oksidase* (PPO) dan polimerasinya.

Fenilalanin amonia liase (PAL) merupakan salah satu enzim dalam *fenilpropanoid* yang sangat berpengaruh terhadap terjadinya pencoklatan.

Marlin *et al.*, (2012) mengemukakan bahwa tanaman yang mengalami luka akan mengeluarkan senyawa fenolat. Senyawa fenolat tersebut terkumpul dalam media yang akan menyebabkan penghambatan penyerapan unsur hara oleh eksplan yang berdampak pada kematian eksplan. Eksplan anggrek hitam memiliki luka pada pangkal saat dilakukan pemisahan yang terjadi pada proses inokulasi.



Gambar 4. Eksplan anggrek hitam yang mengalami *browning*

Pencoklatan dapat menghambat pertumbuhan eksplan bahkan dapat menyebabkan kematian. Warna coklat yang muncul akan menutupi permukaan kalus dan menghambat permukaan kalus tersebut. Permukaan kalus yang terhambat akan menyebabkan penebalan dan pengerasan pada jaringan sehingga kalus akan sulit untuk regenerasi (Mellidou *et al.*, 2014).

Pada penelitian ini *Browning* terjadi hampir di setiap perlakuan kecuali pada perlakuan Pumpkin 15 g/l. Keberhasilan penanaman anggrek hitam yang tidak mengalami *Browning* diduga karena kandungan senyawa fenolik pada eksplan relatif rendah, selain itu sterilisasi yang dilakukan pada saat inokulasi dilakukan dalam keadaan steril. Disisi lain pencoklatan non-enzimatis juga dapat disebabkan

oleh reaksi pencoklatan tanpa pengaruh enzim. Reaksi yang terjadi antara karbohidrat, khususnya gula pereduksi dengan gugus amina primer pada asam amino dan hasil reaksi tersebut menghasilkan warna coklat. Keberhasilan persentase *browning* pada penambahan pumpkin 15 g/l diduga memiliki kandungan karbohidrat yang cenderung lebih rendah sehingga reaksi non-enzimatis tidak terjadi (Willey dan Blackwell, 2012).

B. Pertumbuhan Tanaman

Pertumbuhan merupakan proses penambahan ukuran atau volume dan jumlah sel secara irreversibel. Pertumbuhan bergantung pada tersedianya meristem, hasil asimilasi, hormon dan lingkungan yang mendukung. Titik awal dari pertumbuhan yaitu sintesis molekul yang besar dan kompleks berlangsung terus menerus dari ion dan molekul yang kecil, pembelahan sel menghasilkan sel baru dan membesar. Pertumbuhan tidak hanya mengakibatkan perubahan bentuk akan tetapi juga menyebabkan terjadinya perubahan aktivitas fisiologi, susunan biokimia, serta struktur dalam.

1. Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman merupakan salah satu indikator untuk mengetahui pertumbuhan vegetatif tanaman. Menurut Sitompu dan Guritno 1995) tinggi tanaman merupakan ukuran tanaman yang sering diamati sebagai indikator pertumbuhan dan parameter yang diamati untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan.

Hasil analisis pengaruh penambahan pumpkin dalam media pupuk daun dan air kelapa terhadap tinggi tanaman dan jumlah daun disajikan pada tabel 2.

Table 2. Pengaruh penambahan pumpkin dalam media pupuk daun dan air kelapa terhadap pertumbuhan tanaman Anggrek Hitam Minggu ke -8 setelah tanam

Perlakuan	Tinggi tanaman (cm)	Jumlah Daun
Pumpkin 5 g/l + PD 3 g/l+ AK 150 ml/l	0,50 a	2,00 b
Pumpkin 10 g/l +PD 3 g/l+ AK 150 ml/l	0,52 a	2,00 b
Pumpkin 15 g/l +PD 3 g/l+ AK 150 ml/l	0,51 a	2,33 ab
Pumpkin 20 g/l PD 3 g/l+ AK +150 ml/l	0,51 a	2,00 b
PD 3 g/l + AK 150 ml/l	0,51 a	2,55 a
MS +NAA+BAP	0,51 a	2,22 b

Ket : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%.
 PD = media pupuk daun tanpa penambahan pumpkin, AK = Air Kelapa,
 MS+BAP+NAA, media MS dengan penambahan NAA 0,5 ppm dan BAP 1 ppm

Hasil sidik ragam parameter tinggi tanaman anggrek hitam pada tabel 2 dan lampiran 1 menunjukkan bahwa tidak terdapat beda nyata antar perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan pumpkin dalam media dapat mensubstitusi media MS sebagai media tanam kultur *in vitro* pada tanaman anggrek hitam. Tanaman anggrek hitam mampu merespon penambahan pumpkin dalam media kultur *in vitro* terhadap pertumbuhan tinggi tanaman. Berbagai kandungan nutrisi dalam pumpkin mampu mendukung pertumbuhan masa vegetatif tanaman anggrek hitam. Pumpkin mengandung unsur nutrisi penting berupa vitamin, gula dan karbohidrat, Phospor, serta kandungan lain yang menjadi pembentuk pokok dalam proses metabolisme tanaman. Pumpkin mengandung karbohidrat dan gula yang berfungsi sebagai bahan utama dan sumber karbon dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Sementara itu penggunaan pupuk daun pada media juga memiliki peran yang penting terhadap pertumbuhan eksplan. Pupuk daun mengandung unsur hara makro dan mikro yang berfungsi sebagai bahan penyokong dalam pertumbuhan vegetatif tanaman. Kebutuhan unsur nutrisi pokok N, P, dan K dalam masa pembentukan dan pemanjangan sel dapat terpenuhi dengan ketersediaan unsur makronutrien tersebut dalam pupuk daun. Proses pembentukan asam amino dan protein dalam proses metabolisme membutuhkan unsur nitrogen dalam jumlah besar serta pembentukan asam nukleat guna memperpanjang dan membentuk sel dan dinding sel, sehingga unsur nitrogen memiliki peran yang sangat penting dalam pertumbuhan tanaman pada masa vegetatif. Dengan demikian pemberian pupuk daun ke dalam media tanam diduga dapat memberikan respon pertumbuhan tinggi tanaman pada eksplan anggrek hitam. Penambahan pupuk daun pada media tanam kultur *in vitro* bubur pisang dan air kelapa mampu menghasilkan tinggi planlet hingga 5,4 cm dan 5,43 cm (Hasanah *et al.*, 2014).

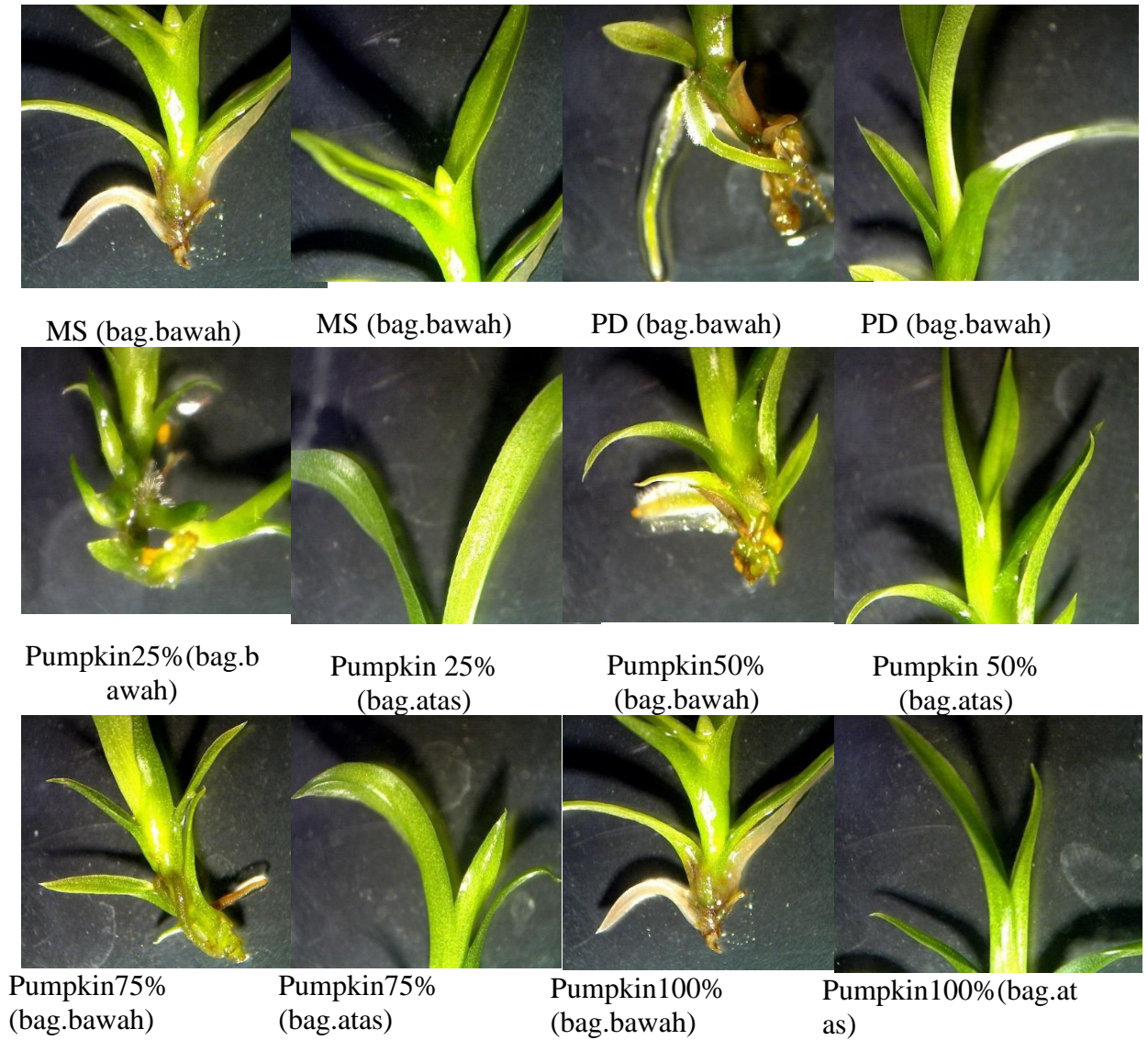
Penggunaan air kelapa dalam media kultur *in vitro* memberikan pengaruh pada pertumbuhan anggrek hitam. Penggunaan air kelapa sebagai sumber zpt organik yang memiliki kandungan auksin dan sitokinin. Kandungan auksin dalam air kelapa mampu mendorong pemanjangan sel dalam batang sehingga dapat memberikan pertumbuhan tinggi yang optimum pada tanaman anggrek hitam. Sedangkan sitokinin berperan dalam peningkatan laju sintesis protein dengan merangsang pembelahan sel pada tanaman tersebut. Disebutkan juga oleh George dan Sherington (1984) apabila sitokinin yang diberikan secara eksogen mempunyai dampak meningkatkan pembelahan sel, proliferasi pucuk, dan morfogenesis pucuk.

Oleh karena itu pemberian air kelapa dalam media kultur *in vitro* membantu pertumbuhan tinggi tanaman anggrek. Dalam penelitian Pacheo *et al.*, (2012) penambahan air kelapa dapat memacu perpanjangan tunas tanaman *Passiflora alata* yang diperbanyak secara *in vitro* selain itu disebutkan juga bahwa air kelapa mengandung unsur mineral K yang dapat meningkatkan tinggi benih tanaman hutan (Wright *et al.*, 2011).

2. Jumlah Daun

Tanaman merupakan tumbuhan autotrof, dimana tanaman dapat memproduksi makanan sendiri melalui daun dengan proses fotosintesis. Sehingga keberadaan daun merupakan bagian yang sangat penting bagi kelangsungan hidup tanaman tersebut. Semakin banyak daun yang terbentuk maka akan semakin besar makanan yang diproduksi.

Hasil sidik ragam terhadap parameter jumlah daun anggrek hitam pada tabel 2 dan lampiran 1 menunjukkan bahwa terdapat beda nyata antar perlakuan. Perlakuan PD tanpa penambahan pumpkin memberikan hasil yang cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan media yang ditambah pumpkin. Penggunaan pupuk daun yang mengandung unsur nutrisi makro dan mikro dapat merangsang hormon-hormon lain dalam pertumbuhan vegetatif. Unsur nitrogen dalam makronutrien sebagai sumber karbo yang digunakan dalam pembentukan protein dan asam amino serta asam nukleat yang akan membentuk dinding sel. Penambahan pupuk daun pada media kultur *in vitro* mampu memberikan hasil pertumbuhan jumlah daun dengan rata-rata hingga 9,2 helai (Handayani dan Rahayu, 2015).



Gambar 5. Anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl) semua perlakuan pada minggu ke 16

Matatula (2003) menyatakan kandungan nitrogen yang tersedia lebih banyak dari pada unsur lainnya dapat menghasilkan jumlah protein yang lebih banyak sehingga pembentukan daun dapat lebih cepat.

Selain itu penggunaan air kelapa pada media dapat membantu penambahan jumlah daun. Air kelapa mengandung hormon sitokinin, auksin, sedikit giberalin serta kandungan lain yang dapat merangsang perkecambahan dan pertumbuhan. Sitokinin mampu menstimulus dalam pembelahan sel serta auksin dapat berperan dalam proses pembesaran dan perpanjangan sel, serta pertumbuhan tunas. Glukosa yang terkandung dalam air kelapa sebagai sumber karbohidrat untuk poliferasi pertumbuhan *Protocorm Like Bodies* (PLB). Senyawa kompleks yang terkandung dalam air kelapa dapat membantu perbesaran dan penambahan jumlah daun. Hasil penelitian Pisecha (2008) bahwa penggunaan air kelapa dengan konsentrasi tertentu pada media kultur *in vitro* dapat menghasilkan pertumbuhan daun yang lebar dan besar pada tanaman Poisetta.

Wulandari *et al.*, (2013) menyatakan auksin yang terkandung dalam air kelapa dapat mendukung permeabilitas masuknya air ke dalam sel, mempertinggi penyerapan unsur N, Mg, Fe, Cu serta dapat menaikkan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein dan plastisitas, serta pengembangan dinding sel. Dengan demikian air kelapa mendukung pupuk daun agar terserap tanaman dengan lebih mudah.

Dengan penambahan air kelapa yang memiliki kandungan zpt dan hormon dapat membantu eksplan dalam mempercepat pertumbuhan dan perkembangan organ daun dalam tanaman anggrek hitam. Penelitian Mukarlina *et. al.*, (2010).

menunjukkan bahwa penambahan air kelapa yang mengandung Ca dan vitamin mampu merangsang pertumbuhan tanaman khususnya daun.

Perlakuan penambahan pumpkin pada media memiliki jumlah daun yang lebih rendah dibandingkan perlakuan tanpa penambahan pumpkin. Hal ini diduga adanya pumpkin dalam media menyebabkan konsentrasi media menjadi lebih pekat dari pada media yang tanpa penambahan pumpkin. Kepekatan konsentrasi tersebut mempengaruhi proses penyerapan unsur nutrisi oleh tanaman. Tanaman perlu mengurainya terlebih dahulu sehingga pertumbuhan daun menjadi lambat. Respon pertumbuhan jumlah daun tanaman anggrek terhadap penambahan pumpkin cenderung kurang hal ini diduga kemampuan eksplan tersebut dalam menyerap nutrisi kurang (Akbar dan Firza, 2018).

C. Pertumbuhan Akar

1. Saat tumbuh akar

Parameter saat tumbuh akar diamati untuk mengetahui kecepatan tumbuh akar pada setiap eksplan. Parameter saat tumbuh akar diamati untuk mengetahui respon tanaman terhadap media dan nutrisi yang terkandung didalamnya. Saat tumbuh akar disajikan dalam tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh penambahan pumpkin dalam media pupuk daun dan air kelapa terhadap saat muncul akar tanaman Anggrek Hitam

Perlakuan	Saat muncul akar (hari ke-)
PD 3 g/l+ AK 150 ml/l+ Pumpkin 5 g/l	60
PD 3 g/l+ AK 150 ml/l+ Pumpkin 10g/l	50
PD 3 g/l+ AK 150 ml/l+ Pumpkin 15 g/l	47,7
PD 3 g/l+ AK 150 ml/l+ Pumpkin 20 g/l	60
PD 3 g/l+ AK 150 ml/l	60
MS+ NAA +BAP	52,3

Ket : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%.
 PD = media pupuk daun tanpa penambahan pumpkin, AK = Air Kelapa, MS+BAP+NAA, media MS dengan penambahan NAA 0,5 ppm dan BAP 1 ppm

Hasil pengamatan saat tumbuh akar pada tabel 3 menunjukkan saat tumbuh akar tercepat pada perlakuan penambahan pumpkin 15 g/l yaitu pada hari ke 47,7 hari. Pertumbuhan akar anggrek hitam merespon dengan penambahan pumpkin ke dalam media dengan konsentrasi 15 g/l. Hal ini diduga bahwa anggrek hitam mampu merespon nutrisi yang terkandung dalam pumpkin tersebut. Pumpkin mengandung karbohidrat dan gula serta vitamin yang diduga mampu mendorong proses pertumbuhan akar. Selain itu penggunaan air kelapa membantu anggrek hitam dalam mengurai nutrisi yang terkandung dalam pumpkin. Air kelapa mengandung komponen mineral dan biokimia seperti K, Na, Ca, P, Fe, Cu, S, Mg, asam askorbat, vitamin B dan asam amino yang menambah kekayaan nutrisi pada media dimana unsur-unsur tersebut membantu dalam pertumbuhan tanaman khususnya akar (Mayura *et al.*, 2016). Air kelapa berperan sebagai zpt yang mengandung auksin dan thiamin yang dapat merangsang pertumbuhan akar. Menurut Widiastoety dan Santi (1994) thiamin memiliki fungsi untuk mempercepat proses pembelahan sel pada meristem akar, sehingga diduga penambahan air kelapa dalam media dapat menyebabkan munculnya akar pada anggrek hitam.

Disisi lain pertumbuhan akar anggrek hitam pada media dengan penambahan zpt sintetis menunjukkan pertumbuhan akar pada hari ke 52, 3 hari. Penggunaan NAA dengan konsentrasi 0,5 ppm memiliki saat tumbuh akar cenderung lebih lama dibandingkan saat tumbuh akar pada penggunaan air kelapa dan pumpkin 15 g/l. Hal ini diduga bahwa konsentrasi NAA yang digunakan diduga belum mampu memenuhi kebutuhan anggrek hitam dalam pertumbuhan saat akar muncul. Pertumbuhan terlama terjadi pada perlakuan pumpkin 20 g/, pumpkin 5 g/l, dan PD saat muncul akar pada 60 hari setelah tanam. Hal ini diduga oleh kemampuan eksplan dalam pertumbuhan berbeda-beda. Eksplan yang digunakan pada perlakuan dengan pertumbuhan akar lambat memiliki kemampuan tumbuh yang cenderung lambat. Selain itu faktor lingkungan juga mempengaruhi pertumbuhan akar tanaman anggrek hitam.

Kandungan unsur dalam pumpkin dengan konsentrasi cenderung lebih rendah dari 15 g/l diduga belum mampu mencukupi kebutuhan nutrisi pertumbuhan anggrek hitam. Selain itu faktor penyebaran zpt yang tidak merata mengakibatkan perbedaan kecepatan pertumbuhan akar. Saat muncul akar pada perlakuan pumpkin 5 g/l, pumpkin 20 g/l dan PD cenderung lebih lambat dibandingkan perlakuan lain salah satu faktornya disebabkan waktu pengamatan yang relatif singkat hanya 2 bulan yang mengakibatkan akar lambat terbentuk pada usia tersebut. Nazi (2014) menyatakan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk proses pembentukan akar lebih lama dibandingkan dengan waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan organ atas atau daun. Penggunaan pumpkin dalam konsentrasi tinggi juga menyebabkan media menjadi pekat sehingga penyerapan nutrisi oleh eksplan menjadi lebih lama karena menguraikan terlebih dahulu (Akbar dan Firza, 2018).

2. Persentase eksplan berakar

Akar bagi pertumbuhan tanaman berperan penting dalam penyerapan nutrisi dan zpt dalam media tanam untuk memenuhi kebutuhan hidup tanaman tersebut. Persentase akar dilakukan dengan menggunakan rumus jumlah eksplan yang muncul akar dibagi dengan total eksplan setiap perlakuan dan dikali 100%. Data persentase eksplan berakar ditunjukkan pada tabel 4.

Table 4. Pengaruh penambahan pumpkin dalam media pupuk daun dan air kelapa terhadap persentase eksplan berakar pada tanaman Anggrek hitam secara *In vitro*

Perlakuan	Persentase eksplan berakar (%)
PD 3 g/l+AK 150 ml/l +Pumpkin 5 g/l	55,5 %
PD 3 g/l+AK 150 ml/l +Pumpkin 10 g/l	55,5 %
PD 3 g/l+AK 150 ml/l +Pumpkin 15 g/l	55,5 %
PD 3 g/l+AK 150 ml/l +Pumpkin 20 g/l	44,4 %
PD 3 g/l + AK 150 ml/l	66,6 %
MS + BAP+NAA	44,4 %

Keterangan: PD, media pupuk daun tanpa penambahan pumpkin, AK, Air Kelapa, MS+BAP+NAA, media MS dengan penambahan NAA 0,5 ppm dan BAP 1 ppm

Pada penelitian ini pembentukan akar terjadi pada minggu ke 7 hingga minggu ke 8. Hal ini membuktikan bahwa penggunaan zpt dapat membantu pertumbuhan akar hingga akhir pengamatan. Pembentukan akar ini diduga berasal dari diferensiasi sel-sel yang masih bersifat meristematik (Dari penelitian ini, didapatkan persentase eksplan terbanyak ada pada perlakuan PD yaitu media pupuk daun dan penambahan air kelapa. Penggunaan media pupuk daun dan air kelapa tanpa penambahan pumpkin menunjukkan hasil lebih baik dibandingkan media dengan penambahan pumpkin. Media dengan perlakuan penambahan pumpkin memiliki waktu pertumbuhan yang cenderung lebih cepat namun cenderung lebih rendah dalam memunculkan akar pada semua ulangan.

Menurut Salisbury dan Cleon (1995) menyebutkan bahwa kandungan auksin dan thiamin dalam air kelapa dapat membantu dalam proses pembentukan akar. Thiamin merupakan golongan vitamin B1 yang berfungsi mempercepat pembelahan sel pada meristem akar. Tomia (2011) menyatakan bahwa auksin sangat berperan dalam proses pertumbuhan baik untuk pertumbuhan akar maupun pertumbuhan batang. Sedangkan penggunaan pupuk daun juga mempengaruhi persentase eksplan berakar. Pupuk daun mengandung makronutrien utama pada pupuk daun berupa N, P, K yang dapat memenuhi kebutuhan tanaman muda yang masih aktif menyusun sel baru. Unsur nitrogen sangat diperlukan oleh tanaman terutama untuk pembentukan asam amino dan protein serta asam nukleat. Pupuk daun juga mengandung unsur kalium yang berperan sebagai aktivator berbagai macam enzim di dalam jaringan meristem, termasuk pemunculan akar. Oleh karena itu, pupuk daun sangat berperan dalam pertumbuhan akar (Hasanah *et al.*, 2014)

Pada penelitian ini persentase eksplan berakar tertinggi pada PD yaitu 66,6 % sedangkan persentase eksplan berakar cenderung lebih rendah pada perlakuan penambahan pumpkin dalam media dengan konsentrasi 20 g/l dan MS. Persentase eksplan berakar cenderung lebih tinggi pada PD menunjukkan bahwa penggunaan zpt air kelapa mampu membantu dalam pertumbuhan akar tanaman anggrek hitam. Persentase cenderung lebih rendah ada pada perlakuan penambahan pumpkin 20 g/l dan MS, hal ini diduga penambahan pumpkin dalam kadar tinggi 20 g/l menyebabkan penurunan pertumbuhan akar. Di sisi lain media MS juga memiliki persentase pertumbuhan akar yang cenderung rendah, hal ini diduga penggunaan jumlah sitokinin lebih tinggi sehingga pertumbuhan bagian atas lebih dominan. Selain itu pertumbuhan eksplan selama 8 minggu merupakan waktu inkubasi yang cenderung pendek untuk pertumbuhan akar dimana anggrek memerlukan waktu lebih lama sekitar 6-12 minggu dalam pertumbuhan akar.