

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Anggrek *Vanda tricolor*

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 dijadikan koleksi atau menjualnya ke luar daerah telah mengurangi populasi anggrek tersebut (Metusala, 2006).

Buahnya mengandung biji yang jumlahnya jutaan, sehingga menjadi nilai positif dari anggrek *Vanda tricolor* ini, terutama untuk konservasi anggrek alam yang habitat alaminya adalah di gunung berapi yang sangat aktif yaitu Gunung Merapi. Ukuran biji *Vanda tricolor* sangat kecil bahkan mikroskopis, tidak mempunyai endosperm sebagai cadangan makanan, sehingga di alam keberhasilan perkecambahan bijinya sangat rendah karena harus bersimbiosis dengan sejenis jamur yang disebut mikoriza (Semiarti *et al.*, 2009).

Secara umum, klasifikasi anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* menurut Dressler dan Dodson (2000) adalah : Kingdom : Plantae, Divisi : *Spermatophyta*, Sub Divisi : *Angiospermae*, Kelas : *Monocotyledoneae*, Ordo : *Orchidales*, Familia : *Orchidaceae* , Genus : *Vanda*, Spesies : *Vanda tricolor* Lindl. var. *Suavis*. Anggrek *Vanda 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). Menurut Hendaryono (1998) 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 epifit, anggrek ini berkembang biak dengan menumpang atau menempel pada tumbuhan lain, namun tidak merugikan tanaman yang ditumpangnya. Alat yang digunakan untuk menempel adalah akarnya (Ashari, 1995). Akar yang menempel pada batang umumnya berbentuk agak mendatar mengikuti bentuk permukaan batang, sedangkan rambut akarnya pendek-pendek. Akar ini mempunyai jaringan velamen yang memudahkan akar menyerap air hujan yang jatuh pada kulit pohon inang. Menurut Gunadi (1977) velamen berfungsi sebagai alat pernafasan. Velamen terdiri dari jaringan bunga karang dengan selubung luar berupa selaput berwarna putih dan keadaan sel-selnya hanya berisi udara. Perbanyakan anggrek *Vanda tricolor* dapat dilakukan dengan cara generatif (biji) dan vegetatif. Perbanyakan generatif menggunakan biji dapat secara alami terjadi disekitar akar atau tempat tumbuh ketika buah terbelah dan biji bertebaran. Dapat pula diperbanyak dengan mengambil biji dan menempatkannya pada medium tanam. Namun pertumbuhan biji anggrek *Vanda tricolor* menjadi bibit membutuhkan waktu yang relatif lama. Sementara itu penyebaran biji dengan teknologi yang cukup modern bisa dilakukan di laboratorium khusus (Pranata, 2005). Sementara perbanyakan vegetatif dapat dilakukan dengan cara mengambil bagian tanaman lalu menanamnya secara terpisah dengan induknya. Beberapa cara perbanyakan vegetatif yang biasa dilakukan adalah dengan pemisahan rumpun, menggunakan anakan yang tumbuh liar di ujung umbi, menggunakan stek, dan kultur *in vitro*.

Teknik kultur *in vitro* mampu meregenerasi tanaman yang sama dengan induknya dan tidak memerlukan tempat yang luas.

### **B. Kultur *In Vitro***

Kultur *in vitro* adalah penerapan teori totipotensi, didefinisikan sebagai teknik isolasi bagian tanaman dan menumbuhkannya secara aseptis pada medium buatan yang kaya akan nutrisi dan mengandung zat pengatur tumbuh. Tiap sel terstimulasi untuk memperbanyak diri dan akhirnya beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali. Menurut sifat totipotensi sel, bagian tanaman yang diambil akan dapat tumbuh menjadi individu baru yang lengkap apabila diletakkan di medium yang sesuai (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh beberapa faktor yaitu, asal eksplan seperti bagian; tunas, biji, daun, akar atau bunga, umur tanaman (umumnya tanaman yang telah mencapai fase generatif lambat pertumbuhannya dibandingkan tanaman muda), genotipe tanaman, medium kultur yang mencakup pemberian unsur hara yang lengkap dan tepat sesuai dengan eksplan. Ketepatan dalam pemberian takaran unsur hara karena pertumbuhan eksplan sangat bergantung pada susunan zat makanan yang terlarut dalam medium.

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) adalah senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah ( $< 1$  mg) dapat mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Intan, 2008). ZPT yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* adalah dari golongan auksin dan sitokinin. Perbandingan konsentrasi auksin dengan sitokinin akan menyebabkan pertumbuhan yang berbeda pada eksplan. ZPT auksin yang sering digunakan

dalam kultur *in vitro* adalah NAA. NAA memiliki sifat kimia lebih stabil dibanding IAA dan tidak mudah teroksidasi oleh enzim dan NAA merupakan auksin sintetik yang sering digunakan karena memiliki sifat yang lebih tahan, tidak terdegradasi dan lebih murah. Sitokinin merupakan ZPT yang banyak digunakan untuk memacu inisiasi dan proliferasi tunas. Aktivitas yang terutama ialah mendorong pembelahan sel, menginduksi tunas adventif dan dalam konsentrasi tinggi menghambat inisiasi akar. Diantara beberapa jenis sitokinin, sitokinin tipe urea memiliki aktivitas lebih kuat dibanding tipe purin atau adenine. Beberapa jenis sitokinin diantaranya BAP, *Zeatin*, *Thidiazuron*. Supriyadi (2014) telah berhasil memultiplikasi tunas sarang semut dari eksplan biji dengan menggunakan 1 mg/l *Thidiazuron* dan 0,1 mg/l NAA dalam medium VW.

### **C. Medium *In Vitro***

Medium merupakan faktor penting dalam mengkulturkan sel dan jaringan. Medium yang digunakan, baik berupa bentuk maupun komposisinya dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan yang ditanam. Medium tumbuh yang digunakan dalam kultur jaringan dapat berupa medium cair, padat dan semi padat (Wattimena, 1991). Pertumbuhan kultur dan laju pembentukan tunas dapat dipengaruhi oleh keadaan fisik dari medium ini. Gunawan (1987) menyatakan bahwa di dalam medium harus terdiri dari unsur hara baik makro maupun mikro, serta karbohidrat berupa gula untuk menggantikan karbon dari atmosfer yang dihasilkan melalui proses fotosintesis.

Medium kultur jaringan dibedakan menjadi medium dasar dan medium perlakuan. Menurut Gamborg dan Shyluk (1981), medium dasar yang banyak digunakan adalah *Murashige and Skoog* (MS), karena komposisi garamnya sesuai

untuk morfogenesis, kultur meristem dan regenerasi tanaman. Medium MS memiliki kandungan nitrat, kalium dan amonium yang tinggi. George dan Sherrington (1984) menambahkan bahwa pada umumnya dalam medium MS ditambahkan satu atau lebih vitamin yang berfungsi untuk proses katalis dalam metabolisme eksplan, misalnya *Myo-inositol*, *piridoxin* dan asam folat. Beberapa medium lain yang digunakan dalam kultur jaringan diantaranya B5 yang banyak digunakan untuk kultur jaringan kacang-kacangan terutama kedelai, MS merupakan medium paling cocok untuk kultur haploid *Datura innoxia* Mill (Wetter dan Constabel, 1991), WPM (*Woody Plant Medium*),  $\frac{1}{2}$ MS, *hyponex* dan lain-lain. Medium  $\frac{1}{2}$ MS dapat digunakan untuk menghemat biaya karena hanya menggunakan setengah bagian dari komposisi medium MS.

### **1. Medium MS ( *Murashige and Skoog* )**

Medium *Murashige* dan *Skoog* (MS) sering digunakan karena cukup memenuhi unsur hara makro, mikro dan vitamin untuk pertumbuhan tanaman. Medium MS merupakan perbaikan dari medium *Skoog* pada komposisi garam organiknya, medium MS memiliki kandungan N dalam jumlah tinggi dalam bentuk nitrit dibandingkan jenis medium lainnya. Selain itu medium MS dalam kultur *in vitro* menjadi lebih luas (Gunawan, 1992).

### **2. Medium VW ( *Vacin and Went* )**

Menurut Marlina (2009) dan Yusnita (2004) medium kultur *in vitro* merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan keberhasilan perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro*. Pertumbuhan dan perkembangan tanaman didukung oleh jenis dan kombinasi unsur hara yang berbeda-beda, bila unsur hara yang diperlukan oleh tanaman tidak terpenuhi maka pertumbuhan dan

perkembangan tanaman tersebut akan terhambat. Komposisi medium *Vacin and Went* (VW) merupakan komposisi medium yang paling umum digunakan dalam perbanyakan anggrek secara *in vitro*. Bey dkk. (2006) melaporkan bahwa penggunaan medium VW yang ditambahkan Zat Pengatur Tumbuh Giberelin dapat mempercepat pembentukan *Protocorm Like Bodies* (PLBs) pada tanaman anggrek. Giberelin merupakan senyawa organik yang berperan penting dalam pertumbuhan karena dapat mengaktifkan reaksi enzimatik, terutama pada benih (Wilkins, 1989).

Medium *Vacin and Went* (VW) sangat sering digunakan dalam penelitian kultur jaringan dengan beberapa komposisi didalamnya. Seperti hasil penelitian Rupawan dkk. (2014) menunjukkan komposisi medium VW yang ditambahkan 2 PPM giberelin dan 250 ml air kelapa per liter medium lebih sesuai bagi pertumbuhan anggrek bulan. Rata-rata tinggi planlet, jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah akar anggrek bulan yang tumbuh pada komposisi medium tersebut masing-masing 1,82 cm, 2,55 tunas, 2,00 helai daun dan 2,25 helai akar per planlet. Selain jenis media, Zat Pengatur Tumbuh seperti sitokinin dan auksin juga berpengaruh terhadap pertumbuhan anggrek secara *in vitro*.

### **3. Medium NDM ( *New Doughasima Medium* )**

Medium NDM mengandung beberapa vitamin dan bahan organik yang mendorong pembentukan PLB pada eksplan anggrek. Penelitian mengenai NDM sebagai medium untuk kultur *in vitro* telah dilakukan oleh Tokuhara dan Mii (1993). Dari hasil penelitian, dihasilkan lebih dari 10.000 PLB anggrek *Phalaeonopsis* dan *Doritaenopsis* selama 1 tahun dengan mengkulturkan eksplan

potongan pucuk. Metode ini dapat diadopsi untuk meregenerasikan anggrek *Vanda tricolor*.

#### **D. BAP**

Zat Pengatur Tumbuh menunjang pertumbuhan tanaman adalah senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung dan menghambat serta mengubah proses fisiologi tumbuhan (Abidin, 1995). Zat Pengatur Tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi. Tanpa penambahan Zat Pengatur Tumbuh dalam medium, pertumbuhan sangat terhambat bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali.

Pembentukan kalus, tunas, dan organ-organ ditentukan oleh penggunaan yang tepat dari zat pengatur tumbuh tersebut. 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).

Perbandingan konsentrasi sitokinin lebih besar dari auksin, maka akan menstimulasi pertumbuhan tunas dan daun. Namun apabila sebaliknya akan mengakibatkan stimulasi pada pertumbuhan akar. Jika konsentrasi sitokinin itu sedang dan konsentrasi auksin rendah, maka akan terbentuk kalus (Abidin, 1995). Penambahan sitokinin menginduksi pembentukan tunas secara nyata. Peningkatan jumlah tunas akibat penambahan BAP ternyata berpengaruh buruk pada penampilan tunas yang terbentuk, yaitu roset dengan ruas pendek-pendek. Ada

kemungkinan ini adalah pengaruh buruk dari BAP konsentrasi tinggi (Hoesen, 1996). Golongan sitokinin yang sering ditambahkan dalam medium untuk kultur *in vitro* seperti BAP, Kinetin dan Zeatin Zat Pengatur Tumbuh lainnya seperti *Thidiazuron* juga mampu membantu pertumbuhan tanaman karena mempunyai aktivitas menyerupai sitokinin dan mampu menginduksi proses pembelahan sel meristem untuk membentuk primordia tunas.

Zat Pengatur Tumbuh yang sering ditemukan pada tanaman adalah sitokinin. Jenis-jenis sitokinin yang ditemukan adalah Kinetin, BAP (*benzyl amino purine*), 2-ip (*dimethyl allyl amino purin*). BAP (*benzyl amino purine*) merupakan ZPT golongan sitokinin yang berperan dalam menstimulasi pembelahan sel dan menginduksi pembentukan tunas (Suryowinoto, 1996). Peran khusus BAP (*benzyl amino purine*) 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 BAP (*benzyl amino purine*) merupakan salah satu sitokinin sintetik yang aktif dan daya merangsangnya lebih lama karena tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman. Menurut Noggle dan Fritz (1993) BAP (*benzyl amino purine*) memiliki struktur yang mirip dengan kinetin dan juga aktif dalam pertumbuhan dan proliferasi kalus, sehingga BAP (*benzyl amino purine*) merupakan sitokinin yang paling aktif.

BAP (*benzyl amino purine*) banyak digunakan dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan karena sifatnya stabil, tidak mahal dan mudah tersedia

(Isnaeni, 2008). BAP (*benzyl amino purine*) sebagai salah satu jenis sitokinin lebih berfungsi untuk mendorong pembentukan tunas, menghambat pertumbuhan tinggi, sehingga menekan jumlah daun.

Pada penelitian Rineksane dan Sukarjan (2015) menunjukkan bahwa kalus telah terbentuk pada daun yang ditanam dalam medium NDM ditambah 1 atau 2 mg/l BAP masing-masing dikombinasikan dengan 0,1 mg/l NAA. Latip *et al.*, (2010) menggunakan BAP (0,5 – 3,5 mg/l) yang ditambahkan dalam medium NDM untuk memultiplikasi protocorm anggrek *Phalaenopsis gigantea*.

Pada penelitian ini eksplan masih merespon adanya BAP dalam medium 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*.

## E. NAA

Auksin mempunyai peran fisiologis yang dapat mempengaruhi tanaman yaitu mendorong perpanjangan sel dan organ, mendorong pembentukan akar, mendorong gerakan tropisme, mendorong dominasi apikal, mencegah imbibisi, mendorong pembentukan kalus, dan mendorong pembungaan (Gunawan, 1992). Auksin sintetik antara lain *Napthalane Acetic Acid* (NAA), IAA, IBA, dan 2,4 D.

NAA (*Napthalane Acetic Acid*) adalah senyawa yang termasuk dalam golongan auksin, NAA (*Napthalane Acetic Acid*) merupakan auksin sintetik yang tidak mengalami oksidasi enzimatik. NAA dapat diberikan pada medium kultur

pada konsentrasi yang lebih rendah, berkisar 0,1-0,2 mg/l, (Mutmainah, 2016). Menurut Zaer dan Mapes (1985), NAA (*Napthalane Acetic Acid*) memiliki sifat kimia lebih stabil dibanding IAA dan tidak mudah teroksidasi oleh enzim. Anwar (2007) menambahkan bahwa NAA merupakan auksin sintetik yang sering digunakan karena memiliki sifat yang lebih tahan, tidak terdegradasi dan lebih murah.

NAA (*Napthalane Acetic Acid*) termasuk dalam auksin eksogen sehingga dapat menggantikan hormon IAA (auksin eksogen). NAA (*Napthalane Acetic Acid*) berfungsi untuk meningkatkan pertumbuhan perakaran dan pertumbuhan stek dari tanaman berkayu dan tanaman berbatang lunak. Penambahan auksin pada konsentrasi yang rendah pada medium akan mendorong pembentukan akar adventif, sedangkan pada konsentrasi tinggi cenderung membentuk kalus.