

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl.

2.1.1. Morfologi Tanaman.

Daun anggrek *Vanda* membulat, daun melekat pada batang, dan tulang daunnya sejajar dengan helaian daun. Akar anggrek epifit umumnya lunak dan mudah patah, ujungnya meruncing, licin, dan sedikit lengket. Anggrek *Vanda* mempunyai banyak akar aerial yang masih aktif, ujungnya berwarna hijau, hijau keputihan atau kuning kecoklatan (Gunawan, 1999).

Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. dapat berbunga sepanjang tahun, dengan satu atau dua tangkai bunga per pohonnya. Setiap tangkai muncul sampai 10 kuntum bunga. Diameter bunga mencapai 5 cm. Pada sepala dan petalanya terdapat bercak berwarna ungu dan labellumnya berwarna merah (Suryowinoto, 1994).

2.1.2. Klasifikasi.

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Monocotyledonae

Ordo : Orchidales

Famili : Orchidaceae

Sub Famili : Vandoideae

Genus : *Vanda*

Spesies : *Vanda tricolor* Lindl. (Dalwitz dan Watson, 1999)

2.2. Teknik Kultur “ In Vitro”

Kultur “in vitro”, berasal dari kata *culture* yang berarti budidaya dan *vitrous* berarti transparan. Kultur “in vitro” berarti menumbuhkan sel, jaringan atau organ di dalam suatu wadah yang transparan menjadi tanaman kecil yang lengkap (plantlet) di bawah kondisi lingkungan yang dapat diatur secara aseptis (Pierik, 1987).

Keberhasilan dari kultur “in vitro” ini ditentukan oleh berbagai faktor seperti keadaan yang steril, pengaruh faktor lingkungan, kecukupan nutrien dan substansi organik pada medium tumbuh, serta pemilihan eksplan (Street, 1977).

2.2.1. Media Kultur

2.2.1.1. Air

Air merupakan komponen yang penting di dalam pertumbuhan karena 95 % dari medium mengandung air, untuk tujuan penelitian digunakan air destilasi untuk mempermudah sterilisasi. Air destil paling baik disimpan dalam botol-botol politen, karena gelas dapat mengandung bekas-bekas sodium dan arsenat yang dapat dilepaskan ke air. Apabila penggunaan gelas tidak dapat dihindari maka sebaiknya digunakan gelas Pyrex. Botol-botol yang dipergunakan untuk menyimpan air harus dibersihkan dengan baik (Pierik, 1987).

2.2.1.2 Bahan Pekat

Medium kultur “in vitro” dapat dibedakan menjadi dua yaitu medium cair dan medium padat bila dilihat dari kondisi fisiknya. Menurut Street (1977), medium padat sering digunakan untuk perkembangan dan pemeliharaan kultur kalus. Medium padat adalah medium yang mengandung semua bahan kimia yang dibutuhkan dan ditambahkan bahan pekat.

Agar digunakan secara luas sebagai bahan pematat dalam medium kultur jaringan. Keuntungan penggunaan agar ini adalah antara lain relatif stabil (tersolidifikasi) pada suhu inkubasi dan tidak bereaksi dengan komponen-komponen media lainnya. Menurut Wetter (1991), agar merupakan derivat rumput laut yang digunakan sebagai pematat dari berbagai medium. Agar yang terlarut mengikat air dan menyerap senyawa-senyawa yang terdapat didalam medium..

Sifat gel dari agar bervariasi menurut jenis yang digunakan, dan menurut tingkat keasaman medium. Keasaman yang terlalu rendah biasanya akan menyebabkan medium menjadi lembek, dan tidak baik untuk penanaman eksplan. Konsentrasi umum yang biasa digunakan adalah 0.6 – 0.8 % (w/v). Peningkatan konsentrasi agar akan menyebabkan eksplan kesulitan mengadakan kontak dengan medium, sehingga membatasi pengambilan nutrisi.

2.2.1.3. Gula Sakarida

Jaringan yang dikultur “in vitro” akan berada dalam kondisi yang tidak menguntungkan (“stress”), sehingga fotosintesis tidak dapat berjalan dengan semestinya dan sintesis karbohidrat tidak mencukupi untuk kebutuhan tanaman (Pierik, 1987). Penambahan gula sakarida oleh karena itu diperlukan, agar pertumbuhan dan perkembangan “in vitro” berjalan dengan baik .

Menurut Wetter (1991), yang paling banyak digunakan adalah sukrosa dengan konsentrasi sekitar 1-5%, sebab gula ini juga disintesis dan ditransport secara alami oleh tanaman. Sukrosa sering ditambahkan pada medium kultur jaringan sebagai sumber energi yang diperlukan untuk induksi kalus.

Glukosa dan fruktosa juga sering digunakan. Glukosa dan fruktosa dapat digunakan untuk menggantikan sukrosa karena dapat merangsang pertumbuhan

beberapa jaringan. Pemilihan gula dan konsentrasi yang akan digunakan tergantung dari jaringan tumbuhan yang akan dikulturkan dan tujuan yang ingin dicapai. Konsentrasi gula yang diperlukan juga tergantung pada tipe dan umur eksplan (George dan Sherrington, 1986).

2.2.1.4. Garam Mineral

Menurut Daisy (1994), setiap tanaman membutuhkan paling sedikit 16 unsur untuk pertumbuhannya yang normal. Tiga unsur diantaranya adalah unsur C, H, O yang diambil dari udara, sedangkan 13 unsur lainnya berupa pupuk yang dapat diberikan melalui akar atau melalui daun. Unsur-unsur tersebut diberikan dengan menambahkannya kedalam medium, pada perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan. Semua unsur tersebut dibutuhkan oleh tanaman untuk pertumbuhannya. Ada unsur yang dibutuhkan dalam jumlah yang besar yang disebut unsur makro, ada pula yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit tetapi harus tetap tersedia yang disebut unsur mikro (Welsh, 1991).

Tiap tanaman membutuhkan 6 elemen makronutrien yaitu nitrogen, kalium, magnesium, kalsium, fosfor, belerang, dan tujuh elemen mikronutrien yaitu besi, mangan, seng, tembaga, boron, molibdenum, dan klor dalam bentuk ikatan kimia dan perbandingan tertentu (Wetter, 1991). Menurut Staba (1982), unsur-unsur makro biasanya diberikan dalam bentuk NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan KH_2PO_4 . Sedangkan unsur-unsur mikro biasa diberikan dalam bentuk $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

2.2.1.5. Zat Pengatur Tumbuh (Hormon)

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologis tumbuhan. Zat pengatur tumbuh dalam tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auksin, giberelin, sitokinin, etilen dan inhibitor dengan ciri khas serta pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis tumbuhan (Gunawan, 1991).

Auksin (IAA, ABA, NAA, atau 2,4-D) sering ditambahkan kedalam medium, karena walaupun secara alami beberapa bagian tanaman memproduksi auksin dalam jumlah yang cukup, akan tetapi untuk induksi eksplan perlu penambahan auksin dalam konsentrasi tertentu. Auksin sintetik dan aktif yaitu IBA ("Indole Buteric Acid"), NAA ("Naphtalene Acetic Acid"), dan 2,4-D ("2,4 Dichlorophenoxy acetic acid") digunakan pada konsentrasi 0.001-10 mg/l. Menurut Gunawan (1991), pengaruh rangsangan auksin terhadap jaringan berbeda-beda. Rangsangan yang paling kuat terutama adalah terhadap sel-sel meristem apikal batang dan koleoptil. Pada kadar yang tinggi, auksin lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan. Pengaruh auksin terhadap perkembangan sel menunjukkan adanya indikasi bahwa auksin dapat meningkatkan tekanan osmotik, sintesis protein, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, dan melunakkan dinding sel yang diikuti menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk kedalam sel yang disertai dengan kenaikan volume sel (Wetter, 1991).

Menurut Street (1977), sitokinin merupakan ZPT yang sering digunakan untuk menstimulasi pertumbuhan dan perkembangan. Kinetin, BA (6 Benzil

Aminopurin), 2iP (N^6 - (2 - isopentil) adenin), dan PBA (6-(benzilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl)-9H-purin) umum digunakan. Sitokinin berfungsi dalam merangsang pembelahan sel dalam jaringan eksplan dan merangsang pertumbuhan tunas. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, akan menginduksi pembentukan tunas adventif, tetapi menghambat pembentukan akar (Pierik, 1987).

2.2.1.6. Vitamin

Vitamin yang kadang digunakan dalam kultur "*in vitro*" antara lain ; inositol, vitamin B1, asam pantetonat, riboflavin, piridoksin, biotin, vitamin E ,dan vitamin C. Vitamin berfungsi sebagai katalisator, stimulator pertumbuhan dan meminimalkan stress eksplan dalam kultur (Wetherell,1992).

2.2.1.7. Asam Amino

Asam amino berfungsi sebagai sumber nitrogen organik. Senyawa organik tambahan khususnya asam amino, diperlukan untuk pertumbuhan dan morfogenesis apabila jaringan dikultur dalam media yang tidak mengandung ion amonium. Asam- asam amino tertentu seperti asam aspartat, asparagin, alanin, asam glutamat, glutamin, dapat merangsang pertumbuhan eksplan (Staba, 1982).

2.2.1.8. Air Kelapa

Endosperm cair dari kelapa akan menginduksi sel-sel dewasa yang tidak tumbuh, agar membelah dan tumbuh dengan cepat. Cairan ini sering disebut sebagai air kelapa. Air kelapa sangat menguntungkan dalam menginduksi pertumbuhan pada kalus maupun untuk induksi morfogenesis. Agar penggunaan air kelapa menjadi efektif maka biasanya ke dalam media ditambahkan sekitar 10 sampai 15 persen volume (Narayanasywamy, 1984).

Stimulasi pertumbuhan yang luar biasa menyebabkan banyaknya penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif yang terdapat dalam air kelapa. Substansi yang sudah diidentifikasi sejauh ini antara lain adalah asam amino, asam organik, asam nukleat, purin, gula, gula alkohol, vitamin, mineral dan hormon tumbuh (George dan Sherrington, 1986).

2.2.2. Arang aktif (“Active charcoal”)

Walaupun tidak termasuk ke dalam kelompok zat pengatur tumbuh seperti auksin dan sitokinin, namun arang aktif sering ditambahkan kedalam medium kultur jaringan. Hal ini disebabkan karena arang aktif mampu memodifikasi komposisi medium (George dan Sherrington, 1986).

Menurut Narayanaswamy (1984), beberapa senyawa fenolik tertentu yang menghambat pertumbuhan diserap dengan pori-pori besar yang terdapat pada arang aktif tersebut. Penumbuhan suspensi sel *Allium sp.* mengeluarkan asam fenilasetat, fosfat hidroksida, asam benzoat, asam pelargonik dan asam kaprilik yang berakibat negatif bagi diferensiasi, dan semuanya itu dapat diserap oleh arang aktif.

Menurut Pierik (1987), arang aktif merupakan kayu yang telah dipanaskan selama beberapa jam dengan uap atau udara kering. Mempunyai kegunaan yang sangat luas dalam absorpsi senyawa gas dan partikel terlarut. Sampai saat ini telah diketahui efek-efek yang menguntungkan dari arang aktif tergantung dari tipe kultur yang dilakukan, antara lain adalah dapat menyerap senyawa yang disekresikan oleh jaringan atau senyawa yang ada dalam jaringan yang dapat menghambat pertumbuhan.

2.2.2.1. Struktur dan sifat kimia arang aktif

Arang aktif mengandung unsur yang terikat secara kimia yaitu oksigen dan hidrogen. Unsur tersebut dimungkinkan berasal dari bahan baku yang tertinggal akibat tidak sempurnanya proses karbonisasi atau karena terjadinya ikatan kimia pada proses aktivasi (Hassler, 1963).

Senyawa oksigen dan hidrogen mempunyai pengaruh yang besar pada sifat arang aktif. Unsur tersebut berkombinasi dengan atom-atom C membentuk gugus fungsional tertentu. Gugus fungsional tersebut mempunyai dua tipe yaitu gugus fungsi yang menyebabkan permukaan arang aktif asam dan basa. Arang aktif dapat mengabsorpsi zat – zat tertentu dalam larutan baik melalui pori maupun pada permukaan yang memiliki gugus fungsional yang bersifat asam dan basa (Cheremisinoff, 1978).

2.2.3. Lingkungan Tumbuh

2.2.3.1. Keasaman (pH)

Keasaman (pH) media merupakan faktor lingkungan yang berpengaruh dalam kultur “in vitro”. Keasaman (pH) suatu larutan menyatakan kadar dari ion H^+ dalam larutan. Menurut Gunawan (1995), sel-sel tanaman yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan mempunyai toleransi pH yang relatif sempit dengan titik optimal antara pH 5.6 dan 6.0.

2.2.3.2. Kelembaban relatif (rH)

Kelembaban lingkungan biasanya mendekati 100%, dan kelembaban disekeliling kultur akan mempengaruhi perkembangan eksplan. Kelembaban penting untuk mencegah kultur mengalami kekeringan, dan kelembaban relatif ruang tumbuh kultur jaringan sekitar 70% (Welsh, 1991).

2.2.3.3. Cahaya

Pengaruh cahaya yang terjadi dalam kultur tergantung dari kualitas cahaya dan intensitas penyinaran (Pierik, 1987). Cahaya putih merupakan cahaya yang baik untuk kultur, dan biasanya sebagai pengganti sumber cahaya digunakan lampu fluoresensi. Penggunaan lampu fluoresensi dikarenakan panasnya yang relatif rendah (Wetherell, 1992).

2.2.3.4. Temperatur

Temperatur biasanya dipertahankan konstan antara 24-26°C. Perubahan temperatur tergantung spesies eksperimen. Efek irradiasi akan menyebabkan temperatur dalam botol kultur 3 – 4 °C lebih tinggi dari suhu ruang inkubasi (Pierik, 1987) . Suhu optimum dapat dicapai bila digunakan lampu fluoresensi secara efisien dan dalam ruangan yang menggunakan pendingin ruangan.

2.2.4. Pemilihan Eksplan

Eksplan merupakan bagian tanaman yang digunakan dalam kultur “in vitro”. Umur tanaman, bagian tanaman, dan ukuran eksplan yang digunakan dapat mempengaruhi keberhasilan kultur “in vitro” (Gunawan, 1991).

Penggunaan eksplan daun telah digunakan dalam kultur anggrek *Vanda coruella* dengan ukuran 0.5 – 0.8 cm. Eksplan diambil dari plantlet yang berasal dari *seedling* sehingga tidak memerlukan adanya sterilisasi permukaan. Dalam waktu 12 minggu eksplan mengalami pertumbuhan tunas (Arditti, 1977).

2.3. “Browning” (Pencoklatan)

Tanaman terutama dari spesies tropikal, mengandung substansi fenolik, yang akan teroksidasi bila sel terluka. Eksplan secara umum seringkali berubah menjadi coklat atau hitam segera setelah diisolasi. Apabila hal ini terjadi maka

pertumbuhan dihambat dan jaringan biasanya akan mati (George dan Sherrington, 1986).

Pencoklatan jaringan terjadi melalui aktivitas enzim oksidasi (mengandung Cu) seperti polifenoloksidase yang dibebaskan atau disintesis dalam kondisi oksidatif ketika eksplan terluka. Substrat untuk enzim ini bervariasi namun secara umum berupa o – hidroksifenol. Enzim dan substrat biasanya berada dalam lokasi yang berbeda didalam sel, dan bercampur ketika sel terluka. Pada *Cattleya* senyawa fenol inhibitor berupa asam eukomik dan tiramin yang membuat medium berwarna merah (George dan Sherrington, 1986).

Toksitas fenol disebabkan terutama karena senyawa ini membentuk ikatan hidrogen dengan protein yang irreversibel. Penghambatan pertumbuhan yang tidak dapat diperbaiki lagi, terjadi ketika fenol teroksidasi menjadi senyawa kuinon yang amat aktif. Senyawa ini lalu mensiklase, polimerase dan mengoksidasi protein untuk membentuk senyawa melanin penyebab warna hitam (Naranasywamy, 1984).

Pencegahan “browning” pada eksplan dan medium bisa dicegah dengan berbagai cara yaitu, dengan menghilangkan senyawa fenolik, memodifikasi potensial redoks, menginaktifkan enzim fenoloksidase, serta dengan mengurangi aktivitas fenol (Daisy, 1994). Pada penelitian ini “browning” dicegah dengan cara menghilangkan senyawa fenolik melalui adsorpsi oleh arang aktif.

2.5. Hipotesis

Arang aktif dapat mengadsorpsi eksudasi beracun dan menghilangkan adanya inhibitor pertumbuhan, sehingga penambahan arang aktif dapat mengurangi adanya “browning” pada eksplan dan mempengaruhi pertumbuhan.

Hipotesis yang bisa diambil adalah bahwa semakin banyak konsentrasi arang aktif yang ditambahkan, maka akan semakin sedikit “browning” yang terjadi dan meningkatkan pertumbuhan.

