



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH ARANG AKTIF  
TERHADAP PENCOKELATAN PADA KULTUR DAUN  
*Dendrobium lasianthera* J.J.Sm**

**SKRIPSI**

**MUHAMMAD HEIKAL  
030504051X**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JULI 2011**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH ARANG AKTIF  
TERHADAP PENCOKELATAN PADA KULTUR DAUN  
*Dendrobium lasianthera* J.J.Sm**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**MUHAMMAD HEIKAL  
030504051X**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JULI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Muhammad heikal

NPM : 030504051X

Tanda Tangan : 

Tanggal : 12 Juli 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Muhammad Heikal  
NPM : 030504051X  
Program Studi : Biologi  
Judul Skripsi : Pengaruh Arang Aktif terhadap Pencokelatan pada Kultur Daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia**

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Susiani Purbaningsih, DEA. (.....)

Pembimbing II : Dra. Lestari Rahayu M.Sc. (.....)

Penguji I : Dr. Nisyawati M.S. (.....)

Penguji II : Dr. Andi Salamah (.....)

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 12 Juli 2011

## KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Segala puji milik Allah, kami memuji, meminta pertolongan, dan memohon ampun kepada-Nya serta berlindung diri dari keburukan jiwa kami dan kejelekan perbuatan-perbuatan kami. Barangsiapa yang diberi hidayah oleh Allah tidak ada yang mampu menyesatkannya dan barangsiapa yang disesatkan oleh Allah tidak ada yang mampu untuk memberinya hidayah. Saya bersaksi bahwa tidak ada sesembahan yang berhak disembah selain Allah semata yang tidak ada sekutu bagi-Nya dan saya bersaksi bahwa Muhammad adalah hamba-Nya dan utusan-Nya. Shalawat dan salam semoga tercurah kepada Beliau Shallallahu 'Alayhi Wasallam, seluruh keluarga Beliau dan para sahabat serta seluruh pengikutnya hingga hari kiamat. Amma ba'du.

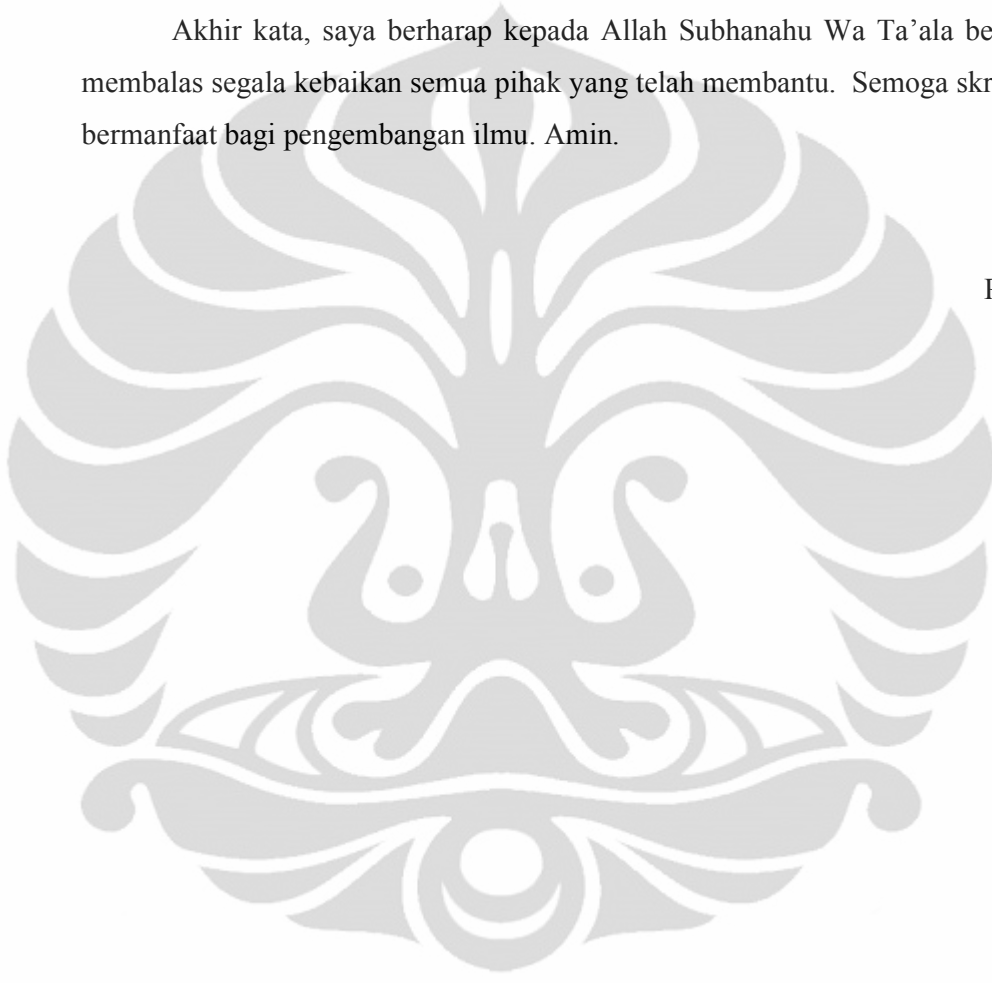
Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak, sangat sulit bagi saya untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Mega Atria M.Si. atas nasihat, bimbingan, dan doanya selaku Pembimbing Akademik.
2. Dr. Susiani Purbaningsih, DEA dan Dra. Lestari Rahayu M.Sc. atas bimbingan dan nasihatnya dalam menyusun skripsi.
3. Dr. Nisyawati M.S. dan Dr. Andi Salamah yang telah bertindak sebagai penguji dalam seminar dan sidang.
4. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku ketua Departemen Biologi.
5. Drs. Amril Djalil M.Si atas bimbingannya dalam kerja praktek.
6. Seluruh dosen Departemen Biologi, khususnya Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc., Drs. Wisnu Wardhana, M.Si., Dra. Titi Soedjiarti, S.U., dan Dra. Nining B. Prihantini, M.Sc.
7. Seluruh karyawan Departemen Biologi, khususnya Pak Taryana, Pak Taryono, Mba Ida, Pak Pri, Mba Asri atas segala bantuannya.
8. Ibuku tercinta Sumiyati dan bapakku tercinta M. Mashuri atas segala bantuan dan doanya.

9. Seluruh teman-teman mahasiswa, khususnya Mba Windri, Ka Ipul, Ka Nunu, Rizka, Galuh, Sigit, Fajar, Budi, Kurnia, Ryujin, Irvan, Giri, dan Bakir.

10. Semua pihak yang telah membantu saya dalam penyusunan skripsi ini yang tidak bisa disebutkan semuanya.

Akhir kata, saya berharap kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu. Amin.



Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Heikal  
NPM : 030504051X  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh Arang Aktif terhadap Pencokelatan pada Kultur Daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

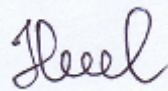
berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 12 Juli 2011

Yang menyatakan



**(Muhammad Heikal)**

## ABSTRAK

Nama : Muhammad Heikal  
Program Studi : Biologi  
Judul : Pengaruh Arang Aktif terhadap Pencokelatan pada Kultur Daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

Pengaruh arang aktif terhadap pencokelatan pada kultur daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm telah diteliti di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Departemen Biologi. Penelitian bertujuan untuk mengetahui respons eksplan terhadap penambahan arang aktif pada medium  $\frac{1}{2}$  MS (Murashige dan Skoog) modifikasi dan untuk mengetahui konsentrasi arang aktif yang tepat dalam mengurangi pencokelatan pada kultur daun *Dendrobium lasianthera*. Pemberian arang aktif pada medium  $\frac{1}{2}$  MS modifikasi dibagi menjadi empat kelompok: Kontrol (K = 0%), Perlakuan 1 (P1 = 0,1%), Perlakuan 2 (P2 = 0,2%), dan Perlakuan 3 (P3 = 0,3%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan arang aktif 1%, 2%, dan 3% dapat mengurangi pencokelatan, yaitu 10% eksplan mengalami pencokelatan, 78% eksplan tetap hijau, dan 12% eksplan mengalami *bleaching*. Konsentrasi arang aktif 3 g/l cenderung lebih baik dalam mengurangi pencokelatan.

Kata kunci : *Dendrobium lasianthera*, pencokelatan, arang aktif  
xiv + 37 hlm : 11 gambar; 2 tabel; 4 lampiran  
Daftar Pustaka : 42 (1987--2009)



## ABSTRACT

Name : Muhammad Heikal  
Study Programme : Biologi  
Title : Influence of Activated Charcoal to Browning in Leaf Culture of *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

The effect of activated charcoal to browning in leaf culture of *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm were studied in the Laboratory of Plant Physiology at Department of Biology. This study was aimed to know the respons of explants and to determine the best concentration of activated charcoal to minimize the browning. Treatment of activated charcoal in ½ MS medium divided into four group: Control (K = 0%), Treatment 1 (P1 = 0,1%), Treatment 2 (P2 = 0,2%), and Treatment 3 (P3 = 0,3%). Explant responded by browning (10%), staying green (78%), and bleaching (12%). The result showed that activated charcoal 1%, 2%, and 3% can minimize the effect of browning. The best result were obtained with ½ MS medium supplemented with 3 g/l activated charcoal.

Key words : *Dendrobium lasianthera*, browning, activated charcoal  
xiv + 37 pages : 11 pictures; 2 tables; 4 attachment  
Bibliography : 42 (1987--2009)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI .....	vii
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm .....	4
2.1.1 Klasifikasi dan Deskripsi .....	4
2.1.2 Perkembangbiakan Alami .....	4
2.2 Kultur <i>in vitro</i> <i>Dendrobium</i> dan Faktor-faktor yang Memengaruhinya .....	6
2.2.1 Medium .....	6
2.2.2.1 Makronutrien dan mikronutrien .....	7
2.2.2.2 Vitamin .....	7
2.2.2.3 Asam amino .....	7
2.2.2.4 Gula .....	8
2.2.2 Zat Pengatur Tumbuh .....	8
2.2.2.3 Auksin .....	8
2.2.2.4 Sitokinin .....	9
2.2.3 Eksplan .....	9
2.2.4 Lingkungan .....	10
2.3 Pencokelatan sebagai Salah Satu Masalah dalam Kultur <i>in vitro</i> .....	11
2.4 Arang Aktif sebagai Salah Satu Solusi untuk Mengurangi Pencokelatan ..	12
<b>3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>15</b>
3.1 Lokasi dan Waktu .....	15
3.2 Alat dan Bahan .....	15
3.2.1 Alat .....	15
3.2.2 Bahan .....	15
3.2.2.1 Tanaman donor .....	15
3.2.2.2 Eksplan .....	16
3.2.2.3 Bahan kimia .....	16
3.2.2.4 Bahan habis pakai .....	16
3.2.2.5 Medium .....	16
3.3 Cara Kerja .....	16
3.3.1 Pembuatan Larutan Stok .....	16

3.3.2	Pembuatan Medium.....	17
3.3.3	Sterilisasi Alat.....	19
3.3.4	Penanaman Eksplan.....	19
3.3.5	Pemeliharaan Kultur.....	19
3.3.6	Pengamatan.....	20
3.3.6.1	Parameter kualitatif.....	20
3.3.6.2	Parameter kuantitatif.....	20
3.3.7	Penyusunan dan Analisis Data.....	20
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>21</b>
	Respons Eksplan Daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm.....	21
4.1	Eksplan yang Mengalami Pencokelatan pada Kultur Daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm.....	26
4.2	Eksplan yang Tetap Hijau pada Kultur daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm.....	27
4.3	Eksplan yang mengalami <i>bleaching</i> pada kultur daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm.....	28
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>30</b>
	<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>31</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>35</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1(1)	Tanaman <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm .....	5
Gambar 2.1.1(2)	Bunga <i>Dendrobium lasianthera</i> yang tersusun dari (a) petal lateral, (b) sepal dorsal, (c) labellum, dan (d) sepal lateral.....	5
Gambar 2.3	Oksidasi fenol menjadi quinon .....	11
Gambar 4(1)	Diagram pie respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium ½ MS modifikasi.....	21
Gambar 4(2)	Diagram batang rerata respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium ½ MS modifikasi.....	23
Gambar 4(3)	Eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang mengalami pencokelatan pada (a) Kontrol dan (b) Perlakuan 1 .....	24
Gambar 4(4)	Eksplan yang mengalami <i>Bleaching</i> pada (a) Kontrol, (b) Perlakuan 1, (c) Perlakuan 2, dan (d) Perlakuan 3 .....	25
Gambar 4(5)	Kontaminasi eksplan pada Kontrol .....	25
Gambar 4.1	Diagram batang rerata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang mengalami pencokelatan .....	26
Gambar 4.2	Diagram batang rerata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang tetap hijau .....	27
Gambar 4.3	Diagram batang rerata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang mengalami <i>bleaching</i> .....	28

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.3.1	Komposisi bahan dasar dan bahan untuk larutan stok medium Murashige & Skoog (MS) 1962 modifikasi .....	18
Tabel 4	Respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium ½ MS modifikasi .....	22

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium ½ MS modifikasi pekan pertama .....	35
Lampiran 2	Respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium ½ MS modifikasi pekan kedua .....	36
Lampiran 3	Respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium ½ MS modifikasi pekan ketiga .....	37
Lampiran 4	Penelitian Anggrek yang Menggunakan Arang aktif .....	38

## BAB I PENDAHULUAN

*Dendrobium* memiliki lebih dari 1000 spesies di alam dan merupakan genus anggrek terbesar kedua di dunia (Puchooa 2004: 884). *Dendrobium* merupakan anggrek yang banyak digemari karena memiliki bentuk dan variasi warna yang beragam (Widiastoety & Bahar 1995: 76; Sunitibala & Kishor 2009: 448). Selain itu, bunga *Dendrobium* tidak cepat layu saat dimanfaatkan sebagai bunga potong (Widiastoety & Bahar 1995: 76). Terbukti bahwa *Dendrobium* adalah salah satu genus terpenting dalam industri bunga potong di Asia Tenggara (Arditti 2008: 531).

*Dendrobium lasianthera* merupakan anggrek spesies yang berasal dari Papua Nugini (O'Byrne 1994: 244). *Convention on International Trade in Endangered Species Wild Fauna and Flora* (CITES) memasukkan anggrek *D. lasianthera* ke dalam kategori Appendiks II, hal itu berarti anggrek tersebut dapat terancam punah jika perdagangannya tidak diatur dengan jelas. Terkait dengan hal tersebut, perlu diadakan konservasi dengan tujuan mengembangkan metode untuk menghindari kepunahan spesies (Primack *dkk.* 1998: 2). Budidaya merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menyelamatkan anggrek spesies (Dressler 1990: 118).

*Dendrobium lasianthera* berkembangbiak secara vegetatif dengan membentuk tunas pada pangkal batang, sedangkan secara generatif melalui biji (O'Byrne 1994: 244). Namun, perkembangbiakan alami tersebut relatif sulit terjadi. Hal tersebut dikarenakan perkecambahan biji secara alami membutuhkan simbiosis dengan fungi untuk memperoleh nutrisi dari substrat (Dressler 1990: 76--77; Anjum *dkk.* 2006: 1738).

Fay (1994) menyatakan bahwa solusi tepat untuk tumbuhan yang sulit dikembangbiakan secara konvensional ialah dengan cara kultur *in vitro* (lihat Aktar *dkk.* 2007: 8). Perbanyakkan melalui kultur *in vitro* dapat menghasilkan anakan dalam jumlah besar, seragam, dan lebih cepat daripada secara konvensional (Anjum *dkk.* 2006: 1738). Keuntungan lain dari kultur *in vitro* dibandingkan metode konvensional di antaranya hanya menggunakan sedikit eksplan, cenderung terhindar dari virus, kondisi lingkungan dapat diatur, dan tidak

tergantung musim (George *dkk.* 2008: 30). Kultur *in vitro* secara umum dipengaruhi oleh genotip, medium, zat pengatur tumbuh (ZPT), lingkungan kultur, dan eksplan (George & Sherrington 1984: 125).

Kultur *in vitro Dendrobium* telah banyak dilakukan, di antaranya adalah *Dendrobium transparens* (Alam *dkk.* 2002: 111--115; Sunitibala & Kishor 2009: 448--452), *Dendrobium formosum* (Nasirudin *dkk.* 2003: 955--957), *Dendrobium microbulbon* (Sharma *dkk.* 2007: 381--384), *Dendrobium strongylanthum* (Kong *dkk.* 2007: 61--64), *Dendrobium candidum* (Peng Zhao *dkk.* 2008: 178--185), dan *Dendrobium densiflorum* (Jian Ping Luo *dkk.* 2008: 333--340). Eksplan yang sudah digunakan dalam kultur *in vitro Dendrobium* di antaranya ujung tunas, meristem, tunas aksilar, nodus, daun, tangkai bunga, nodus batang, dan *pseudobulb* (Arditti 2008: 518--555).

Informasi tentang kultur *in vitro* vegetatif *D. lasianthera* belum diketahui sehingga perlu dilakukan penelitian untuk memperoleh medium dasar yang tepat. Akan tetapi, pada prapenelitian terdapat masalah pencokelatan. Pencokelatan yang terjadi diduga karena oksidasi senyawa fenol dan terjadi saat sel terluka (George *dkk.* 2008: 6). Oleh karena itu, diperlukan solusi untuk mencegah pencokelatan agar perbanyak *D. lasianthera* secara *in vitro* berjalan optimal. Salah satu solusi untuk mencegah pencokelatan dapat digunakan arang aktif sebagai adsorban (George & Sherrington 1984: 335; Van Staden & Pan 1998: 160; Abdelwahd *dkk.* 2008: 1000; Arditti 2008: 96--99; George *dkk.* 2008: 258; Thomas 2008: 621).

Konsentrasi arang aktif yang telah digunakan pada kultur *in vitro* anggrek berkisar pada 0,001--2 g/l (Lampiran 4) (Thomas 2008: 626--627). Penggunaan arang aktif dengan konsentrasi 2 g/l dapat menghilangkan efek fenol pada anggrek *Disa* spp. (Thomas 2008: 626). Selain itu, penelitian pada tanaman *Hyophorbe lagenicaulis* menunjukkan bahwa medium MS yang ditambahkan 2 g/l arang aktif dapat mencegah pencokelatan (Thomas 2008: 622 & 623). Akan tetapi, konsentrasi arang aktif yang tepat untuk mengurangi pencokelatan pada kultur *in vitro D. lasianthera* belum diketahui. Oleh karena itu, perlu diketahui konsentrasi arang aktif yang tepat sehingga pencokelatan dapat dicegah tanpa menghambat pertumbuhan eksplan.

Penelitian ini menggunakan daun anggrek *Dendrobium lasianthera* sebagai eksplan. Daun tersebut berasal dari planlet hasil kultur *in vitro*. Eksplan daun ditanam pada medium  $\frac{1}{2}$  MS yang ditambahkan NAA 1 mg/l dan BAP 0,1 mg/l (Kontrol) serta diberi perlakuan penambahan arang aktif pada konsentrasi 1 g/l, 2 g/l, dan 3 g/l.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui respons eksplan terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium  $\frac{1}{2}$  MS modifikasi dan untuk mengetahui konsentrasi arang aktif yang tepat untuk menghindari pencokelatan pada kultur daun *D. lasianthera*. Hipotesis penelitian adalah eksplan tidak mengalami pencokelatan pada medium yang ditambahkan arang aktif dan penambahan arang aktif dengan konsentrasi 2 g/l lebih tepat dalam mengurangi pencokelatan dibandingkan konsentrasi 1 g/l dan 3 g/l. Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian tingkat lanjut mengenai kultur *in vitro* *D. lasianthera* karena pencokelatan eksplan merupakan masalah utama yang harus diatasi.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

#### 2.1.1 Klasifikasi dan deskripsi

*Dendrobium lasianthera* termasuk dalam famili Orchidaceae dan kelas Monocotyledoneae (Dressler 1990: 201--231). *Dendrobium lasianthera* dapat ditemukan pada ketinggian 1--100 meter di atas permukaan laut. Habitat asli *D. lasianthera* berada di Papua Nugini. *Dendrobium lasianthera* hidup menempel pada pohon atau disebut epifit (O'Byrne 1994: 244; Millar 1999: 61). Pada umumnya, *D. lasianthera* menempel pada cabang pohon yang ada di hutan hujan tropis (Millar 1999: 61).

Angrek *D. lasianthera* umumnya dapat tumbuh sampai 2 m, memiliki batang yang kuat dan keras serta berdaun hijau tua (Gambar 2.1.1(1)).

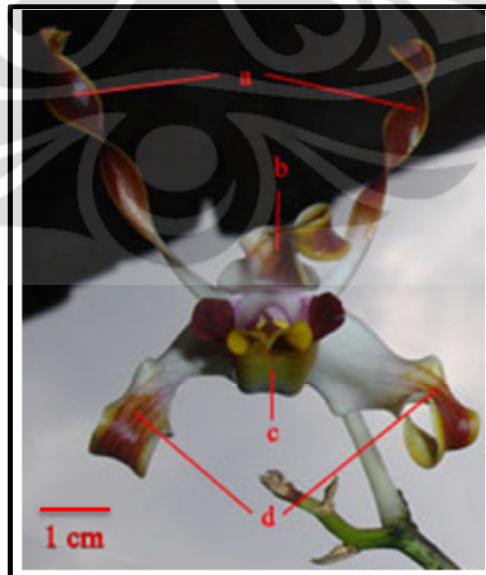
*Dendrobium lasianthera* memiliki perbungaan majemuk. Tangkai bunga utama panjangnya berkisar 35--50 cm dengan jumlah bunga antara 10 dan 12 kuntum. Petalnya tegak dan melintir berwarna cokelat sampai merah tua dengan kilau merah nyala dan tepinya berwarna kuning. Sepal memiliki warna yang sama dengan petal dan juga melintir (Gambar 2.1.1(2)) (Millar 1999: 61).

#### 2.1.2 Perkembangbiakan alami

*Dendrobium lasianthera* berkembangbiak secara vegetatif dengan membentuk tunas pada pangkal batang (Dressler 1990: 22--24), sedangkan secara generatif menggunakan biji. Biji angrek tidak memiliki endosperm (Batygna *dkk.* 2003: 22). Perkecambahan biji secara alami membutuhkan simbiosis dengan fungi untuk memperoleh nutrisi dari substrat (Dressler 1990: 76--77; Anjum *dkk.* 2006: 1738).



Gambar 2.1.1(1) Tanaman *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm  
[Dokumentasi pribadi]



Gambar 2.1.1(1) Bunga *Dendrobium lasianthera* yang tersusun dari  
(a) petal lateral, (b) sepal dorsal, (c) labellum, dan (d) sepal lateral  
[Dokumentasi pribadi]

## 2.2 Kultur *in vitro* *Dendrobium* dan Faktor-faktor yang Memengaruhinya

Anggrek *Dendrobium* yang telah diperbanyak secara vegetatif *in vitro* di antaranya *D. antennatum* (Kusmianto 2008: 1--72), *D. transparens* (Sunitibala & Kishor 2009: 448--452), dan *D. densiflorum* (Jian-Ping Luo *dkk.* 2008: 333--340). Sementara itu, Anggrek *Dendrobium* yang telah diperbanyak secara generatif *in vitro* di antaranya *D. transparens* (Alam *dkk.* 2002: 111-115), *D. strongylanthum* Rchb.f. (Kong *dkk.* 2007: 61--64), dan *D. densiflorum* (Jian-Ping Luo *dkk.* 2008: 333--340). Medium yang telah digunakan pada kultur *in vitro* *Dendrobium* di antaranya VW (Vacin & Went), Knudson (Puchooa 2004: 884--888), ½ MS (Sunitibala & Kishor 2009: 448--452), B5, N6 (Kong *dkk.* 2007: 61--64), New Phalaenopsis (Aktor *dkk.* 2008: 48--51), Hyponex, MS (Murashige & Skoog), dan Knudson C (Alam *dkk.* 2002: 111--115).

Eksplan yang telah digunakan dalam kultur *in vitro* anggrek adalah ujung tunas, meristem, tunas aksilar, daun, tangkai bunga, nodus batang, dan *pseudobulb* (Arditti 2008: 518--555). Eksplan daun yang pertama kali dilaporkan dapat menghasilkan PLBs (*Protocorm-like bodies*) berasal dari *Cymbidium* (Wimber 1965) (*lihat* Arditti 2008: 48). Penelitian kultur *in vitro* *Dendrobium* menggunakan eksplan daun dengan tujuan untuk memperoleh PLBs telah berhasil dilakukan oleh Nasiruddin *dkk.* (2003: 255--257). Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa medium ½ MS yang ditambahkan bubuk pisang merupakan media terbaik untuk kultur *in vitro* *Dendrobium*. Faktor yang memengaruhi kultur *in vitro* dapat dibagi menjadi empat, yaitu medium, zat pengatur tumbuh, eksplan, dan lingkungan (George *dkk.* 2008: 1--5).

### 2.2.1 Medium

Secara umum, medium kultur *in vitro* mengandung makronutrien, mikronutrien, gula, zat pengatur tumbuh, vitamin, zat pematat (agar), asam amino, dan buffer (George *dkk.* 2008: 65--66). Nutrisi diambil oleh tumbuhan secara aktif dan pasif. Pengambilan nutrisi dipengaruhi oleh pH dan suhu (George *dkk.* 2008: 67). Medium MS merupakan medium yang umum digunakan pada

hampir semua jenis tumbuhan (Gunawan 1987: 198; Pierik 1987: 63). Kadar N-anorganik dalam medium MS lebih tinggi dibandingkan pada medium lain (George & Sherrington 1984: 189).

Medium MS dapat dimodifikasi kadar atau jumlahnya sesuai dengan tujuan kultur (Wetter & Constabel 1991: 2--9). Kadar makronutrien dan mikronutrien medium MS dapat dimodifikasi menjadi setengah kali ( $\frac{1}{2}$  MS) atau seperempat kali ( $\frac{1}{4}$  MS) kadar resep (Kong *dkk.* 2007: 61). Medium yang digunakan pada kultur *in vitro* anggrek menunjukkan kebutuhan spesifik setiap spesies, hibrid, tumbuhan, dan asal biji (Arditti 2008 :63).

#### 2.2.1.1 Makronutrien dan mikronutrien

Makronutrien dibutuhkan dalam jumlah banyak oleh tumbuhan, sedangkan mikronutrien dibutuhkan dalam jumlah sedikit. Unsur makronutrien di antaranya Nitrogen (N), Fosfor (P), Potasium (K), Sodium (Na), Magnesium (Mg), Sulfur (S), Kalsium (Ca), dan Klorida (Cl). Unsur mikronutrien di antaranya Mangan (Mn), Zinc (Zn), Boron (B), Cuprum (Cu), Molibdenum (Mo), Cobalt (Co), Alumunium (Al), Nikel (Ni), Iodin (I), Silikon (Si), dan Iron (Fe) (George *dkk.* 2008: 65--102).

#### 2.2.1.2 Vitamin

Vitamin dibutuhkan oleh tumbuhan sebagai katalis metabolisme. Vitamin yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* adalah *thiamine*, *nicotinic acid*, *pyridoxine*, dan *myo-inositol*. *Thiamine* merupakan kofaktor penting dalam metabolisme karbohidrat dan berperan langsung dalam biosintesis beberapa asam amino (George *dkk.* 2008: 115--119).

#### 2.2.1.3 Asam amino

Asam amino mempunyai peran utama, yaitu sebagai agen pengkhelat sehingga meningkatkan ketersediaan beberapa mikronutrien. Asam amino juga

berfungsi sebagai buffer medium sehingga menjaga pH tetap stabil. Fungsi lainnya adalah sebagai nutrisi (George *dkk.* 2008: 123 & 124).

#### 3.2.1.4 Gula

Gula berperan penting dalam kultur *in vitro*, yaitu sebagai sumber energi dan sumber karbon. Sukrosa adalah gula yang umum digunakan dalam kultur jaringan. Sukrosa dalam medium kultur biasanya terhidrolisis secara total atau sebagian menjadi glukosa dan fruktosa. Sebagian hidrolisis sukrosa terjadi saat medium disterilisasi menggunakan autoklaf. Hidrolisis sukrosa juga terjadi pada medium saat proses kultur *in vitro* berlangsung. Proses hidrolisis tersebut dilakukan oleh enzim invertase yang berada pada dinding sel tumbuhan atau enzim invertase yang disekresi keluar sel. Alternatif sukrosa dapat digunakan glukosa, maltosa, dan raffinosa (George *dkk.* 2008: 124--132).

#### 2.2.2 Zat pengatur tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh adalah senyawa berkonsentrasi rendah yang mampu mengatur pertumbuhan atau morfogenesis tumbuhan (George *dkk.* 2008: 3 & 175). Zat pengatur tumbuh dapat dibagi menjadi lima kelompok, yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen, dan asam absisat. Auksin dan sitokinin adalah senyawa paling penting dalam mengatur pertumbuhan dan morfogenesis pada kultur *in vitro* (George *dkk.* 2008: 175).

##### 2.2.2.1 Auksin

Auksin sudah digunakan secara universal dalam kultur *in vitro* tumbuhan. Kombinasi auksin dengan sitokinin dapat meningkatkan pertumbuhan kalus, suspensi sel, dan mengatur morfogenesis. Auksin mengontrol pembelahan dan pemanjangan sel sehingga berperan dalam pembentukan meristem atau jaringan lain yang belum terdiferensiasi. Jaringan yang sudah terdiferensiasi akan dikontrol polaritasnya oleh auksin. Auksin juga mengatur dominansi apikal pada

semua tumbuhan. Pemilihan auksin dan konsentrasinya tergantung pada tipe pertumbuhan dan atau perkembangan yang dibutuhkan, transfer auksin dalam jaringan target, inaktivasi auksin pada medium dan eksplan, auksin endogen pada eksplan, sensitifitas eksplan terhadap auksin, serta interaksi auksin eksogen dengan auksin endogen (George *dkk.* 2008: 175 & 176).

Auksin dapat terbentuk secara alami dan buatan (sintetis). Contoh auksin alami adalah IAA (*Indol Acetic Acid*), sedangkan auksin buatan adalah NAA (*Naphthalene Acetic Acid*), IBA (*Indol Butyric Acid*), dan 2,4 D (*Dichlorophenoxy acetic acid*). Secara umum, auksin sintetis lebih stabil dan lebih aktif dibandingkan auksin alami (Arditti 2008: 73). Sebagian besar auksin hancur jika diautoklaf pada suhu 110--120° C selama 50--60 menit, dan khususnya pada pH tidak asam. Autoklaf pada pH rendah dan faktor lain dapat merusak IAA (Posthumus, 1971) (*lihat* Arditti 2008: 76). *Indol Acetic Acid* (IAA) dan IBA pada medium dapat terdegradasi oleh cahaya (Van Staden & Pan 1998: 157).

#### 2.2.2.2 Sitokinin

Sitokinin menginisiasi proses sintesis protein dan berperan dalam mengatur siklus sel serta menstimulasi pembelahan sel. Sitokinin juga dapat meningkatkan kematangan kloroplas dan menghambat pengguguran daun. Kinetin adalah sitokinin yang pertama kali ditemukan (George *dkk.* 2008: 205). Sitokinin alami adalah zeatin, sedangkan sitokinin sintetis adalah kinetin (6-*furfuryl aminopurine*), *benzyladenine* (*N6-benzylaminopurine*, *N6-benzyladenine*, BA, BAP), *dimethylaminopurine* (DMAP), dan *thidiazuron* (TDZ). Pada umumnya, sitokinin tidak rusak jika diautoklaf (Arditti 2008: 76--77).

#### 2.2.3 Eksplan

Eksplan adalah organ kecil atau potongan jaringan yang berasal dari tumbuhan donor (George *dkk.* 2008: 4). Pemilihan eksplan berdasarkan pada jenis kultur yang diinisiasi, tujuan kultur, dan spesies yang digunakan. Secara *in vitro*, kalus dapat terinduksi hampir dari semua bagian tumbuhan (Hopkins 1999: 478).

Salah satu tipe eksplan yang dapat digunakan untuk menghasilkan *Protocorm-like bodies* adalah daun. Menurut penelitian Nasiruddin *dkk.* (2003: 255), eksplan daun *Dendrobium* berhasil diinisiasi untuk dapat membentuk kalus atau PLBs. Faktor-faktor yang terkait dengan eksplan daun yang digunakan dalam kultur *in vitro*, antara lain kesehatan tumbuhan dan faktor perlukaan (Pierik 1987: 110--112), umur eksplan (George & Sherrington 1984: 171), dan posisi eksplan terhadap medium (Loveless 1983: 119; Hopkins 1999: 150). Sumber eksplan yang lebih mudah dalam membentuk kalus umumnya berasal dari tumbuhan yang sehat serta bebas dari patogen (Pierik 1987: 110). Menurut George & Sherrington (1984: 171), umur eksplan berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur. Eksplan yang masih muda umumnya banyak memiliki sel-sel yang bersifat meristematis dibandingkan dengan eksplan yang lebih tua. Posisi daun bagian abaksial umumnya bersentuhan dengan medium, sehingga memudahkan eksplan menyerap nutrisi karena sebagian besar stomata daun pada tanaman herba dikotil umumnya berada di bagian abaksial (Loveless 1983: 119; Hopkins 1999: 150). Pada bagian eksplan yang dilukai terjadi penyerapan nutrisi dan zat pengatur tumbuh sehingga terbentuk kalus lebih awal dibandingkan daerah yang tidak dilukai (Pierik 1987: 112).

#### 2.2.4 Lingkungan

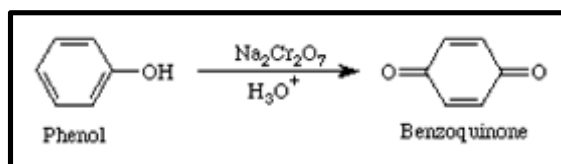
Pencahayaan, suhu, dan derajat keasaman (pH) merupakan faktor yang perlu diperhatikan untuk pertumbuhan dan perkembangan kultur (Pierik 1987: 65). Tumbuhan di alam tumbuh di bawah sinar matahari. Tumbuhan yang dikultur secara *in vitro* menggunakan cahaya buatan yang menyerupai cahaya matahari (Arditti 2008: 1429). Fotoperiodisitas pada kultur *in vitro* anggrek berkisar pada 0--24 jam (Arditti 2008: 113). Pemaparan cahaya yang terlalu lama (24 jam) dapat menyebabkan eksplan mengalami *bleaching* (Poobathy *dkk.* 2009: 73). Cahaya juga dapat menghambat pembelahan sel pada eksplan di beberapa kasus (George *dkk.* 2008: 443). Selain itu, cahaya tampak dapat meningkatkan biosintesis senyawa fenol pada kloroplas (Kefeli 2003: 15).

Suhu pada pemeliharaan anggrek umumnya 22--26<sup>0</sup> C (Arditti & Ernst 1993: 610). Derajat keasaman (pH) merupakan ukuran konsentrasi ion hidrogen (H<sup>+</sup>) yang mempunyai efek terhadap eksplan. Derajat keasaman (pH) dapat memengaruhi kelarutan garam, pengambilan unsur pada medium, dan efisiensi agar (George *dkk.* 2008: 143). Derajat keasaman yang umum digunakan dalam kultur *in vitro* anggrek berkisar 5,6--5,8 (Arditti & Ernst 1993: 61).

### 2.3 Pencokelatan sebagai Salah Satu Masalah dalam Kultur *in vitro*

Eksplan dapat mengalami pencokelatan setelah diisolasi dan hal tersebut menghambat pertumbuhan sehingga jaringan menjadi mati. Eksplan yang dipotong dapat mengeluarkan senyawa fenol. Oksidasi senyawa fenol akan menghambat aktifitas enzim dan menyebabkan media menjadi hitam. Kemudian, eksplan menjadi hitam dan mati (Arnaldos *dkk.* 2001: 316; Ozyigit *dkk.* 2007: 7; George *dkk.* 2008: 6; Shagufta naz *dkk.* 2008: 2536). Jaringan muda lebih rentan mengalami pencokelatan dibandingkan jaringan tua (George & Sherrington 1984: 334--340).

Pencokelatan jaringan disebabkan oleh enzim oksidase yang mengandung *coper* (Cu) seperti fenoloksidase dan tirosin karena enzim tersebut menciptakan kondisi oksidatif saat jaringan terluka. Senyawa fenol mempunyai peran penting dalam oksidasi IAA. Toksisitas senyawa fenol kemungkinan tergantung ikatan hidrogen pada protein. Pertumbuhan tidak dapat diperbaiki saat fenol teroksidasi menjadi quinon yang sangat aktif (Gambar 2.3) (George & Sherrington 1984: 335).



Gambar 2.3 Oksidasi fenol menjadi quinon  
[Sumber: Paselk, R. 2004.]

Fenol mungkin dapat berfungsi sebagai modulator dalam perkembangan tumbuhan, yaitu dengan mengkatalis reaksi IAA. Akan tetapi, beberapa



monofenol menghambat oksidasi IAA. Efek fenol lainnya adalah meningkatkan *rigidity* dinding sel, yaitu berperan sebagai jembatan molekuler di antara komponen dinding sel (Fry 1986) (*lihat Arnaldos dkk.* 2001: 315). Fenol dapat menghambat atau menstimulasi pertumbuhan tergantung dari spesies (Ozyigit *dkk.* 2007: 8).

Pencokelatan dapat dikurangi dengan beberapa cara di antaranya mengurangi konsentrasi senyawa fenol, menonaktifkan enzim fenolase, dan mengurangi konsentrasi enzim fenolase. Senyawa fenol dapat dikurangi dengan melakukan pencucian. Eksplan yang diisolasi dapat direndam dalam air steril selama 2--3 jam sebelum ditanam pada medium (George & Sherrington 1984: 335 & 336). Selain itu, solusi untuk mengurangi pencokelatan dapat menggunakan arang aktif, *cysteine*, asam askorbat, PVP (*Polyvinylpyrrolidone*), dan *silver nitrate* (Abdelwahd *dkk.* 2008: 1000; George *dkk.* 2008: 621).

Menurut hasil penelitian Abdelwahd *dkk.* (2008: 997--1002), arang aktif dan asam askorbat lebih efektif dibandingkan *cysteine* dan *silver nitrate* dalam mencegah pencokelatan pada tanaman *Vicia faba*. Selain itu, arang aktif lebih efektif dibandingkan asam askorbat dan PVP dalam mengurangi pencokelatan pada *Dipterocarpus alatus* dan *Dipterocarpus intricatus* (Pan & Van Staden 1998: 156). Sementara itu, Chang *dkk.* (2001: 497) menyatakan bahwa, arang aktif yang dikombinasikan dengan *silver nitrate* lebih efektif dibandingkan PVP dan asam askorbat pada *Taxus mairei*.

#### **2.4 Arang aktif sebagai Salah Satu Solusi untuk Mengurangi Pencokelatan**

Penelitian tentang penggunaan arang aktif dalam kultur *in vitro* tumbuhan sudah sering dilakukan. Arang aktif mempunyai sifat adsorptif yang kuat terhadap koloid, benda padat, gas, dan uap air. Arang aktif cenderung mengadsorbsi zat aromatik seperti fenol, auksin, dan sitokinin. Zat terlarut dalam larutan atau medium yang terkena kontak dengan arang aktif akan teradsorbsi. Adsorbsi akan terus berlanjut sampai terjadi keseimbangan antara *adsorbed* dan *desorbed*. Kapasitas daya serap arang aktif tergantung pada kepadatan medium,

kemurnian arang aktif dan pH. Selain itu, penggunaan arang aktif pada kultur *in vitro* dipengaruhi oleh spesies yang dikultur (Pan & Van Staden 1998: 155--156).

Secara umum, efek arang aktif dalam kultur *in vitro* adalah:

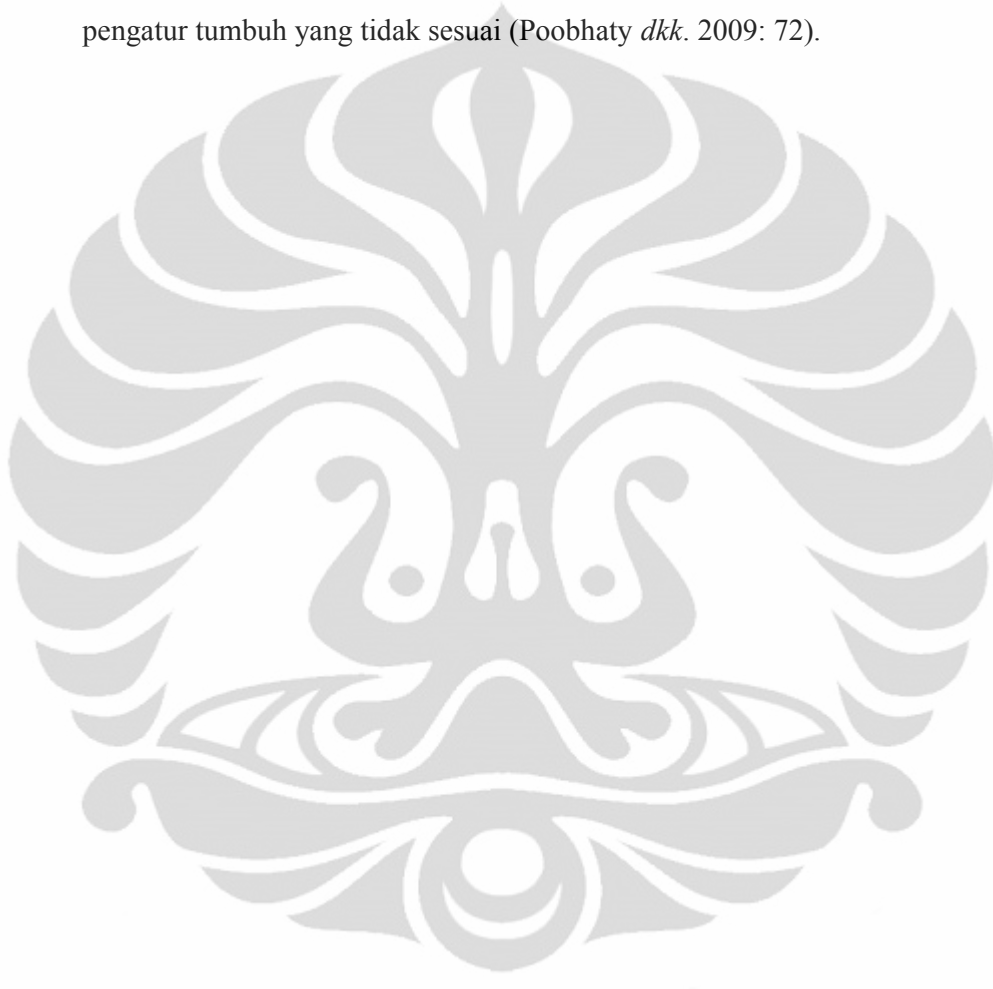
- Arang aktif dapat menyerap cahaya pada permukaan medium sehingga tidak tembus sampai bawah medium. Oleh karena itu, cahaya tidak dapat menstimulasi enzim yang dapat mengoksidasi fenol.
- Arang aktif dapat mencegah pencokelatan dengan mengadsorpsi fenol atau menonaktifkan polifenol oksidase dan peroksidase. Penambahan arang aktif pada anggrek Eropa menstimulasi pertumbuhan walaupun terjadi pencokelatan pada eksplan.
- Arang aktif dapat mengadsorpsi BA, IAA, IBA, NAA dan kinetin baik pada media padat maupun cair. Adsorpsi oleh Arang aktif tergantung pada senyawa lain yang ada pada medium. Senyawa-senyawa yang ada pada medium berkompetisi untuk teradsorpsi oleh arang aktif.
- Zat yang dihasilkan oleh arang aktif dapat meningkatkan pertumbuhan.
- Arang aktif menyebabkan media menjadi lebih asam.

(Pan & Van Staden 1998: 156--160).

Penggunaan arang aktif pada kultur *in vitro* anggrek yang sudah dilakukan, di antaranya pada *Dendrobium nobile*, *Cymbidium forrestii*, dan *Cypripedium flavum*. Konsentrasi arang aktif yang telah digunakan dalam penelitian anggrek adalah 0,001--2 gr/l (Lampiran 4) (Thomas 2008: 618--619). Konsentrasi arang aktif 2 g/l dapat menghilangkan efek fenol pada anggrek *Disa* spp. (Thomas 2008: 626). Selain itu, medium MS yang ditambahkan 2 g/l arang aktif dapat mencegah pencokelatan pada tanaman *Hyophorbe lagenicaulis* (Thomas 2008: 622 & 623). Menurut Nguyen *dkk.* (2007: 158), konsentrasi arang aktif 1--5 g/l dapat mengurangi pencokelatan pada tanaman *Sorghum bicolor*. Penambahan arang aktif 1 g/l yang dikombinasikan dengan 0,1 g/l silver nitrat dapat mengurangi pencokelatan pada kutur *Taxus mairei* (Chang *dkk.* 2001: 497).

Selain pencokelatan, *bleaching* klorofil juga dapat menyebabkan stres pada eksplan. *Bleaching* terjadi karena hilangnya klorofil sehingga proses fotosintesis menjadi terganggu (Salisbury & Ross 1992: 259; Zvezdanovic & Markovic 2007: 272). Klorofil mampu mengadsorpsi UV, khususnya pada

gelombang 350 nm. Penyinaran UV dan cahaya tampak dapat menyebabkan kerusakan klorofil (Zvezdanovic & Markovic 2007: 272). *Bleaching* juga dapat terjadi akibat proses sterilisasi yang terlalu lama atau penggunaan kadar bahan sterilisasi yang terlalu tinggi (Ozel & Arslan 2006: 627). Selain itu, *bleaching* dapat terjadi karena pemaparan cahaya yang terlalu lama atau penambahan zat pengatur tumbuh yang tidak sesuai (Poobhaty *dkk.* 2009: 72).



## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

### **3.1 Lokasi dan Waktu**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UI. Penelitian dilakukan dari bulan Agustus 2010 hingga bulan April 2011.

### **3.2 Alat dan Bahan**

#### **3.2.1 Alat**

Peralatan yang digunakan untuk penelitian adalah timbangan analitik [Shimidzu LIBROR] tipe AEL-200, timbangan digital [Shimidzu LIBROR] tipe EB-6200S, autoklaf [Ogawa Seiki] tipe OSK 6508, oven [LAB-LINE], *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC) Tipe HS-087, rak kultur, kulkas, *hot platemagnetic stirrer* [IKAMAG RCT], batang pengaduk magnetic, pembakar spiritus, Erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur; *beaker glass*, botol selai, botol kultur, pipet tetes, pipet volumetrik, karet penghisap, pH *specialized indicator* (kisaran pH 4.0-7.0) [Merck], cawan petri, botol semprot, gunting, pisau *scalpel*, pinset, spatula, corong, dan kamera digital [Olympus SP-600UZ].

#### **3.2.2 Bahan**

##### **3.2.2.1 Tanaman donor**

Tanaman donor diperoleh dari *nursery* di Lembang yang berupa bibit botolan hasil kultur *in vitro*.

### 3.2.2.2 Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah potongan daun tanaman donor yang berumur 11 bulan. Potongan daun berukuran kurang lebih 4 mm x 3 mm dengan jumlah sampel 5 potong per botol kultur.

### 3.2.2.3 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah alkohol 70%, spiritus, HCl, NaOH,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  [Merck],  $\text{KNO}_3$  [Merck],  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [Merck],  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [Merck],  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [Merck],  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  [Merck],  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [Merck],  $\text{H}_3\text{BO}_3$  [Merck],  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  [Merck],  $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  [Merck], KI [Merck],  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [Merck],  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  [Merck],  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [Merck], agar, gula pasir, kertas pH.

### 3.2.2.4 Bahan habis pakai

Kertas alumunium, kertas pembungkus [Yellow Pages], kertas saring, kertas tisu, kertas label, dan masker.

### 3.2.2.5 Medium

Medium yang digunakan adalah medium dasar Murashige-Skoog (1962) dengan konsentrasi makronutrien dan mikronutrien setengah kali. Media tersebut ditambahkan 20 g/l gula, 10 g/l agar-agar, 1 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, dan arang aktif (1 g/l, 2 g/l, dan 3 g/l).

## 3.3 Cara Kerja

### 3.3.1 Pembuatan larutan stok

Bahan-bahan dasar medium  $\frac{1}{2}$  MS (Murashige & Skoog 1962) dibentuk menjadi larutan stok makro 1, 2, 3, 4, dan 5; mikro 1 dan 2, vitamin, myo-inositol,

dan glisin. Keterangan lebih rinci mengenai pengelompokkan bahan dasar tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.3.1.

*Naphthalene acetic acid* (NAA) dan BAP disediakan dalam bentuk larutan stok dengan konsentrasi 200 ppm atau setara dengan 20 mg/100 ml. *Naphthalene acetic acid* dilarutkan dengan 2--5 ml NaOH 0,1 N dan BAP dilarutkan dengan 2--5 ml HCl 1 M. Selanjutnya, NAA dan BAP ditambahkan akuades hingga volume total menjadi 100 ml dalam labu ukur 100 ml. Masing-masing larutan stok disimpan dalam kulkas.

### 3.3.2 Pembuatan medium

Alat dan bahan yang perlu disiapkan untuk membuat medium kultur 1000 ml, yaitu pipet volumetrik, corong, labu Erlenmeyer 1000 ml, labu ukur 1000 ml, *hot-plate magnetic stirrer*, larutan stok, 20 g gula pasir, dan 10 g agar. Labu Erlenmeyer diisi dengan akuades sebanyak 200 ml. Setelah itu, ditambahkan secara berturut-turut larutan stok makro 1, 2, 3, 4, 5, mikro 1, mikro 2, vitamin, dan asam amino, serta NAA dan BAP. Setiap larutan stok medium  $\frac{1}{2}$  MS dan zat pengatur tumbuh diambil dengan menggunakan pipet volumetrik sesuai dengan Tabel 3.3.1. Selanjutnya, batang pengaduk magnetik dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berada di atas *hot-plate magnetic stirrer* untuk proses pelarutan. Gula pasir sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Setelah gula pasir larut, larutan medium dipindahkan dari labu Erlenmeyer ke labu ukur 1000 ml dengan menggunakan corong untuk diukur volumenya. Akuades ditambahkan ke dalam labu ukur hingga larutan medium mencapai volume 1000 ml. Larutan medium dipindahkan dari labu ukur ke labu Erlenmeyer, lalu dimasukkan kembali batang pengaduk magnetik pada labu Erlenmeyer tersebut. Kemudian, pH larutan medium diukur dengan mencelupkan kertas pH hingga diperoleh pH 5,6--5,8. Jika pH medium kurang dari 5,6 maka ditambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 N, sedangkan jika pH medium lebih dari 5,8 maka ditambahkan beberapa tetes HCl 0,1 N. Setelah diperoleh pH yang sesuai, selanjutnya ditambahkan agar dan arang aktif ke dalam labu Erlenmeyer tersebut. Erlenmeyer ditutup dengan kertas aluminium foil agar tidak terjadi penguapan

pada saat dipanaskan. Setelah mendidih dan homogen, medium kultur kemudian dituang ke dalam botol-botol kultur dengan jumlah kurang lebih 10 ml.

Kemudian, setiap botol kultur ditutup dengan plastik tahan panas dan diikat dengan karet gelang pada leher botol kultur. Botol-botol kultur tersebut selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan tekanan 1,2 atm (76 cmhg) pada suhu 121<sup>0</sup> C selama 20 menit. Setelah botol kultur dikeluarkan dari autoklaf, kemudian diletakkan pada rak kultur. Waktu yang dibutuhkan untuk melihat ada tidaknya kontaminasi pada medium adalah 3 hari. Medium siap untuk dipakai pada proses penanaman jika dalam 3 hari tidak ada kontaminasi.

Tabel 3.3.1 Komposisi bahan dasar dan bahan untuk larutan stok medium Murashige & Skoog (MS) 1962 modifikasi

Nama larutan stok	Komposisi	Konsentrasi (mg/l)	Bilangan pengali	Volume akhir (ml)	Volume dibutuhkan untuk 1 liter medium ½ MS (ml)
Makro 1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	10	100	5
Makro 2	KNO <sub>3</sub>	1900	10	200	10
Makro 3	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	10	200	10
Makro 4	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	10	100	5
Makro 5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	10	100	5
Mikro 1	KI	0,83	100	100	0,5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	100		
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	100		
	ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8,6	100		
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	100		
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	100		
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	100		
Mikro 2	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	25	100	2
	Na <sub>2</sub> -EDTA	37,3	25		
Vitamin	<i>Pyridoxine</i> HCl	0,5	100	100	0,5
	<i>Thiamine</i> HCl	0,1	100		
	<i>Nicotinic acid</i>	0,5	100		
Asam amino	glisin	2	25	100	2
	<i>Myo</i> -inositol	100	25	100	2

### 3.3.3 Sterilisasi alat

Alat-alat yang disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 1,2 atm dan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit adalah cawan petri, labu Erlenmeyer 100 mL, pinset, skalpel, dan botol selai. *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF) disterilkan dengan menyalakan lampu UV minimal 1 jam sebelum digunakan. Bagian dalam LAF disemprot dengan alkohol 70% atau dibersihkan dengan kertas tisu yang telah disemprot alkohol 70%.

### 3.3.4 Penanaman eksplan

Daun yang akan digunakan sebagai eksplan kondisinya steril karena berasal dari bibit yang berada dalam botol saus steril hasil kultur *in vitro*. Pisau skalpel dan pinset dibakar terlebih dahulu dengan pembakar spiritus lalu dicelupkan ke dalam alkohol 70%. Setelah itu, pisau skalpel dan pinset diletakkan di atas botol selai steril untuk didinginkan sebelum digunakan. Setelah dingin, pinset digunakan untuk mengambil planlet pada botol saus lalu diletakkan di cawan petri. Daun selanjutnya dipotong menggunakan pisau skalpel dengan ukuran kira-kira 4 mm x 3 mm. Eksplan daun tersebut kemudian ditanam pada medium kultur dengan posisi abaksial daun menyentuh medium. Setiap botol medium kultur berisi 5 eksplan daun. Label pada botol medium kultur diberi keterangan tanggal penanaman.

### 3.3.5 Pemeliharaan kultur

Rak tempat menyimpan botol kultur dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alkohol sebelum digunakan. Botol-botol kultur yang telah berisi eksplan diletakkan pada rak kultur pada kondisi fotoperiodisitas 24 jam. Lampu TL 20 Watt digunakan untuk pencahayaan. Selanjutnya, botol kultur dipelihara dengan cara disemprot alkohol 70% setiap hari dan disemprot formalin 4% setiap pekan.



### 3.3.6 Pengamatan

#### 3.3.6.1 Parameter kualitatif

Parameter kualitatif yang diamati adalah warna eksplan, yaitu terjadi atau tidak terjadi pencokelatan. Apabila pada tepi eksplan terdapat warna coklat maka eksplan dinyatakan mengalami pencokelatan (diberi tanda (+) pada kolom TC), jika warna eksplan tetap hijau maka dinyatakan hidup (diberi tanda (+) pada kolom H), dan jika eksplan berubah warna menjadi pucat maka dinyatakan *bleaching* (diberi tanda (+) pada kolom B). Pengamatan dilakukan secara makroskopis setiap hari selama 4 pekan. Hasil pengamatan disusun pada tabel pengamatan.

#### 3.3.6.2 Parameter kuantitatif

Parameter kuantitatif yang diamati adalah jumlah eksplan yang mengalami pencokelatan, eksplan yang tetap hijau, dan eksplan yang mengalami *bleaching* perbotol. Data berupa angka pada masing-masing kolom (TC, H dan B). Pengamatan dilakukan secara makroskopis.

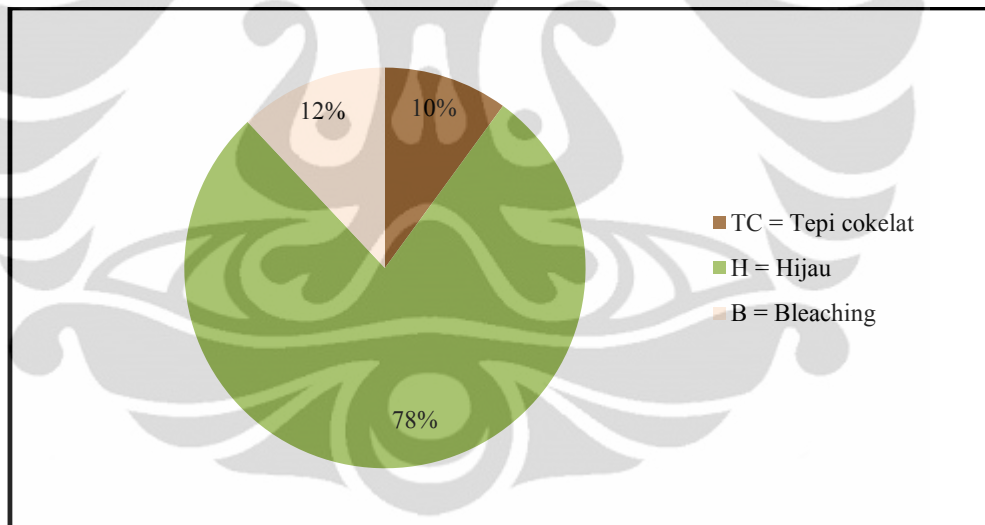
### 3.3.7 Penyusunan dan analisis data

Data dihitung nilai rata-rata dan standar deviasinya, kemudian dianalisis secara deskriptif. Analisis berdasarkan parameter kualitatif dan kuantitatif.

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### Respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

Secara umum, respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium  $\frac{1}{2}$  MS modifikasi adalah sebagian kecil mengalami pencokelatan, sebagian besar tetap hijau, dan sebagian mengalami *bleaching* (Gambar 4(1)). Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Wang (2005), bahwa penambahan arang aktif pada medium dapat mengurangi pencokelatan pada eksplan. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa sebagian kecil eksplan mengalami pencokelatan (10%) dan sebagian besar eksplan hidup (90%) (Thomas 2008: 621).



Gambar 4(1) Diagram pie respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium  $\frac{1}{2}$  MS modifikasi

Data hasil pengamatan pekan keempat selengkapnya ditampilkan pada Tabel 4 dan Gambar 4(2).

Tabel 4 Respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium ½ MS modifikasi.

Perlakuan	Kontrol (Tanpa arang aktif)			Arang aktif								
				P1 (0,1%)			P2 (0,2%)			P3 (0,3%)		
Parameter Sampel	TC	H	B	TC	H	B	TC	H	B	TC	H	B
Botol 1	3	0	2	0	5	0	0	4	1	0	5	0
Botol 2	4	0	1	1	3	1	0	5	0	0	5	0
Botol 3	2	0	3	2	1	2	0	5	0	0	4	1
Botol 4	2	0	3	2	3	0	0	5	0	0	5	0
Botol 5	5	0	0	1	2	2	0	4	1	0	5	0
Botol 6	-	-	-	-	-	-	0	5	0	0	5	0
Botol 7	5	0	0	1	2	2	-	-	-	-	-	-
Botol 8	3	0	2	-	-	-	0	3	2	0	5	0
Botol 9	4	0	1	2	1	2	0	5	0	0	4	1
Botol 10	1	0	4	2	2	1	0	4	1	0	5	0
Jumlah	29	0	16	11	19	10	0	40	5	0	43	2
Rerata	3.2	0	1.8	1.4	2.4	1.3	0	4.4	0.6	0	4.8	0.3
SD	1.4	0	1.4	0.7	1.3	0.9	0	0.7	0.7	0	0.4	0.4

Keterangan:

TC = tepi cokelat

H = hijau

B = *bleaching*

SD = standar deviasi

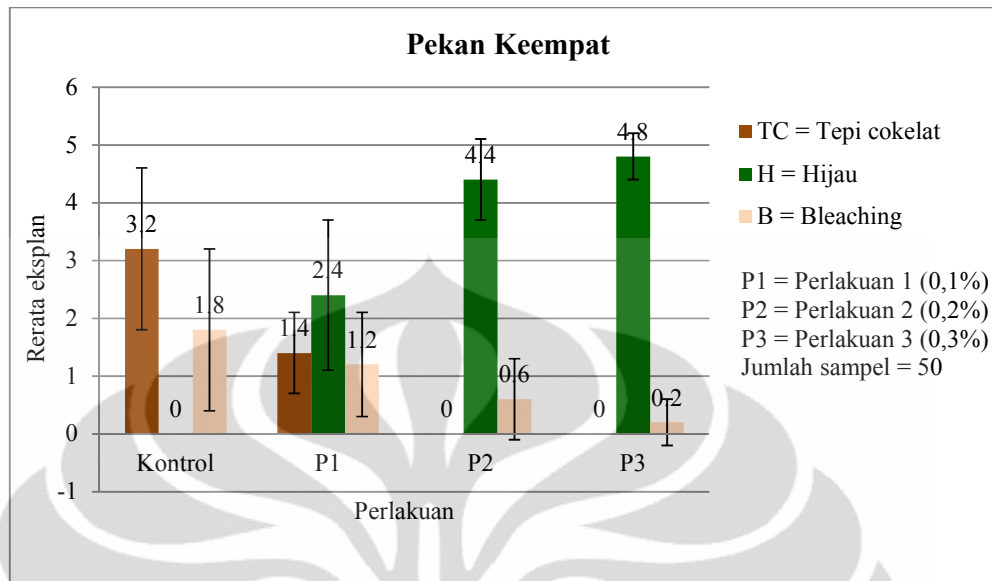
- = kontaminasi

Jumlah eksplan perbotol = 5 potong

Jumlah sampel = 10 botol (kontaminasi 5 botol)

Jumlah total eksplan = 50 potong

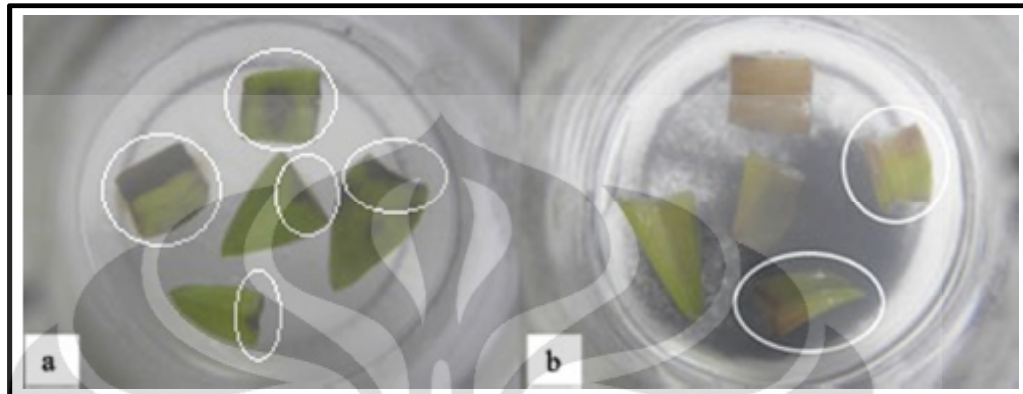
Dicatat pada pekan keempat



Gambar 4(2) Diagram batang rerata respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium  $\frac{1}{2}$  MS modifikasi.

Hasil pengamatan pada pekan keempat menunjukkan bahwa terjadi pencokelatan eksplan pada Kontrol dan P1 (Gambar 4(3)), tetapi tidak terjadi pencokelatan pada P2 dan P3. Eksplan pada medium yang tidak ditambahkan arang aktif (Kontrol) sebagian besar mengalami pencokelatan (64%) dan sisanya mengalami *bleaching* (36%). Hal tersebut sesuai dengan penelitian pada anggrek *Cattleya* (Arditti 2008: 345), *Cymbidium* (Arditti 2008: 379), *Paphiopedilum* (Arditti 2008: 868), *Phalaenopsis* (Arditti 2008: 1028), dan *Renanthera imschootiana* (Arditti 2008: 1056) bahwa medium yang tidak ditambahkan arang aktif atau antioksidan dapat mengalami pencokelatan. Akan tetapi, pada P1 ada beberapa eksplan yang mengalami pencokelatan meskipun medium mengandung arang aktif. Hal tersebut mungkin disebabkan konsentrasi arang aktif 1 g/l belum cukup untuk mengadsorpsi seluruh fenol. Menurut Ozyigit (2008: 1147), jumlah fenol pada daun relatif banyak dibandingkan pada organ lain. Walaupun demikian, pencokelatan lebih banyak terjadi pada Kontrol (64%) dibandingkan pencokelatan pada P1 (28%). Hal tersebut menunjukkan bahwa arang aktif pada P1 dapat mengurangi pencokelatan tetapi belum dapat mencegah pencokelatan. Sementara itu, menurut hasil penelitian Chang *dkk.* (2001: 497), konsentrasi 1 g/l

arang aktif yang dikombinasikan dengan *silver nitrate* dapat mengurangi pencokelatan pada *Taxus mairei*.

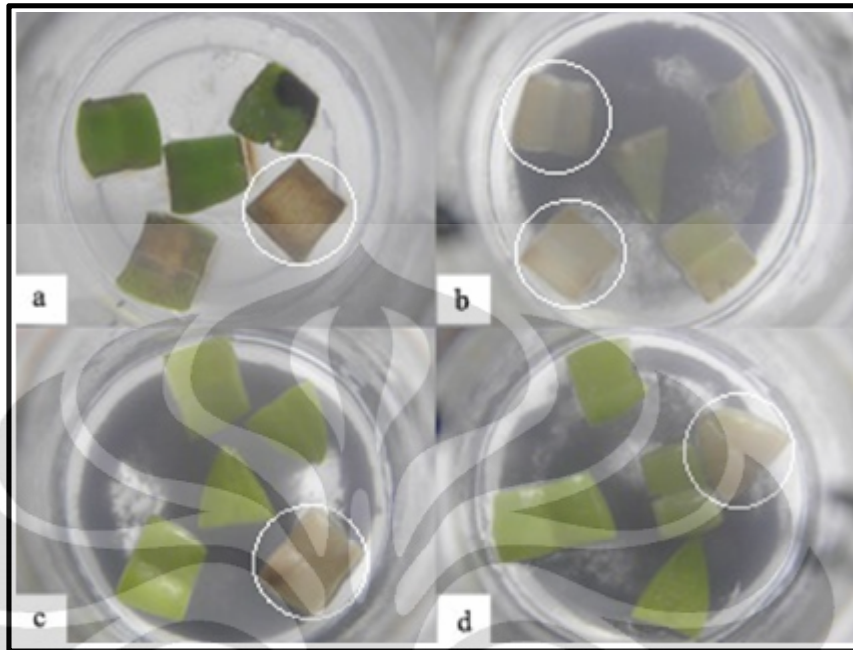


Gambar 4(3) Eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang mengalami pencokelatan pada (a) Kontrol dan (b) Perlakuan 1  
[Dokumentasi pribadi]

Eksplan pada Perlakuan 2 dan Perlakuan 3 tidak mengalami pencokelatan. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi arang aktif 2 g/l dan 3 g/l dapat menghindari pencokelatan eksplan. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Nguyen *dkk.* (2007: 158), bahwa konsentrasi arang aktif 1--5 g/l dapat mengurangi pencokelatan pada tanaman *Sorghum bicolor*. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa penambahan arang aktif 1--5 g/l menghasilkan 80% eksplan yang tetap hidup.

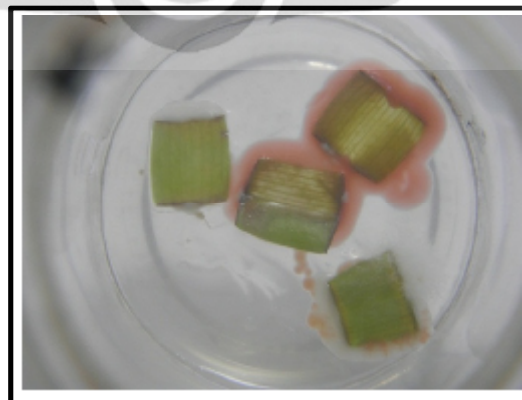
Respons eksplan yang tetap hijau paling banyak terdapat pada P3 (96%), diikuti P2 (88%) dan P1 (48%). Akan tetapi, eksplan yang hijau tidak terdapat pada Kontrol. Hal tersebut menunjukkan bahwa arang aktif dapat meningkatkan kesintasan eksplan (Moraes & Faria 2005: 385).

Respons lainnya adalah terjadi *bleaching* eksplan pada Kontrol (36%), P1 (24%), P2 (12%), dan P3 (4%) (Gambar 4(4)). Eksplan yang mengalami *bleaching* paling banyak terjadi pada Kontrol yaitu 36%. Fenomena *bleaching* kemungkinan disebabkan oleh pemaparan cahaya selama 24 jam (Poobathy *dkk.* 2009: 73).



Gambar 4(4) Eksplan yang mengalami *Bleaching* pada (a) Kontrol, (b) Perlakuan 1, (c) Perlakuan 2, dan (d) Perlakuan 3  
[Dokumentasi pribadi]

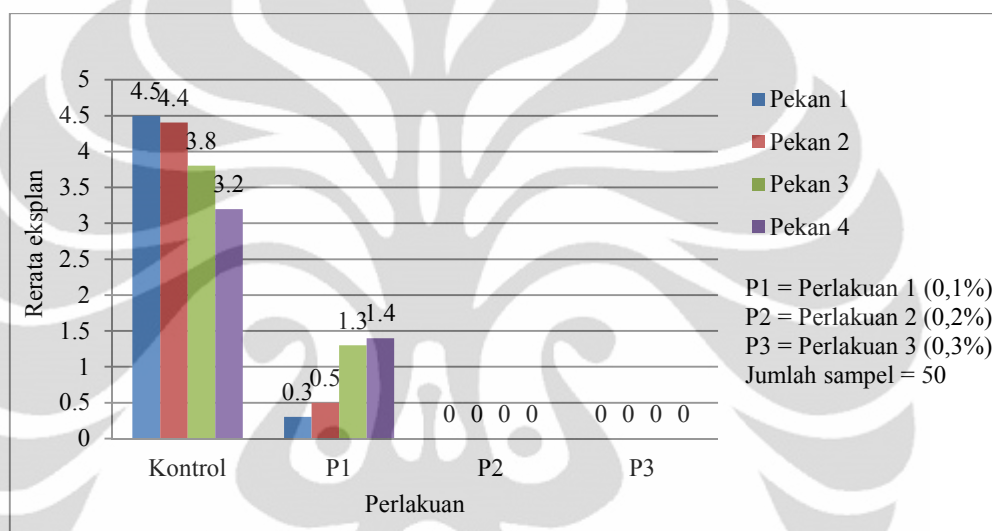
Fenomena lainnya yang terjadi adalah kontaminasi (Gambar 4(5)). Kontaminasi tersebut terjadi pada 1 botol sampel Kontrol, P2, dan P3 serta pada 2 botol sampel P1. Kontaminasi yang terjadi kemungkinan disebabkan oleh terbukanya tutup botol sampel. Kontaminan yang terlihat pada botol sampel diduga berasal dari organisme khamir. Namun, belum diketahui jenis khamir yang menyebabkan kontaminasi tersebut.



Gambar 4(5) Kontaminasi eksplan pada Kontrol  
[Dokumentasi pribadi]

#### 4.1 Eksplan yang Mengalami Pencokelatan pada Kultur Daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

Berdasarkan hasil pengamatan selama empat pekan, terjadi kenaikan rerata eksplan yang cokelat pada P1. Fenomena sebaliknya terjadi pada Kontrol, yaitu terjadi penurunan rerata eksplan yang cokelat. Data selengkapnya ditampilkan pada Gambar 4.1.1.



Gambar 4.1 Diagram batang rerata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang mengalami pencokelatan.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fenomena pencokelatan eksplan pada Kontrol dan P1 terjadi pada pekan pertama. Pencokelatan eksplan pada Kontrol dari pekan pertama sampai pekan keempat mengalami penurunan sebesar 26%. Akan tetapi pencokelatan eksplan pada P1 mengalami kenaikan sebesar 22%. Kenaikan pencokelatan eksplan yang signifikan terjadi pada pekan ketiga (16%). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Ozyigit (2008: 1147), bahwa jumlah fenol pada daun mengalami kenaikan yang signifikan pada pekan ketiga. Sementara itu, hasil pengamatan menunjukkan bahwa sebagian eksplan cokelat (26 %) pada Kontrol mengalami *bleaching* sehingga terjadi penurunan eksplan yang cokelat.

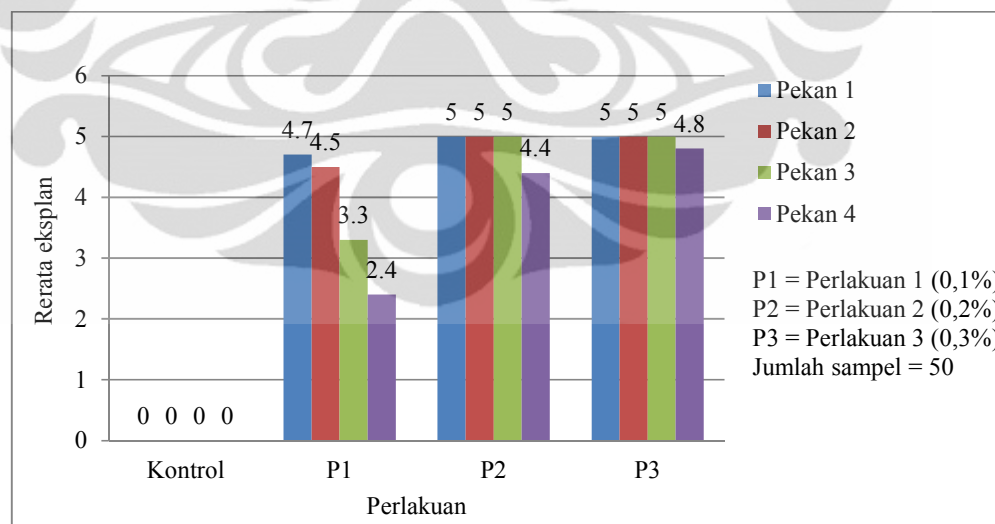
Pencokelatan eksplan tersebut kemungkinan terjadi karena faktor cahaya. Ozyigit (2008: 1147) menyatakan bahwa sintesis senyawa fenol dipengaruhi oleh

faktor genetik dan lingkungan. Sementara itu, Kefeli (2003: 15) menyatakan bahwa cahaya tampak dapat meningkatkan biosintesis senyawa fenol pada kloroplas. Sintesis fenol terjadi pada kloroplas kemudian terakumulasi pada vakuola atau membentuk lignin (Kefeli *dkk.* 2003: 14).

Eksplan yang terpotong menyebabkan kandungan sitoplasma dan vakuola tercampur dan keluar sehingga senyawa fenol dapat teroksidasi oleh udara. Oksidasi senyawa fenol dapat menghambat aktifitas enzim dan menyebabkan pencokelatan medium selanjutnya mengakibatkan kematian pada eksplan. Hasil oksidasi fenol berefek negatif karena membentuk quinon yang bersifat toksik (Ozyigit 2008: 1147).

#### 4.2 Eksplan yang Tetap Hijau Pada Kultur Daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

Berdasarkan hasil pengamatan selama empat pekan, terjadi penurunan rerata eksplan yang tetap hijau pada P1, P2, dan P3. Data selengkapnya ditampilkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Diagram batang rerata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang tetap hijau.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa eksplan yang hijau terdapat pada P1, P2, dan P3. Eksplan yang hijau menunjukkan bahwa eksplan tersebut masih

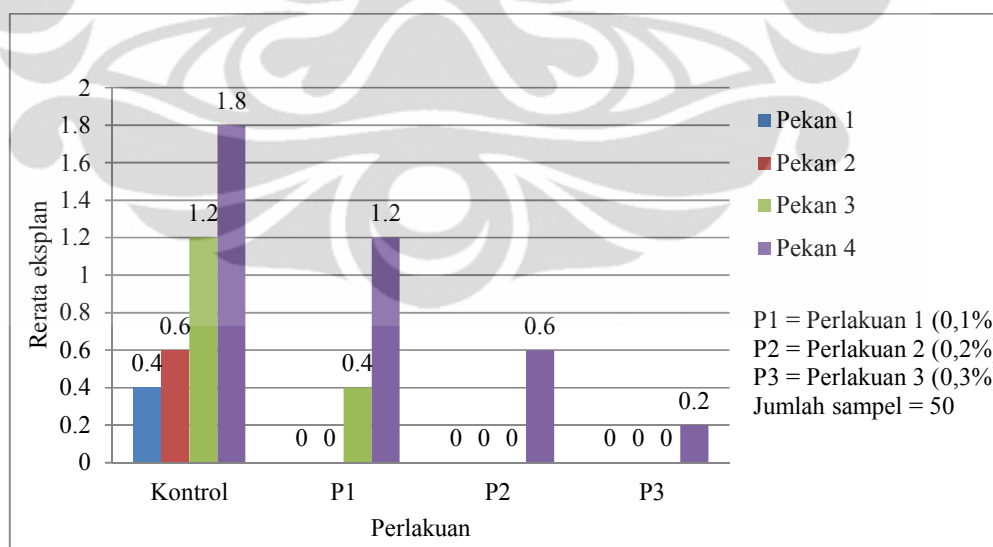


hidup walaupun tidak menunjukkan adanya diferensiasi. Hal tersebut mungkin disebabkan medium ataupun ZPT yang digunakan tidak cocok untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan daun *D. lasianthera*.

Eksplan pada Kontrol tidak ada yang tetap hijau karena sebagian besar (90%) mengalami pencokelatan dan sisanya (10%) mengalami *bleaching*. Jumlah eksplan yang hijau paling banyak terdapat pada P3, diikuti P2 dan P1. Penurunan jumlah eksplan hijau terjadi pada seluruh perlakuan. Eksplan hijau pada P1 menurun karena sebagian besar mengalami pencokelatan dan sisanya mengalami *bleaching*. Akan tetapi, eksplan hijau pada P2 dan P3 menurun karena mengalami *bleaching*.

#### 4.3 Eksplan yang Mengalami *Bleaching* Pada Kultur Daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

Berdasarkan hasil pengamatan selama empat pekan, terjadi kenaikan rerata eksplan yang mengalami *bleaching* pada Kontrol dan P1. Data selengkapnya ditampilkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Diagram batang rerata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang mengalami *bleaching*.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa eksplan mengalami *bleaching* pada pekan pertama (Kontrol), pekan ketiga (P1), dan pekan keempat (P2 dan P3).

Fenomena *bleaching* kemungkinan disebabkan oleh pemaparan cahaya selama 24 jam (Poobathy *dkk.* 2009: 73). Hal tersebut sesuai dengan perlakuan yang diberikan selama penelitian, yaitu fotoperiodisitas 24 jam. Fenomena *bleaching* paling banyak terjadi pada Kontrol, diikuti P1, P2, dan P3. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak arang aktif maka semakin sedikit terjadinya *bleaching*.

Respons eksplan yang mengalami *bleaching* mengalami kenaikan pada Kontrol dan P1. Eksplan *bleaching* pada Kontrol selama empat pekan selalu mengalami kenaikan. Persentase kenaikan eksplan *bleaching* pada Kontrol dari pekan pertama sampai pekan keempat sebesar 28%. Eksplan *bleaching* sebagian berasal dari eksplan yang cokelat kemudian mati. Berdasarkan pengamatan, eksplan yang mengalami *bleaching* terlihat pucat (putih). Hal tersebut menunjukkan bahwa klorofil sudah tidak ada. Menurut Zvezdanovic & Markovic (2007: 272), penyinaran UV dan cahaya tampak dapat menyebabkan kerusakan pada klorofil.

Kendala dalam penelitian adalah terjadi fenomena *bleaching* pada eksplan. Menurut Poobathy *dkk.* (2009: 73), *bleaching* pada eksplan disebabkan pemaparan cahaya yang terlalu lama. Oleh karena itu, seharusnya *bleaching* eksplan dapat diatasi dengan mengurangi fotoperiodisitas saat kultur berlangsung. Walaupun demikian, terjadinya *bleaching* eksplan dapat juga disebabkan oleh sterilisasi yang terlalu lama (Ozel & Arslan 2006: 627). Kendala lainnya adalah keragaman kondisi fisiologis eksplan yang digunakan dalam penelitian. Kondisi fisiologis masing-masing eksplan kemungkinan berbeda sehingga respons yang dihasilkan juga dapat berbeda. Perbedaan respons eksplan pada penelitian ini relatif tinggi. Hal tersebut dibuktikan dengan tingginya nilai standar deviasi. Solusi untuk mengurangi standar deviasi dapat dilakukan dengan cara memperbanyak jumlah sampel. Selain itu, dapat juga memperkecil keragaman kondisi eksplan, yaitu dengan memilih posisi dan ukuran eksplan yang relatif sama, misalnya daun ke-1 saja yang digunakan.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh arang aktif terhadap pencokelatan pada kultur daun *Dendrobium lasianthera* diperoleh kesimpulan, di antaranya:

1. Penambahan arang aktif dengan konsentrasi 1 g/l, 2 g/l, dan 3 g/l dapat mengurangi pencokelatan.
2. Respons eksplan terhadap penambahan arang aktif adalah sebagian kecil mengalami pencokelatan (10%), sebagian besar tetap hijau (78%), dan sebagian kecil mengalami *bleaching* (12%).
3. Konsentrasi arang aktif yang cenderung efektif untuk mengurangi pencokelatan adalah 3 g/l (0,3 %), diikuti 2 g/l (0,2%) dan 1 g/l (0,1%).

#### **5.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pencegahan *bleaching*.
2. Perlu diketahui mengenai jenis dan konsentrasi ZPT yang tepat agar eksplan dapat membentuk kalus atau PLBs.
3. Perlu diteliti jumlah kandungan senyawa fenol pada eksplan daun *Dendrobium lasianthera*.

## DAFTAR ACUAN

- Abdelwahd, R., N. Hakam, M. Labhilili & S.M. Udupa. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7(8): 997--1002.
- Aktar, S., K.M. Nasiruddin & K. Hossain. 2008. Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* orchid. *Journal of Agriculture & Rural Development* 6(1&2): 69--74.
- Alam, M.K. Rashid, M.S. Hossain, M.A. Salam & M.A. Rouf. 2002. *In vitro* seed propagation of *Dendrobium* (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media. *Biotechnology* 1(2--4): 111--115.
- Anjum, S., M. Zia & M.F. Chaudary. 2006. Investigations of different strategies for high frequency regeneration of *Dendrobium malones* 'Victory'. *African Journal of Biotechnology* 5(19): 1783--1743.
- Arditti, J. & R. Ernst. 1993. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & sons, Inc., New York: xiii + 682 hlm.
- Arditti, J. 2008. *Micropropagation of orchids*. 2nd ed. Blackwell publishing, Irvine, California: xxi + 1523 hlm.
- Arnaldos, T.L., R. Munoz, M.A. Ferrer & A.A. Calderon. 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum* 113: 315--322.
- Batygina, T.B., E.A. Bragina & V.E. Vasilyeva. 2003. The reproductive system and germination in orchid. *Acta Biologica Cracoviensa Series Botanica* 45(2): 21--34.
- Chang S.H., C.K. Ho, Z.Z. Chen & J.Y. Tsay. 2001. Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Rep.* 20: 496--502.
- Dressler, R.L. 1990. *The orchids: Natural history and classification*. Havard University Press, London: xxi + 332 hlm.
- Fay, M.E. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation. *Biodiversity and Conservation* 3: 176--183.

- George, E.F. & P.D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Limited, Basingstokes: viii + 709 hlm.
- George, E.F., M.A. Hall & G.J. De Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer, Dordrecht, Netherlands: ix + 501 hlm.
- Gunawan, L.W. 1987. *Teknik kultur jaringan*. Institut Pertanian Bogor. Bogor: v + 252 hlm.
- Hopkins, W.G. 1999. *Introduction to plant physiology*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xv + 512 hlm.
- Jian Ping Luo, Ying Wang, Xue-Qiang Zha & Li Huang. 2008. Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. *Plant cell tissue culture* 93: 333--340.
- Kefeli, V.I., M.V. Kalevitch & B. Borsari. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2: 13--18.
- Kong, Q., S.Y. Yuan & Gy. Vegvari. 2007. Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongilanthum* Rchb.f. *International Journal of Horticultural Science* 13(1): 61--64.
- Kusmianto, J. 2008. Pengaruh Thidiazuron tunggal dan kombinasi thidiazuron dan benzilaminopurin terhadap pembentukan tunas dari potongan daun *Dendrobium antenatum* Lindl. secara *in vitro*. Skripsi S-1. Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok: xi + 48 hlm.
- Loveless, A.R. 1983. *Prinsip-prinsip biologi tumbuhan untuk daerah tropik*. Terj. dari *Principles of plant biology for the tropics*, oleh Kartawinata, K., S. Danimiharja & U. Soetisna. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta: xi + 408 hlm.
- Millar, A. 1999. *Orchids of Papua New Guinea*. Timber Press, Portland: x + 118 hlm.
- Moraes, L. & R.T. Faria. 2005. Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. *Acta Hort* 5: 383--390.

- Nasiruddin, K.M., R. Begum & S. Yasmin. 2003. Protocorm like bodies and planlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus. *Asian Journal of Plant Sciences* **2**(13): 955--957.
- Nguyen T.V., T.T. Thu, M. Claeys & G. Angenon. 2007. Agrobacterium-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved *in vitro* regeneration system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **91**: 155--164.
- O'Byrne, P. 1994. *Lowland orchids of Papua New Guinea*. SNP Publisher pte. Ltd., Singapore: xix + 584 hlm.
- Ozel C.A. & O. Arslan. 2006. Efficient micropropagation of english shrub rose "heritage" under *in vitro* conditions. *International Journal of Agriculture & Biology*: 626--629.
- Ozyigit, I.I. 2008. Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. *African Journal of Biotechnology* **7**(8): 1145-1150.
- Ozyigit, I.I., Kahraman M.V. & O. Ercan. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal Biotechnology* **6**(1): 3-8.
- Pan, M.J. & J. Van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture - A review. *Plant Growth Regulation* **26**: 155--163.
- Paselk, R. 2004. Brief Organic Chemistry. 28 Mei 2011. 11.30. Humboldt State University Department of Chemistry.  
<http://users.humboldt.edu/rpaselk/C328.Su04/C328Notes/C328nLec15.htm>.
- Peng Zhao, Fei Wu, Fo-Sheng Feng & Wan-Jun Wang. 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant* **44**:178--185.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro culture of higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht: v + 344 hlm.

- Poobathy R., H. Nair & S. Subramaniam. 2009. Optimisation of encapsulation-dehydration protocol for the orchid hybrid *Ascocenda* 'Princess Mikasa'. *Advances in Environmental Biology* **3**(1): 69--83.
- Primack, R.B., J. Supriatna, M. Indrawan & P. Kramadibrata. 1998. *Biologi konservasi*. Yayasan obor Indonesia, Jakarta: ii + 345 hlm.
- Puchooa, D. 2004. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium*. *International Journal of Agriculture & Biology* **6**(5): 884--888.
- Salisbury, F.B. & C.W. Ross. 1992. *Plant physiology*. 4th ed. Wadsworth Inc., California: xviii + 682 hlm.
- Shagufta naz, A. Ali & J. Iqbal. 2008. Phenolic content *in vitro* cultures of chick pea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis. *Pakistan Journal Botany* **40**(6): 2525--2539.
- Sharma, U., V.R. Rao, J.S.S. Mohan & A. S. Reddy. 2007. *In vitro* propagation of *Dendrobium microbulbon* A. Rich – A rare ethnomedicinal herb. *Indian Journal of Biotechnology* **6**: 381--384.
- Sunitibala, H. & R. Kishor. 2009. Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments. *Indian Journal of Biotechnology* **8**: 448--452.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* **26**: 618--631.
- Widiastoety, D. & F.A. Bahar. 1995. Pengaruh berbagai sumber dan kadar karbohidrat terhadap pertumbuhan planlet Anggrek *Dendrobium*. *Jurnal Hortikultura* **5**(3): 76--80.
- Zvezdanovic, J. & D. Markovic. 2007. Bleaching of chlorophylls by UV irradiation *in vitro*: the effects on chlorophyll organization in acetone and *n*-hexane. *Journal of the Serbian Chemical Society* **7**(3) 271--282.

## LAMPIRAN

Lampiran 1 Respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium  $\frac{1}{2}$  MS modifikasi pekan pertama

Sampel	Perlakuan											
	Kontrol (Tanpa arang aktif)			Arang aktif								
				P1 (0,1%)			P2 (0,2%)			P3 (0,3%)		
Parameter	TC	H	B	TC	H	B	TC	H	B	TC	H	B
Botol 1	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 2	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 3	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 4	3	0	2	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 5	5	0	0	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Botol 6	2	0	3	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Botol 7	5	0	0	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Botol 8	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 9	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 10	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Jumlah	45	0	5	3	47	0	0	50	0	0	50	0
Rerata	3.2	0	1.8	1.4	2.4	1.3	0	4.4	0.6	0	4.8	0.3
SD	1.4	0	1.4	0.7	1.3	0.9	0	0.7	0.7	0	0.4	0.4

Keterangan:

TC = tepi cokelat

H = hijau

B = *bleaching* (mati)

SD = standar deviasi

- = kontaminasi

Jumlah eksplan perbotol = 5 potong

Jumlah sampel = 10 botol (kontaminasi 5 botol)

Jumlah total eksplan = 50 potong



Lampiran 2 Tabel respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium  $\frac{1}{2}$  MS modifikasi pekan kedua

Sampel	Perlakuan											
	Kontrol (Tanpa arang aktif)			Arang aktif								
				P1 (0,1%)			P2 (0,2%)			P3 (0,3%)		
Parameter	TC	H	B	TC	H	B	TC	H	B	TC	H	B
Botol 1	4	0	1	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 2	5	0	0	1	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 3	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 4	3	0	2	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Botol 5	5	0	0	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Botol 6	-	-	-	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Botol 7	5	0	0	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Botol 8	4	0	1	-	-	-	0	5	0	0	5	0
Botol 9	4	0	1	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 10	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Jumlah	40	0	5	5	41	0	0	50	0	0	50	0
Rerata	4.4	0	0.5	0.5	4.5	0	0	5	0	0	5	0
SD	0.7	0	0.7	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan:

TC = tepi cokelat

H = hijau

B = *bleaching* (mati)

SD = standar deviasi

- = kontaminasi

Jumlah eksplan perbotol = 5 potong

Jumlah sampel = 10 botol (kontaminasi 5 botol)

Jumlah total eksplan = 50 potong

Lampiran 3 Tabel respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm terhadap penambahan berbagai konsentrasi arang aktif pada medium ½ MS modifikasi pekan ketiga

Sampel	Perlakuan											
	Kontrol (Tanpa arang aktif)			Arang aktif								
				P1 (0,1%)			P2 (0,2%)			P3 (0,3%)		
Parameter	TC	H	B	TC	H	B	TC	H	B	TC	H	B
Botol 1	4	0	1	0	5	0	0	5	0	0	5	0
Botol 2	5	0	0	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Botol 3	2	0	3	1	3	1	0	5	0	0	5	0
Botol 4	4	0	1	2	3	0	0	5	0	0	5	0
Botol 5	5	0	0	1	3	1	0	5	0	0	5	0
Botol 6	-	-	-	3	1	1	0	5	0	0	5	0
Botol 7	5	0	0	1	4	0	-	-	-	-	-	-
Botol 8	4	0	1	-	-	-	0	5	0	0	5	0
Botol 9	4	0	1	2	3	0	0	5	0	0	5	0
Botol 10	1	0	4	1	4	0	0	5	0	0	5	0
Jumlah	34	0	11	12	30	3	0	45	0	0	45	0
Rata-rata	3.7	0	1.2	1.3	3.3	0.3	0	5	0	0	5	0
SD	1.4	0	1.4	0.9	1.1	0.5	0	0	0	0	0	0

Keterangan:

TC = tepi cokelat

H = hijau

B = *bleaching* (mati)

SD = standar deviasi

- = kontaminasi

Jumlah eksplan perbotol = 5 potong

Jumlah sampel = 10 botol (kontaminasi 5 botol)

Jumlah total eksplan = 50 potong

Lampiran 4 Tabel Penelitian Anggrek yang Menggunakan Arang aktif

No.	Anggrek	Konsentrasi Arang Aktif (g/l)	Medium	ZPT
1.	<i>Anoectochilus formosanus</i>	0.001	Hyponex	BA & TDZ
2.	<i>Dendrobium</i> sp.	0.003	-	BA
3.	<i>Cymbidium forrestii</i>	0.01	-	BA
4.	<i>Geodorum densiflorum</i>	0.01	-	BA
5.	<i>Haemaria discolor</i>	0.02	½ MS	TDZ & NAA
6.	<i>Dendrobium nobile</i>	0.05	½ MS	BA
7.	<i>Renanthera imschootiana</i>	0.1	Mitra	NAA
8.	<i>Ophrys</i> spp.	0.5	-	CM & jus apel
9.	<i>Cypripedium flavum</i>	0.6	½ Harvais	BA & kinetin
10.	<i>Catasetum fimbriatum</i>	1	VW	-
11.	<i>Rhynchostylis retusa</i>	1	MS	NAA & BA
12.	<i>Laelia flava</i>	1 & 2	MS & ½ MS	
13.	<i>Miltonia flavescens</i>	1 & 2	MS & ½ MS	
14.	<i>Oncidium trulliferum</i>	1 & 2	MS & ½ MS	
15.	<i>Disa</i> spp.	2	MS	-