

UNIVERSITAS INDONESIA

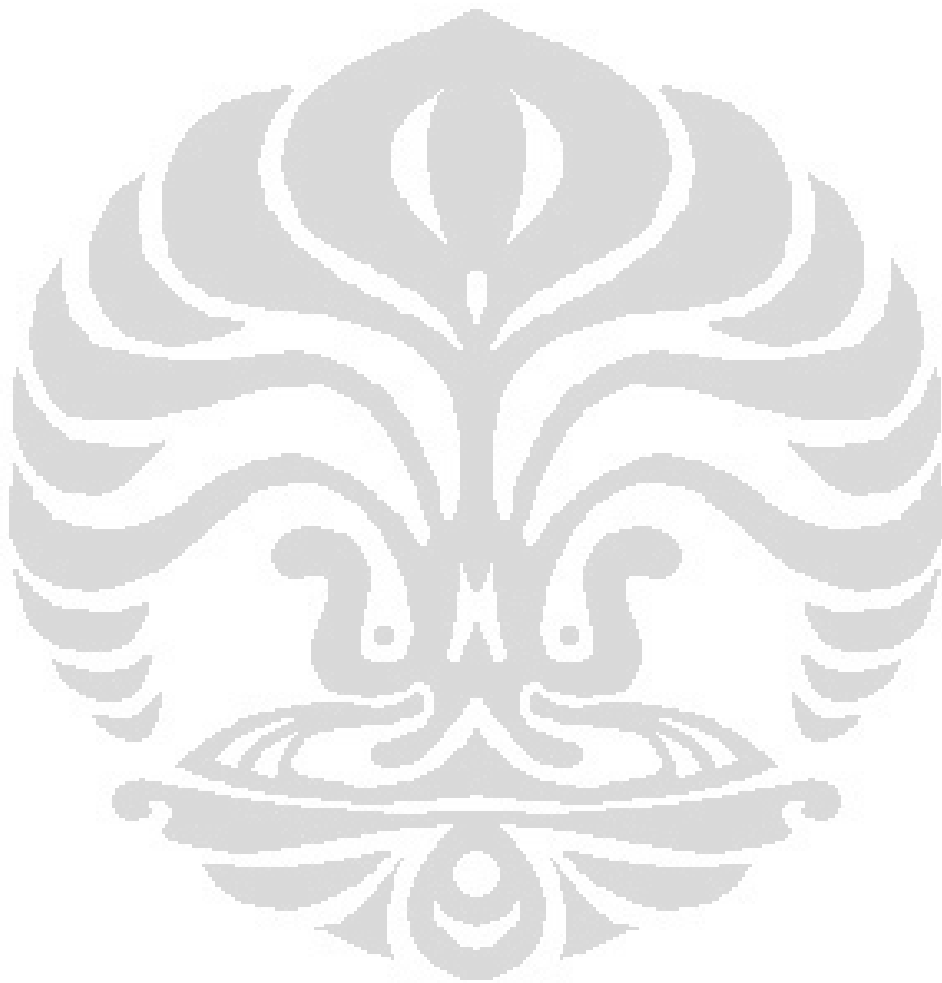
**PENGARUH *PRETREATMENT* TERHADAP
PENCOKELATAN EKSPAN PADA KULTUR *IN VITRO*
DAUN *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm**

SKRIPSI

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

**GALUH INDAH MUTIA SARI
0606069792**

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



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Galuh Indah Mutia Sari
NPM : 0606069792
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Pengaruh *pretreatment* terhadap pencokelatan eksplan pada kultur *in vitro* daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana *Science* 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 (.....)

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

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 13 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah *rabbi'l'alamin*. Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayah yang telah diberikan-Nya sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan. Shalawat dan salam semoga Allah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat.

Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi, sangatlah sulit bagi Saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, Saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Susiani Purbaningsih, DEA. dan Dra. Lestari Rahayu, M.Sc. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan waktu untuk membimbing, mengarahkan, memberi nasihat dan saran kepada penulis dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini;
2. Dr. Nisyawati dan Dr. Andi Salamah selaku dosen penguji atas saran dan kritik yang membangun bagi penulis. Dra. Noverita Dian Takarina, M.Sc. selaku Penasehat Akademik, atas dukungan yang diberikan kepada penulis. Dra. Titi Soedjiarti, SU sebagai ketua sidang atas bantuan yang diberikan. Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku koordinator seminar atas bantuan dan dukungan yang diberikan kepada penulis. Dr.rer.nat. Mufti P. Petala selaku ketua Departemen Biologi, Dra. Nining B.P., MSc. selaku sekretaris Departemen Biologi, dan seluruh dosen Departemen Biologi FMIPA UI yang telah memberikan bantuan dan bekal ilmu yang bermanfaat bagi penulis;
3. Seluruh staf Departemen Biologi FMIPA UI terutama Pak Taryana, Pak Pri, Mbak Asri, Ibu Ida, Ibu Ros, Bu Siti, Pak Taryono, dan Pak Arif yang telah banyak membantu penulis selama penelitian;
4. M. Zein Pahlevie atas dukungan, pengertian, dan doa yang telah diberikan kepada penulis; Lydia Mursida, Jennifer J. Tarore, Selvia Lestari, dan Kresna Mutia atas dukungan dan kebersamaan bagi penulis sejak awal perkuliahan; Mba Windri atas saran-saran dan pengalaman berharga yang telah diberikan kepada penulis; Kak Heikal, Tiara, Bakir, Niar, dan Wahyu atas kerjasama selama penulis melakukan penelitian di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan;

Rika, Henny, Betty, Anggi, Asma, Agriana, Quamila, Maulida, Indah L., Iqbal, Andis, dan semua teman-teman Biologi angkatan 2006 (Felix) yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis; Tri W. dan Putri S. (Bio '07) atas bantuan yang diberikan kepada penulis; Saras, Icha, Nurin, dan semua teman-teman bimbel Alumni Pamulang (BTA) yang telah memberikan dukungan kepada penulis;

5. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

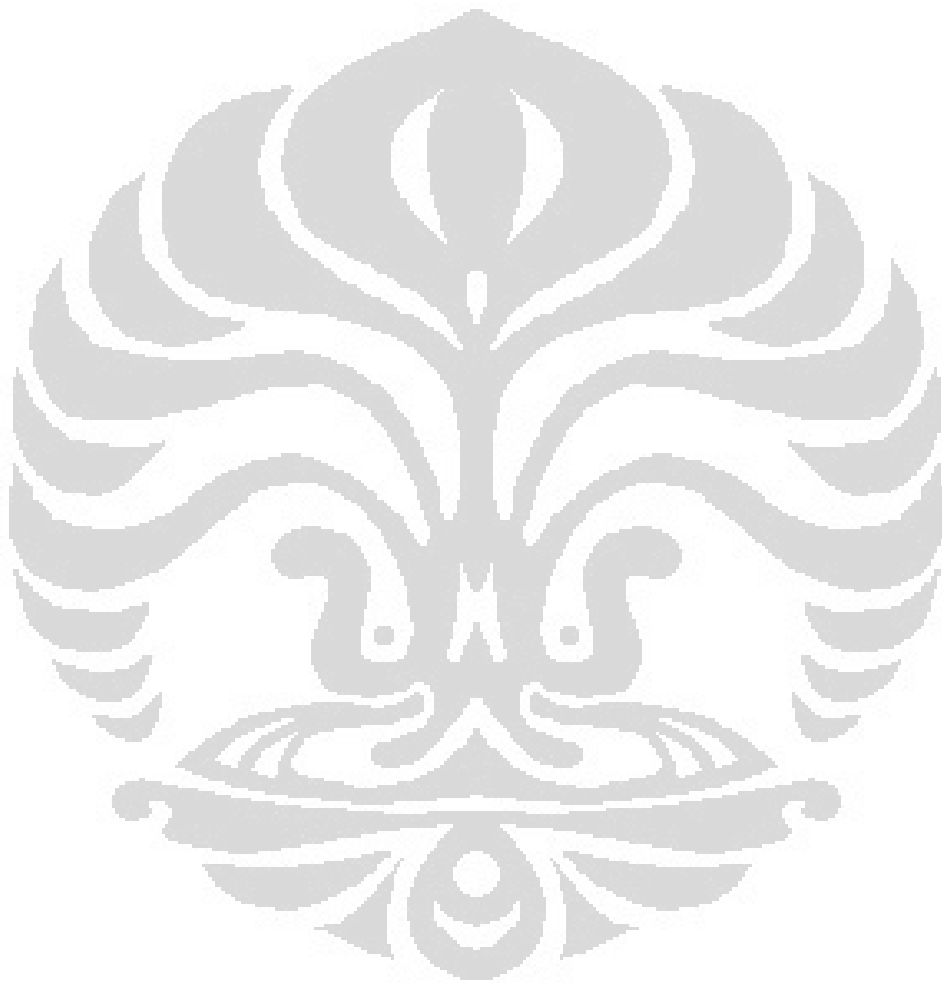
Terimakasih yang sangat mendalam kepada Mama dan Ayah atas kesabaran, kasih sayang, dukungan, dan doa yang selalu mengiringi penulis. Terimakasih juga kepada Dede atas dukungan dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran demi tercapainya hasil yang lebih baik. Tak ada yang penulis harapkan, selain sebuah keinginan agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu biologi pada khususnya.

“I will not say I failed 1000 times, I will say that I discovered there are 1000 ways that can cause failure” (Thomas Edison)

Depok, Juli 2011

Penulis



ABSTRAK

Nama : Galuh Indah Mutia Sari
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Pengaruh *Pretreatment* Terhadap Pencokelatan Eksplan pada Kultur *in vitro* Daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

Dendrobium lasianthera J.J.Sm merupakan anggrek endemik Papua yang terancam punah sehingga perlu dilakukan perbanyakan melalui teknik kultur *in vitro*. Pencokelatan eksplan harus diatasi sebelum melangkah ke perbanyakan tersebut. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh *pretreatment* terhadap pencokelatan eksplan. Eksplan daun berukuran $\pm 8 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ diperoleh dari bibit botol dan sebanyak 15 eksplan ditanam dalam 1 botol kultur berisi medium $\frac{1}{2}$ MS (Murashige dan Skoog 1962) modifikasi + 1 mg l^{-1} NAA + $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BAP. Beberapa *pretreatment* yang diujikan ialah eksplan langsung ditanam setelah dipotong (L) (kontrol), eksplan dipotong di dalam air (DA), dan eksplan direndam selama 10 menit di dalam air setelah dipotong (DR). Pencokelatan eksplan cenderung lebih sedikit terjadi pada *pretreatment* L ($1,23 \pm 1,56$), diikuti pada DA ($2,56 \pm 1,90$), dan DR ($4,20 \pm 2,04$). Namun, eksplan hijau cenderung lebih banyak pada DA ($8,60 \pm 1,58$) dibandingkan pada L ($8,00 \pm 1,73$) dan DR ($4,20 \pm 2,39$). Pemutihan eksplan juga terjadi pada masing-masing *pretreatment*.

Kata kunci : pencokelatan eksplan, *pretreatment*, kultur daun, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm,
xv + 55 halaman : 15 gambar; 5 tabel; 10 lampiran
Bibliografi : 53 (1979-2011)

ABSTRACT

Name : Galuh Indah Mutia Sari
Program Study : Biology S1 Regular
Title : Pretreatment Effects on Explants Browning of Leaves in vitro Culture *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

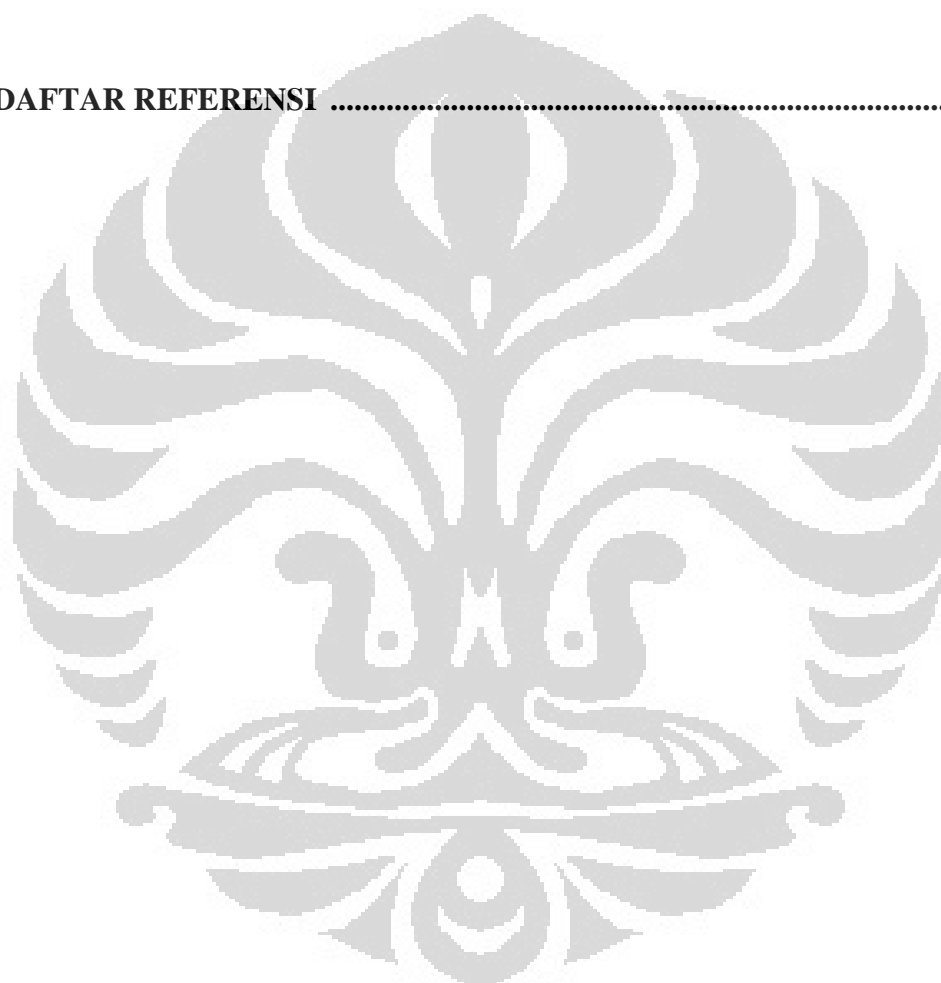
Dendrobium lasianthera J.J.Sm is an endangered orchid native from Papua. Therefore, the in vitro propagation is necessary to do the conservation of it. Browning is a problem that must be solved before doing the in vitro propagation. This study was carried out to observe the effect of pretreatment on explants browning. Leaf explants (8 mm x 5 mm) were excised from sterile seedling, and 15 explants cultured on ½ MS (Murashige and Skoog 1962) modified medium + 1 mg^l⁻¹ NAA + 0,1 mg^l⁻¹ BAP. Pretreatments that examined are, explants are directly planted after excising (L) (control), explants were excised in the water (DA), and explants were soaked for 10 minutes in the water after excising (DR). Pretreatment L could reduce explants browning (1,23 ± 1,56), than DA (2,56 ± 1,90), and DR (4,20 ± 2,04). However, the highest green explants was showed in DA (8,60 ± 1,58) than in L (8,00 ± 1,73) and DR (4,20 ± 2,39). In addition, explants bleaching occurred in each pretreatment.

Keywords : explants browning, pretreatments, leaves culture, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm
xv + 55 pages : 15 pictures; 5 tables; 10 appendix
Bibliography : 53 (1979-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm	5
2.1.1 Klasifikasi dan deskripsi	5
2.1.2 Perkembangbiakan alami	7
2.2 Perbanyak Anggrek <i>Dendrobium</i> Melalui Teknik Kultur <i>In Vitro</i>	8
2.2.1 Pencokelatan eksplan sebagai salah satu masalah dalam teknik kultur <i>in vitro</i>	9
2.2.2 Eksplan	12
2.2.3 Medium.....	12
2.2.4 Zat pengatur tumbuh (ZPT).....	13
2.2.5 Lingkungan.....	14
3. METODE PENELITIAN.....	16
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	16
3.2 Alat	16
3.3 Bahan	16
3.3.1 Tanaman donor.....	16
3.3.2 Eksplan.....	17
3.3.3 Medium	17
3.3.4 Bahan kimia	17
3.3.5 Bahan habis pakai	17
3.4 Cara Kerja.....	18
3.4.1 Pembuatan larutan stok	18
3.4.2 Pembuatan medium.....	18
3.4.3 Sterilisasi alat dan bahan.....	20
3.4.4 Penanaman eksplan	20
3.4.5 Pemeliharaan kultur	21
3.4.6 Pengamatan	21
3.4.6.1 Parameter kualitatif	21

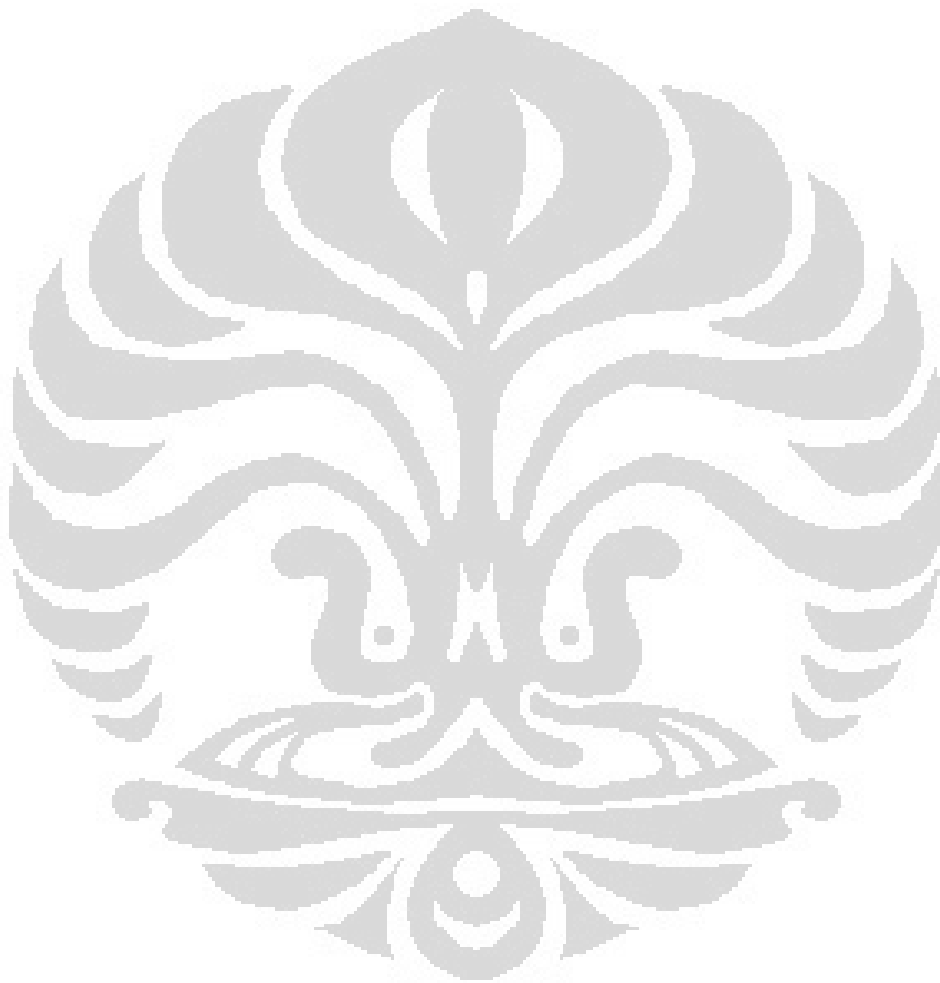
3.4.6.2 Parameter kuantitatif	21
3.4.7 Analisis data	22
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Pencokelatan Eksplan	27
4.2 Pemutihan Eksplan	32
4.3 Eksplan Hijau	35
5. KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
DAFTAR REFERENSI	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1(1).	Tanaman <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm.....	6
Gambar 2.1.1(2).	(a) daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang berbentuk <i>oblongus</i> dan berwarna hijau (b) akar <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang sangat banyak dan bercabang	6
Gambar 2.1.1(3).	Bunga <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm	7
Gambar 2.1.1(4).	Rangkaian bunga <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm dalam 2 skala: (a) skala lebih besar dan (b) skala lebih kecil.....	7
Gambar 2.1.2.	<i>Rhizome Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm	8
Gambar 2.2.1.	Proses oksidasi fenol.....	10
Gambar 4(1).	Respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm terhadap <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR pada pekan ke-4.....	23
Gambar 4(2).	Kontaminasi kultur daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm oleh kapang pada botol <i>pretreatment</i> L di pekan ke-1.....	24
Gambar 4(3).	Nilai rata-rata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang memberikan respons terhadap <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR pada pekan ke-4	25
Gambar 4.1(1).	Nilai rata-rata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang mengalami pencokelatan pada <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR	28
Gambar 4.1(2).	Perubahan nilai rata-rata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang mengalami pencokelatan pada <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR setiap pekan selama 4 pekan.....	31
Gambar 4.2(1).	Nilai rata-rata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang mengalami pemutihan pada <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR.....	33
Gambar 4.2(2).	Perubahan nilai rata-rata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang mengalami pemutihan pada <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR setiap pekan selama 4 pekan.....	35
Gambar 4.3(1).	Nilai rata-rata eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm yang hijau pada <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR.....	36

Gambar 4.3(2). Perubahan nilai rata-rata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang hijau pada *pretreatment* L, DA, dan DR setiap pekan selama 4 pekan37



DAFTAR TABEL

Tabel 3.4.2(1).	Komposisi dan kadar bahan dasar medium Murashige & Skoog (MS) modifikasi serta komposisi dan volume larutan stok.....	19
Tabel 3.4.2(2).	Komposisi dan kadar bahan tambahan pada medium Murashige & Skoog (MS) modifikasi.....	20
Tabel 4.	Rekapitulasi data kuantitatif pekan ke-4 pengaruh <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR terhadap respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm dalam 9 botol <i>pretreatment</i> L dan 10 botol <i>pretreatment</i> DA dan DR, yang ditanami 15 eksplan setiap botol.	26
Tabel 4.1.	Rekapitulasi data waktu terjadi pencokelatan eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR	32
Tabel 4.2.	Rekapitulasi data waktu terjadi pemutihan eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada <i>pretreatment</i> L, DA, dan DR	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data kualitatif respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada pekan ke-1 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR	46
Lampiran 2	Data kualitatif respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada pekan ke-2 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR	47
Lampiran 3	Data kualitatif respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada pekan ke-3 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR	48
Lampiran 4	Data kualitatif respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada pekan ke-4 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR	49
Lampiran 5	Data kuantitatif respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada pekan ke-1 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR	50
Lampiran 6	Data kuantitatif respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada pekan ke-2 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR	51
Lampiran 7	Data kuantitatif respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada pekan ke-3 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR	52
Lampiran 8	Data kuantitatif respons eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada pekan ke-4 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR	53
Lampiran 9	Perbandingan anatomi eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada hari ke-0 dan hari ke-51 setelah penanaman.....	54
Lampiran 10	Perbandingan morfologi eksplan daun <i>Dendrobium lasianthera</i> J.J.Sm pada hari ke-0 dan hari ke-51 setelah penanaman.....	55

BAB 1 PENDAHULUAN

Dendrobium merupakan salah satu genus anggrek yang memiliki anggota dengan bunga yang beragam, baik bentuk (Widiastoety & Bahar 1995: 76), warna (Sheehan & Sheehan 1994: 144; Widiastoety & Bahar 1995: 76; Puchooa 2004: 884), maupun ukurannya (Sheehan & Sheehan 1994: 144). Tanaman anggrek tersebut umumnya berbunga beberapa kali dalam setahun (Puchooa 2004: 884) sehingga banyak dimanfaatkan baik sebagai tanaman hias dalam pot (Hew & Yong 1997: 24; Puchooa 2004: 884; Aktar *dkk.* 2007: 48) maupun bunga potong (Hew & Yong 1997: 24; Aktar *dkk.* 2007: 48). Selain itu, bunga *Dendrobium* tersebut tidak mudah layu dan tidak mudah rusak saat dimanfaatkan sebagai bunga potong (Widiastoety & Bahar 1995: 76; Hew & Yong 1997: 269--270). Selain bunga, batang anggrek ternyata juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan untuk membuat keranjang oleh masyarakat Papua (Bose & Bhattacharjee 1999 lihat Alam *dkk.* 2002: 111; Bose & Bhattacharjee 1999 lihat Aktar *dkk.* 2007: 48).

Salah satu jenis anggrek *Dendrobium* yang memiliki bentuk dan warna bunga yang sangat menarik ialah *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm. (O'Byrne 1994: 244--245). Hal tersebut dikarenakan bunga *D. lasianthera* memiliki bentuk yang sangat khas. Bentuk petal lateral bunga tersebut menyerupai tanduk rusa sehingga disebut *horn* atau *antelope Dendrobium*. Selain bentuk, warna petal lateral tersebut juga khas, yaitu berwarna kecokelatan (Teoh Eng Soon 2005: 111--113). Menurut Prasetya (2007: 28), sifat genetik *D. lasianthera* sangat kuat dan mendominasi turunannya tetapi, belum diketahui sifat yang diturunkan oleh gamet jantan dan betinanya. Walaupun demikian, *D. lasianthera* dapat dimanfaatkan baik sebagai bahan induk jantan maupun induk betina untuk memperoleh anggrek hibrida (Teoh Eng Soon 2005: 113; Prasetya 2007: 28).

Habitat asli *D. lasianthera* terdapat di pulau Papua, yang berada di 2 wilayah negara, yaitu Indonesia dan Papua New Guinea (O'Byrne 1994: 244; Millar 1999: 61; Teoh Eng Soon 2005: 113). Keberadaan anggrek tersebut dimasukkan ke dalam kriteria Appendiks II oleh *Convention on International Trade in Endangered Species Wild Fauna and Flora* (CITES). Hal tersebut

berarti, anggrek *D. lasianthera* terancam punah, sehingga dilarang untuk diambil dari habitatnya dan dilarang keras untuk diperdagangkan. Selain itu, anggrek *D. lasianthera* juga termasuk dalam daftar jenis tumbuhan yang dilindungi oleh Pemerintah Indonesia, yang tercantum dalam Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 7 tahun 1999 tentang Pengawetan Jenis Tumbuhan dan Satwa. Keberadaan anggrek tersebut dianggap terancam karena kerusakan hutan, konversi hutan, dan upaya konservasi di Papua yang terhambat (Richards & Suryadi 2002: 26--27). Oleh sebab itu, konservasi anggrek *D. lasianthera* perlu dilakukan.

Ditinjau dari sisi perbanyakan, anggrek *D. lasianthera* tersebut dapat berkembang biak secara alami melalui perkecambahan biji (generatif) dan melalui pertumbuhan tunas baru (anakan) pada pangkal batang (vegetatif) (O'Byrne 1994: 244). Namun, perkembangbiakan alami tersebut relatif sulit terjadi. Hal tersebut dikarenakan dalam proses perkecambahan biji membutuhkan fungsi untuk memperoleh nutrisi dari substrat (Dressler 1990: 76--77). Selain itu, pertumbuhan anggrek tersebut sering mengalami penurunan, yaitu batang akan mengecil kemudian mati sebelum dapat membentuk anakan vegetatif. Hal tersebut terjadi jika kondisi lingkungan hidupnya tidak sesuai (O'Byrne 1994: 244).

Anggrek *D. lasianthera* juga dapat diperbanyak secara buatan melalui teknik konvensional dengan cara pemisahan rumpun atau anakan. Namun, perbanyakan tersebut dianggap kurang efektif dibandingkan dengan perbanyakan melalui teknik modern, yaitu teknik kultur *in vitro*. Hal tersebut dikarenakan teknik konvensional membutuhkan waktu yang lebih lama (Widiastoety & Bahar 1995: 76, Puchooa 2004: 884; Wen-Hei Chen & Hong-Hwa Chen 2007: 59), biaya yang lebih mahal (Wen-Hei Chen & Hong-Hwa Chen 2007: 59), dan menghasilkan jumlah anakan yang lebih sedikit (Puchooa 2004: 884). Sementara itu, teknik kultur *in vitro* dapat menghasilkan jumlah anakan yang lebih banyak dalam waktu yang lebih singkat (Satsijati 1991: 15; Puchooa 2004: 884) dan relatif seragam (Satsijati 1991: 15; Wen-Hei Chen & Hong-Hwa Chen 2007: 59).

Anggrek *D. lasianthera* telah diperbanyak secara generatif melalui biji dengan teknik kultur *in vitro* oleh beberapa *nurseries*, seperti di Malang dan di Lembang. Namun, hal tersebut tidak atau belum dipublikasikan dalam bentuk

makalah atau jurnal ilmiah. Sementara itu, untuk perbanyak vegetatif *D. lasianthera* melalui teknik kultur *in vitro* belum diketahui keberhasilannya. Oleh sebab itu, belum diketahui masalah maupun faktor yang memengaruhi keberhasilan perbanyakannya melalui teknik kultur *in vitro* secara vegetatif.

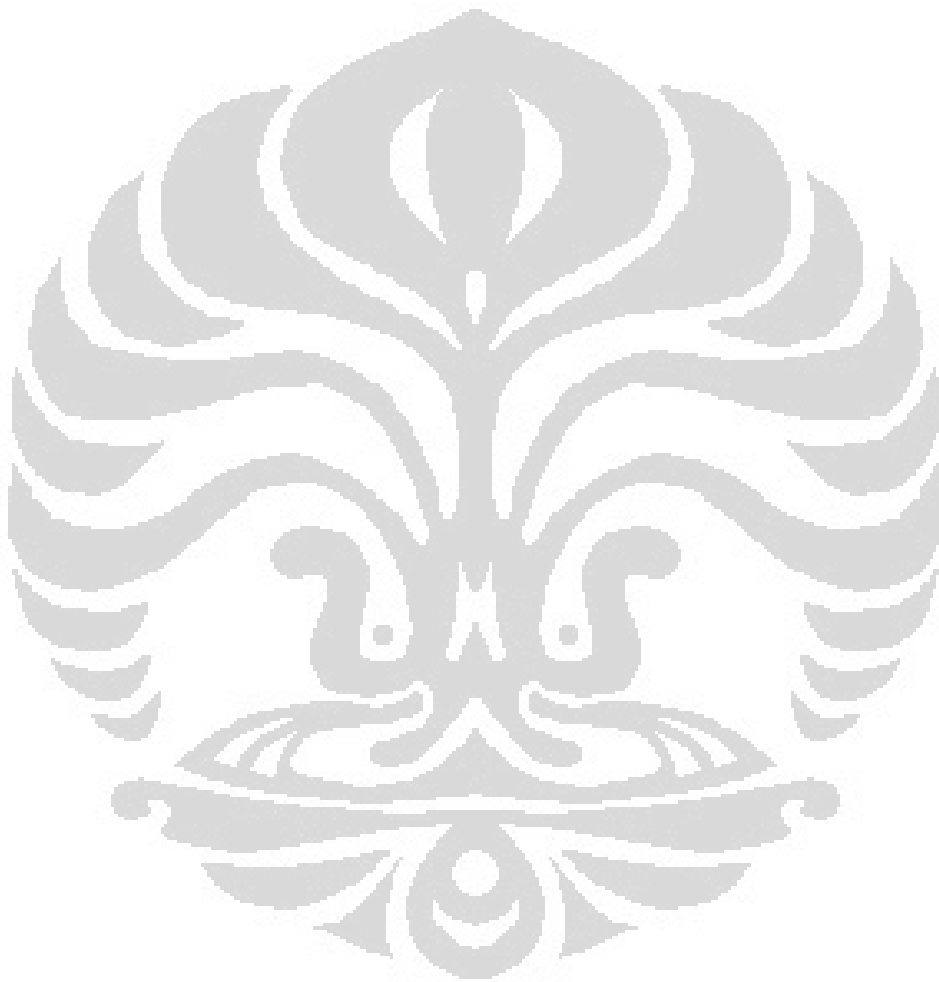
Pencokelatan eksplan merupakan salah satu masalah yang harus diatasi untuk melangkah ke perbanyak angrek secara *in vitro*. Pencokelatan tersebut terjadi pada penelitian Widastoety *dkk.* (1991: 7) yang menggunakan eksplan tunas *Dendrobium*. Menurut Widastoety *dkk.* (1991: 7), pencokelatan eksplan tersebut dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Selain itu, pencokelatan eksplan juga dapat menyebabkan kegagalan pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Pierik 1987: 81). Oleh sebab itu, pencokelatan eksplan harus dikurangi.

Pencokelatan eksplan dapat dikurangi dengan beberapa cara. Salah satunya adalah memberikan *pretreatment* pada eksplan, yaitu dengan merendam eksplan di dalam air dan memotong eksplan di dalam air sebelum ditanam. *Pretreatment* tersebut dilakukan berdasarkan pada sifat senyawa fenol yang dapat larut dalam air (George & Sherrington 1984: 341; Salisbury & Ross 1992: 319) sehingga pencokelatan dapat dicegah. Sementara itu, pemotongan eksplan di dalam air juga mengacu pada teori Bidwell (1979: 128--129), bahwa pencokelatan eksplan dapat dicegah dengan mengurangi kontak sel dari eksplan dengan udara sehingga mencegah oksidasi oleh enzim polifenol oksidase.

Pemberian *pretreatment* telah dilakukan oleh Abdullah *dkk.* (1987: 124) dan Idris *dkk.* (2006: 3--6). Kedua penelitian tersebut menunjukkan bahwa perendaman eksplan di dalam air dapat mengurangi pencokelatan eksplan. Namun, pencokelatan eksplan tersebut dapat dikurangi dengan lama perendaman yang berbeda. Lama perendaman tersebut ialah 1 jam (Abdullah *dkk.* 1987: 124) dan 3 jam (Idris *dkk.* 2006: 3--6). Perbedaan tersebut dapat disebabkan karena menggunakan eksplan yang berbeda, Abdullah *dkk.* (1987: 124) menggunakan pucuk fasikula *Pinus brutia* Ten. (Abdullah *dkk.* 1987: 124) sedangkan Idris *dkk.* (2006: 3--6) menggunakan pucuk dan nodus *Psidium guajava* L.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh *pretreatment* terhadap pencokelatan eksplan daun *D. lasianthera*. *Pretreatment* yang diberikan ialah

eksplan langsung ditanam setelah dipotong (L) (sebagai kontrol), eksplan dipotong di dalam air (DA), dan eksplan direndam selama 10 menit di dalam air setelah dipotong (DR). Hipotesis dari penelitian ini adalah *pretreatment* DA dapat mengurangi pencokelatan eksplan daun *D. lasianthera*.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

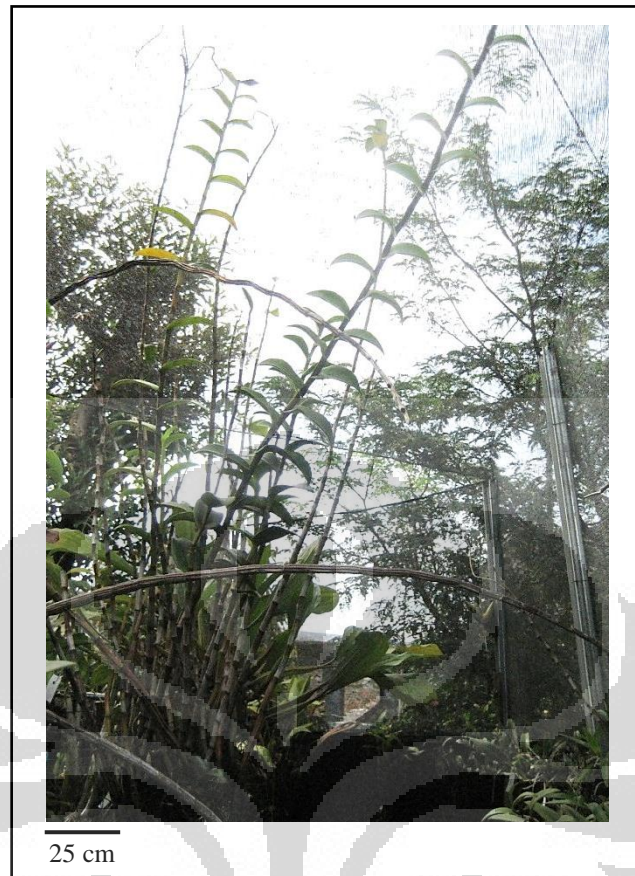
2.1. *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm

2.1.1. Klasifikasi dan deskripsi

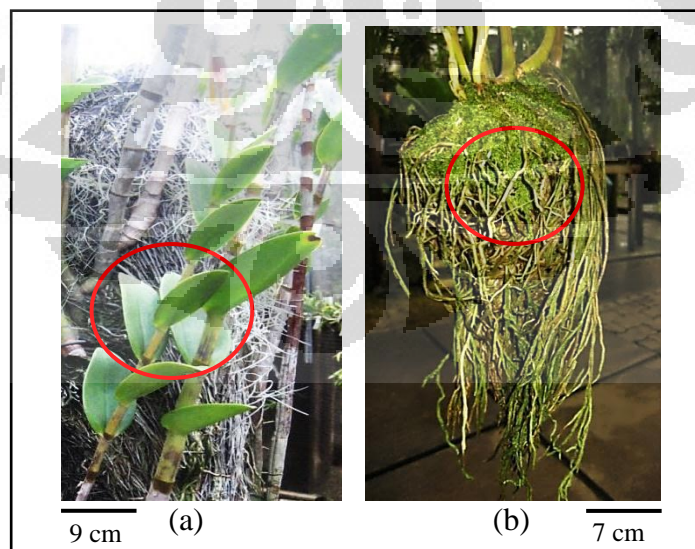
Dendrobium lasianthera J.J.Sm yang dikenal di Indonesia dengan nama anggrek stuberi, termasuk dalam genus *Dendrobium*, subfamilia Epidendroideae, famili Orchidaceae, ordo Liliales, dan clasis Monocotyledoneae (Dressler 1990: 1--6 & 201--231). Anggrek tersebut merupakan salah satu anggrek Indonesia yang tersebar di wilayah Papua (Irian Jaya). Selain di Indonesia, anggrek tersebut juga tersebar di wilayah Papua New Guinea. Anggrek *D. lasianthera* bersifat epifit pada pohon di hutan yang berada dekat dengan sungai, rawa, maupun danau (O'Byrne 1994: 244; Millar 1999: 61--64; Teoh Eng Soon 2005: 113).

Tanaman anggrek *D. lasianthera*, Gambar 2.1.1(1), memiliki batang yang tegak dan dapat tumbuh hingga mencapai tinggi 3 m. Daun *D. lasianthera* berbentuk *oblongus*, berwarna hijau, kaku, dan tebal, Gambar 2.1.1(2)a. Selain itu, anggrek tersebut memiliki akar yang sangat banyak, bercabang, dan berwarna putih, Gambar 2.1.1(2)b. *Rhizome* yang tumbuh menjalar pada pangkal batang tersebut umumnya berukuran 2--6 cm (O'Byrne 1994: 244).

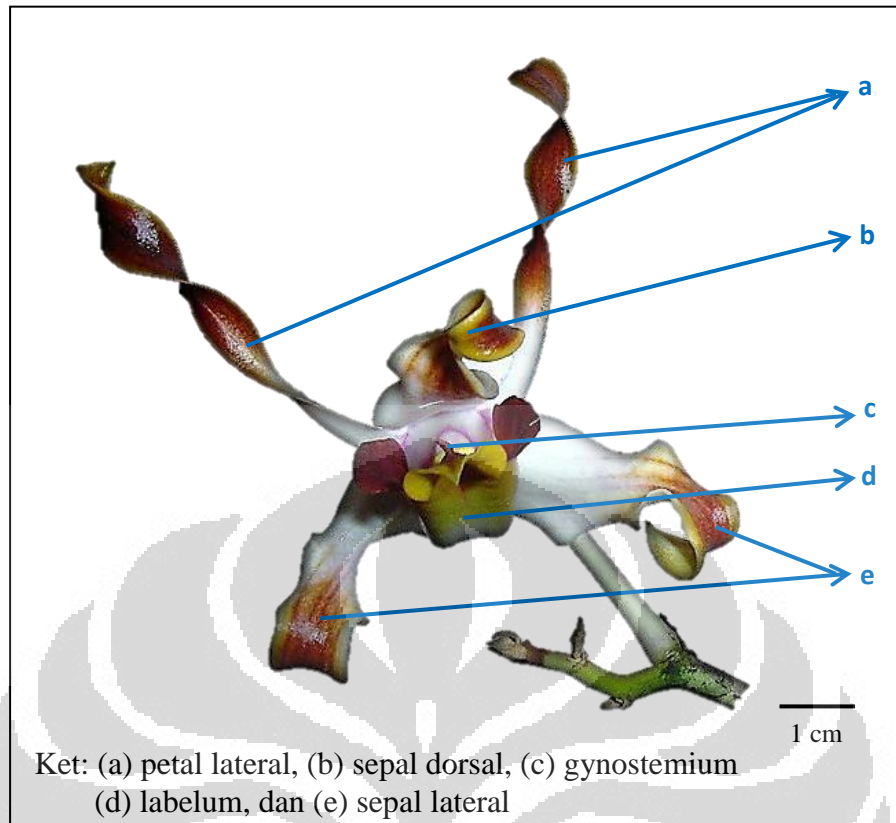
Selain itu, anggrek *D. lasianthera* memiliki bunga yang menarik, Gambar 2.1.1(3) (O'Byrne 1994: 244). Labelum bunga tersebut lebih lebar dibandingkan dengan bagian bunga lainnya. Sementara itu, petal lateral berpilin (3--5 pilinan) dan sempit memanjang ke atas seperti bentuk tanduk rusa. Sepal bunga juga berpilin tetapi pilinan tersebut tidak sebanyak pada petal lateral, yaitu 1--2 pilinan. Warna umum bunga tersebut ialah coklat dengan labelum bergaris ungu (Teoh Eng Soon 2005: 111--113). Rangkaian bunga, Gambar 2.1.1(4), tersusun atas 10--30 bunga setiap rangkaian yang terdapat pada bagian ujung atau nodus batang. Bunga tersebut membentuk buah berwarna hijau berukuran sekitar 40 mm x 16 mm (O'Byrne 1994: 244--245).



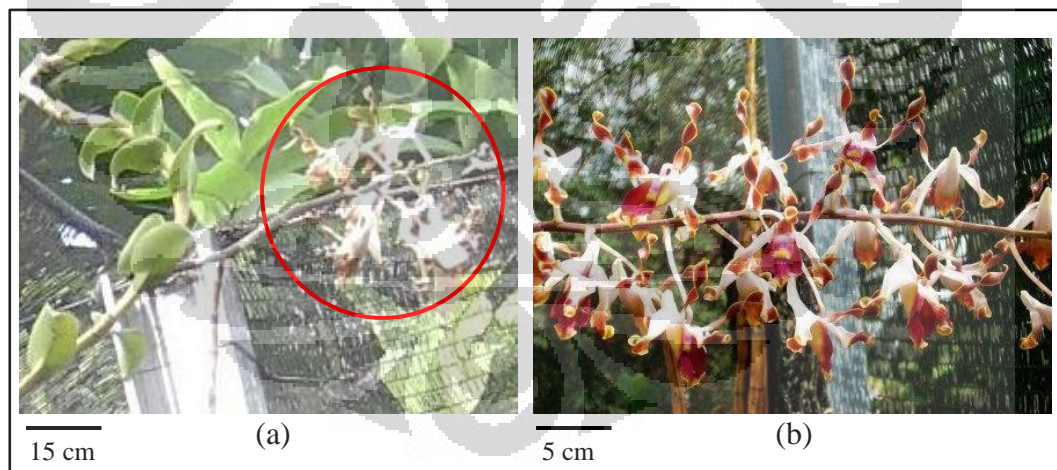
Gambar 2.1.1(1). Tanaman *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 2.1.1(2). (a) daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang berbentuk *oblongus* dan berwarna hijau
(b) akar *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang sangat banyak dan bercabang
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 2.1.1(3). Bunga *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 2.1.1(4) Rangkaian bunga *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm dalam 2 skala:
(a) skala lebih besar dan (b) skala lebih kecil
[Sumber: (a) Dokumentasi pribadi; (b) Koleksi Brilliantoro.]

2.1.2 Perkembangbiakan alami

Anggrek *D. lasianthera* dapat berkembang biak secara generatif melalui biji. Perkecambahan biji secara alami membutuhkan fungi untuk memperoleh

nutrisi dari substrat. Pertumbuhan dan perkembangan biji yang berkecambah tanpa mikoriza sulit berlanjut (Dressler 1990: 76--77). Hal tersebut dikarenakan biji angrek tidak memiliki cadangan nutrisi untuk perkecambahan (Pierik 1987: 149--151; Dressler 1990: 76--78).

Selain cara generatif, *D. lasianthera* juga dapat berkembang biak secara vegetatif melalui pertumbuhan tunas baru (anakan) pada pangkal batang (Dressler 1990: 22--24). Hal tersebut ditunjukkan dengan pembentukan *rhizome* pada pangkal batang (Gambar 2.1.2). Perkembangbiakan angrek tersebut memerlukan cahaya matahari penuh dan suhu yang hangat (O'Byrne 1994: 244).



Gambar 2.1.2. *Rhizome Dendrobium lasianthera* J.J.Sm
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

2.2. PERBANYAKAN ANGGREK *Dendrobium* MELALUI TEKNIK KULTUR *IN VITRO*

Beberapa jenis angrek *Dendrobium* telah berhasil diperbanyak melalui teknik kultur *in vitro*, baik secara vegetatif maupun generatif. Jenis angrek *Dendrobium* yang diperbanyak secara vegetatif antara lain *D. crumenatum* (Arditti & Ernst 1993: 347--352), *D. phalaenopsis* (Arditti & Ernst 1993: 315--322 & 331--339), *D. antennatum* (Arditti & Ernst 1993: 331--339; Kusmianto 2008: 1--72), *D. transparens* (Sunitibala & Kishar 2009: 448--452), dan *D. densiflorum* (Jian-Ping Luo *dkk.* 2008: 333--340). Sementara itu, jenis angrek *Dendrobium* yang diperbanyak secara generatif antara lain *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).

Beberapa respons awal eksplan yang menunjukkan keberhasilan tersebut ialah protokorm jika berasal perbanyak generatif (biji) (Alam *dkk.* 2002: 113; Kong *dkk.* 2007: 62--63), *Protocorm Like Bodies* (PLBs) jika berasal dari perbanyak vegetatif (selain biji) (Arditti & Ernst 1993: 352; Puchooa 2004: 885--887; Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2005: 767--768; Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2007: 347--349; Jian-Ping Luo *dkk.* 2008: 335--339; Kusmianto 2008: 25--39), tunas (Nguyen Thi Hong Nhat & Tran Thi Dung 2006: 154--155; Kusmianto 2008: 25--39), dan kalus (Arditti & Ernst 1993: 347--352). Selain itu, eksplan *Dendrobium* juga dapat membentuk plantlet secara langsung (Arditti & Ernst 1993: 352).

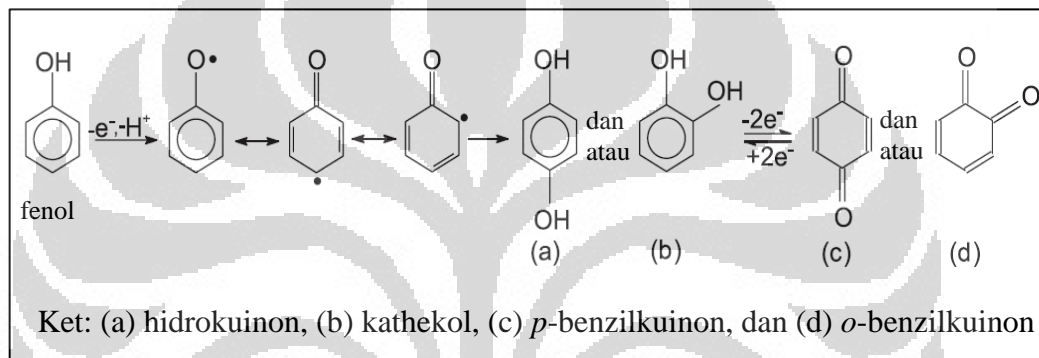
Protocorm Like Bodies (PLBs) merupakan struktur seperti protokorm yang terbentuk dari perbanyak vegetatif (Pierik 1987: 159--160). Protokorm ialah kumpulan sel yang terbentuk dari pertumbuhan embrio setelah biji berkecambah (Dressler 1990: 73). Apabila PLBs sudah terbentuk, biasanya PLBs tersebut dipotong menjadi beberapa bagian untuk diperbanyak kembali. Setelah itu, PLBs mampu berkembang menjadi plantlet melalui organogenesis maupun somatik embriogenesis (Teo 1976--1978 lihat Pierik 1987: 159--160). Sama halnya dengan PLBs, kalus juga mampu berkembang menjadi plantlet. Kalus tersebut merupakan hasil dediferensiasi sel tumbuhan (Suryowinoto 1995: 43). Selain itu, kultur juga dapat mengalami kegagalan, yaitu eksplan tidak berkembang dan mati (Widastoety *dkk.* 1991: 7--9; Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2005: 768). Variasi respons pada eksplan tersebut sangat dipengaruhi oleh eksplan dan medium yang digunakan, serta lingkungan pemeliharaan (George *dkk.* 2008: 2--6).

2.2.1. Pencokelatan eksplan sebagai salah satu masalah dalam teknik kultur *in vitro*

Pencokelatan eksplan menjadi masalah dalam teknik kultur *in vitro* karena dapat menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan menjadi terhambat. Hal tersebut terjadi pada eksplan tunas *Dendrobium* yang ditumbuhkan pada medium Vacint dan Went (VW) modifikasi (Widastoety *dkk.* 1991: 7). Selain itu,

menurut Pierik (1987: 81) dan George & Sherrington (1984: 334), pencokelatan dapat menyebabkan kematian eksplan.

Pencokelatan eksplan tersebut terjadi akibat oksidasi senyawa fenol oleh enzim polifenol oksidase pada jaringan yang luka (George & Sherrington 1984: 335; Pierik 1987: 81; Widastoety *dkk.* 1991: 7). Senyawa fenol yang memiliki gugus benzen aromatik tersebut (Bidwell 1979: 23; Salisbury & Ross 1992: 318--319) akan diubah menjadi senyawa kuinon yang berwarna coklat (Bidwell 1979: 128--129; Bin Zhou 2010: 114) dan bersifat toksik (Bidwell 1979: 128) (Gambar 2.2.1).



Gambar 2.2.1. Proses oksidasi fenol
[Sumber: Andrade *dkk.* 2006: 370 “diterjemahkan sesuai aslinya”]

Menurut George *dkk.* (2008: 410), pencokelatan eksplan lebih sering terjadi pada eksplan yang sudah tua dibandingkan dengan eksplan yang masih muda. Hal tersebut dikarenakan eksplan tua lebih banyak mengandung senyawa fenol. Namun, pencokelatan eksplan tersebut dapat dikurangi dengan beberapa cara.

Menurut Bidwell (1979: 128--129), pencokelatan eksplan dapat dikurangi dengan meminimalisir kontak sel eksplan dengan udara. Hal tersebut bertujuan untuk mencegah terjadi oksidasi oleh enzim polifenol oksidase. Selain itu, cara lain untuk mencegah pencokelatan eksplan ialah dengan merendam eksplan di dalam air (George & Sherrington 1984: 341). Perendaman eksplan tersebut dapat mengurangi senyawa fenol pada eksplan, karena fenol menjadi larut di dalam air (George & Sherrington 1984: 341; Salisbury dan Ross 1992: 319).

Cara lain yang dapat dilakukan untuk mengurangi pencokelatan eksplan ialah dengan menambahkan arang aktif pada medium (George & Sherrington

1984: 336--337; Chattopadyay 2001: 2064; Widiastoety & Marwoto 2004: 1--3; Ko *dkk.* 2009: 137--140). Arang aktif tersebut berfungsi untuk menyerap senyawa toksik seperti kuinon (Chattopadyay 2001: 2064) dan fenol (Widiastoety & Marwoto 2004: 1--4; George *dkk.* 2008: 259; Ko *dkk.* 2009: 140). Namun, arang aktif juga dapat menyerap auksin dan sitokinin (Widiastoety & Marwoto 2004: 3).

Selain penambahan arang aktif, pencokelatan eksplan juga dapat dikurangi dengan menambahkan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) pada medium (George & Sherrington 1984: 337; Chattopadyay 2001: 2064--2065). Menurut Kiong *dkk.* (2008: 4283), PVP merupakan zat tak terlarut yang biasa digunakan untuk mengurangi senyawa fenol. Hal tersebut disebabkan oleh ikatan hidrogen yang terdapat pada PVP dapat menyerap fenol (Layer 2003 lihat Kiong *dkk.* 2008: 4283).

Asam askorbat juga dapat ditambahkan ke dalam medium untuk mengurangi pencokelatan eksplan. Menurut Ko *dkk.* (2009: 140), asam askorbat tersebut diserap oleh eksplan sehingga mencegah oksidasi senyawa fenolik yang menyebabkan pencokelatan pada eksplan. Selain mencegah pencokelatan, asam askorbat juga menghentikan bertambahnya pencokelatan pada eksplan yang sebelumnya telah mengalami pencokelatan.

Pencokelatan eksplan juga dapat dikurangi dengan mengurangi kadar gula pada medium (Yildiz *dkk.* 2007: 5; Poobhaty *dkk.* 2009: 72). Hal tersebut terjadi pada eksplan daun *Beta vulgaris* L., yang menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar gula, maka semakin banyak terjadi pencokelatan. (Yildiz *dkk.* 2007: 5--7). Menurut Bryant *dkk.* (1983 lihat Yildiz *dkk.* 2007: 8), hal tersebut disebabkan oleh ketersediaan gula yang merupakan penyebab utama terbentuk metabolit sekunder.

Menurut Ishii *dkk.* (1979 lihat Arditti & Ernst 1993: 241), pencokelatan eksplan juga dapat dicegah dengan menurunkan derajat keasaman (pH) medium. Penurunan pH tersebut bertujuan untuk mencegah ionisasi gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa fenol. Oleh sebab itu, untuk mengurangi pencokelatan eksplan, pH medium biasanya diatur sekitar 5,5 (Salisbury & Ross 1992: 318--319).

Beberapa cara lain untuk mengurangi pencokelatan eksplan ialah dengan mengurangi kadar ZPT, dan mengurangi kadar nutrisi pada medium (Ledo *dkk.* 2002: 602; Mok & Norzulaani 2006: 33--38). Selain itu, mengurangi paparan cahaya pada saat pemeliharaan kultur (Ledo *dkk.* 2002: 601; Poobhaty *dkk.* 2009: 72). Selain itu, subkultur teratur juga dapat mengurangi pencokelatan eksplan karena akumulasi fenol dan kuinon dapat dicegah (Mok & Norzulaani 2006: 37).

2.2.2. Eksplan

Pemilihan eksplan merupakan hal penting yang perlu diperhatikan dalam perbanyakan anggrek *Dendrobium* melalui kultur *in vitro*. Pemilihan eksplan tersebut disesuaikan dengan macam kultur yang akan digunakan, tujuan kultur, dan jenis tumbuhan. Selain itu, eksplan harus bebas kontaminan dan bebas penyakit (George & Sherrington 1984: 3). Umur eksplan juga perlu diperhatikan. Menurut Hopkins (1999: 150), sel eksplan yang masih muda lebih meristematis dibandingkan pada eksplan tua, sehingga lebih mudah memberikan respons.

Contoh eksplan yang digunakan untuk perbanyakan anggrek *Dendrobium* ialah biji (Alam *dkk.* 2002: 112; Kong *dkk.* 2007: 61). Selain biji, eksplan lainnya ialah tunas apikal dan aksilar (Widiastoety *dkk.* 1991: 6), nodus batang (Jian-Ping Luo *dkk.* 2008: 334--335), dan *pseudobulb* (Sunitibala & Kishor 2009: 450). Sementara itu, eksplan *Dendrobium* yang paling umum digunakan ialah daun (Arditti & Ernst 1993: 347; Puchooa 2004: 884; Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2005: 765; Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2007: 346; Kusmianto 2008: 19).

Eksplan daun biasanya diperoleh dari bibit hasil perkecambahan biji. Oleh sebab itu, proses sterilisasi eksplan sebelum penanaman tidak diperlukan. Hal tersebut telah dilakukan oleh Arditti dan Ernst (1993: 347), Puchooa (2004: 884), Hsiao-Hang Chung *dkk.* (2005: 765; 2007: 346), dan Kusmianto (2008: 19).

2.2.3. Medium

Salah satu aspek penting dalam perbanyakan anggrek *Dendrobium* melalui kultur *in vitro* ialah medium. Medium kultur tersebut harus mengandung bahan

yang dibutuhkan eksplan untuk dapat tumbuh dan berkembang. Bahan-bahan tersebut antara lain, garam anorganik (makronutrien dan mikronutrien), sumber karbon (gula), vitamin, asam amino, dan zat pengatur tumbuh (ZPT) (George & Sherrington 1984: 184--185; Wetter & Constabel 1991: 2--9; Gamborg & Phillips 1995: 21). Selain bahan yang dikandung, derajat keasaman (pH) medium juga perlu diperhatikan. Pertumbuhan eksplan dapat terhambat jika pH medium di bawah 4,8 atau di atas 6,0 (Arditti & Ernst 1993: 59--62).

Beberapa contoh medium dasar yang digunakan untuk perbanyakan eksplan anggrek *Dendrobium* ialah medium Vacint dan Went (VW) serta medium Murashige dan Skoog 1962 (MS) (Widiastoety *dkk.* 1991: 6; Arditti & Ernst 1993: 348--351; Puchooa 2004: 884--888; Kusmianto 2008: 19). Menurut Suryowinoto (1996: 67), medium VW umum digunakan untuk perkecambahan biji anggrek. Sementara itu, medium MS digunakan untuk regenerasi tumbuhan secara umum (Gamborg & Phillips 1995: 21). Medium MS tersebut dapat dibuat dengan beberapa modifikasi.

Modifikasi pembuatan medium MS beberapa modifikasi kadar atau jumlah bahan dasar yang digunakan sesuai dengan tujuan kultur (Wetter & Constabel 1991: 2--9). Kadar makronutrien dan mikronutrien medium tersebut dapat dimodifikasi menjadi setengah kali ($\frac{1}{2}$ MS) atau seperempat ($\frac{1}{4}$ MS) kadar resep (Kong *dkk.* 2007: 61). Medium $\frac{1}{2}$ MS merupakan yang umum digunakan untuk induksi PLBs pada anggrek *Dendrobium* (Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2005: 765--769; Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2007: 346--350; Kusmianto 2008: 20--35; Sunitibala & Kishor 2009: 448--452).

2.2.4. Zat pengatur tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh merupakan hormon sintetik yang dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Pierik 1987: 67; Arditti & Ernst 1993: 37--39). Macam ZPT yang umum ditambahkan ke medium untuk perbanyakan anggrek *Dendrobium* ialah auksin dan sitokinin. Zat pengatur tumbuh tersebut ditambahkan ke medium dengan kadar yang berbeda-beda sesuai dengan macam eksplan dan jenis *Dendrobium* yang digunakan (Widiastoety *dkk.* 1991: 7--9;

Arditti & Ernst 1993: 348--351; Puchooa 2004: 885; Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2005: 765--766; Hsiao-Hang Chung *dkk.* 2007: 346--347; Jian-Ping Luo *dkk.* 2008: 334--335; Kusmianto 2008: 20; Sunitibala & Kishor 2009: 448--450).

Auksin merupakan hormon tumbuhan yang secara umum berperan untuk embriogenesis, pembengkakan jaringan (Pierik 1987: 69--70), pembelahan sel, dan elongasi sel (Pierik 1987: 69--70; Gamborg & Phillips 1995: 22), dan pembentukan akar (Gamborg & Phillips 1995: 22). Auksin sintetik atau zat pengatur tumbuh (ZPT) yang umum ditambahkan ialah *α-naphthaleneacetic acid* (NAA) (Widiastoety *dkk.* 1991: 7; Arditti & Ernst 1993: 348; Puchooa 2004: 885).

Sementara itu, sitokinin merupakan hormon tumbuhan yang secara umum berperan untuk pembelahan sel (Bidwell 1979: 391; Pierik 1987: 70; Gamborg & Phillips 1995: 22), pencegahan klorosis (Bidwell 1979: 391), dan pembentukan tunas (Pierik 1987: 70; Gamborg & Phillips 1995: 22). Zat pengatur tumbuh sitokinin yang umum digunakan ialah *benzylaminopurine* (BAP) (Widiastoety *dkk.* 1991: 67; Arditti & Ernst 1993: 348--351; Puchooa 2004: 885; Jian-Ping Luo *dkk.* 2008: 334--335; Kusmianto 2008: 20; Sunitibala & Kishor 2009: 448--450).

2.2.5. Lingkungan

Pertumbuhan dan perkembangan eksplan pada kultur *in vitro* juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Faktor lingkungan tersebut antara lain suhu dan fotoperiodisitas. Faktor lingkungan tersebut dapat berbeda sesuai dengan jenis tanaman yang menjadi eksplan (Arditti & Ernst 1993: 59--69 & 610). Suhu pada pemeliharaan kultur anggrek biasanya antara 22--26° C dan pada pemberian fotoperiodisitas antara 12--18 jam (Arditti & Ernst 1993: 610).

Sementara itu, faktor lingkungan yang tidak sesuai dapat memengaruhi kondisi eksplan. Sebagai contoh, fotoperiodisitas yang tidak sesuai dapat menyebabkan eksplan gagal tumbuh dan berkembang, bahkan mati karena terjadi pemutihan eksplan. Menurut Reed *dkk.* (2005: 23) dan Poobhaty *dkk.* (2009: 72), pemutihan eksplan dapat disebabkan oleh paparan cahaya yang terlalu lama. Pemutihan eksplan tersebut menyebabkan proses fotosintesis menjadi terganggu

karena terjadi fotooksidasi, yaitu klorofil rusak atau hilang dari dalam sel eksplan (Salisbury & Ross 1992: 259; Soontornchainaksaeng *dkk.* 2001: 236). Selain itu, paparan cahaya terlalu lama dan tinggi juga dapat menyebabkan penurunan kelembapan dan penutupan stomata sehingga konsentrasi CO₂ di dalam sel menjadi berkurang. Hal tersebut mengakibatkan proses fotosintesis menjadi terhambat (*photoinhibitor*) (Kumari & Sharma 2011: 28).

Selain akibat fotoperiodisitas yang tidak sesuai, pemutihan eksplan juga dapat terjadi akibat proses sterilisasi yang terlalu lama atau penggunaan kadar bahan sterilisasi yang terlalu tinggi (Ozel & Arslan 2006: 627--628). Beberapa contoh bahan sterilisasi tersebut ialah *calcium hypochlorite* (Ca(OCl₂)), etanol (Vejsadova 2006: 111), dan NaOCl (Ozel & Arslan 2006: 627; Vejsadova 2006: 111).

Selain suhu dan fotoperiodisitas, faktor lingkungan yang juga perlu diperhatikan adalah kebersihan. Kultur *in vitro* harus dilakukan dalam kondisi bersih dan dengan teknik steril (George & Sherrington 1984: 7; Gamborg & Phillips 1995: 3; Suryowinoto 1996: 17). Hal tersebut bertujuan untuk mencegah kontaminasi yang dapat menyebabkan kultur gagal tumbuh atau mati (George & Sherrington 1984: 7; Gamborg & Phillips 1995: 4). Kontaminasi tersebut dapat disebabkan oleh jamur dan bakteri yang berasal dari medium dan eksplan yang kurang steril (Suryowinoto 1996: 17), serta debu dari udara kotor (Gamborg & Phillips 1995: 4, 40--41).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UI, Depok. Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2010--Maret 2011

3.2 ALAT

Alat-alat yang akan digunakan adalah *Laminar Air Flow Cabinet* (Toshiba 15A300VAC), rak kultur, lemari pendingin [Panasonic], autoklaf [Hirayama HL 36 AE], oven [LAB-LINE], timbangan digital analitik [Shimadzu LIBROR EB-6200S], *hot-plate magnetic stirrer* [IKAMAG RCT], batang pengaduk magnetik, pembakar spiritus, lampu TL 20 Watt [Phillips], cawan Petri (\varnothing 8,5), Erlenmeyer (1000 ml), labu ukur (100 ml dan 1000 ml), botol penyimpan larutan stok, botol bekas selai, botol bekas balsem, botol semprot, pipet Pasteur, *pipette filler*, *synthetic rubber*, gunting, pisau skalpel, pinset, spatula, corong, serbet, masker, sarung tangan tahan panas, spidol, dan kamera [Canon IXUS60].

3.3 BAHAN

3.3.1 Tanaman donor

Tanaman donor yang akan digunakan berasal dari hasil perkecambahan biji *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm secara *in vitro* dan berumur sekitar 10 bulan dengan ukuran daun 4--8 cm. Perkecambahan tersebut dilakukan oleh Dhanik Orchid Malang-Jawa Timur. Tanaman donor yang digunakan adalah tanaman yang sehat dan tidak mengandung kontaminan.

3.3.2. Eksplan

Eksplan yang akan digunakan adalah potongan daun dari semua daun yang ada pada tanaman donor. Potongan daun tersebut berukuran kurang lebih 8 mm x 5 mm. Jumlah potongan daun yang dikultur pada satu botol perlakuan ialah 15 potong daun. Masing-masing perlakuan terdiri atas 10 botol.

3.3.3. Medium

Medium yang akan digunakan adalah media dasar Murashige dan Skoog (1962) dengan kadar makronutrien dan mikronutrientnya setengah kali dari kadar resep ($\frac{1}{2}$ MS). Medium tersebut ditambahkan agar-agar 8 gl^{-1} , gula 20 gl^{-1} , arang aktif 2 gl^{-1} , serta zat pengatur tumbuh NAA (1 mg l^{-1}) dan BAP ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$).

3.3.4. Bahan kimia

Bahan kimia yang akan digunakan adalah NH_4NO_3 [Merck]; 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]; KH_2PO_4 [Merck]; KI [Merck]; H_3BO_3 [Merck]; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; Na_2EDTA [Merck]; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; Piridoksin-HCl [Merck]; Tiamin-HCl [Merck]; glisin [Merck]; asam Nikotinat [Merck]; mio-inositol [Merck]; HCl 0,1 N; NaOH 0,1 N; α -naphthaleneacetic acid (NAA) [Merck]; benzylaminopurin (BAP) [Biochemical]; deterjen [Mama Lime]; spiritus; agar-agar [Swallow Globe]; gula pasir [Gulaku]; air; alkohol 70 %; dan Betadine.

3.3.5. Bahan habis pakai

Bahan habis pakai yang akan digunakan adalah kertas tisu, kapas, kertas alumunium (*alumunium foil*), kertas saring, plastik tahan panas, kertas label, kertas pembungkus (kertas *Yellow Pages*), karet gelang, dan perekat.

3.4. CARA KERJA

3.4.1 Pembuatan larutan stok

Bahan-bahan dasar medium $\frac{1}{2}$ MS (Murashige & Skoog 1962) disediakan dalam bentuk larutan stok makro 1, 2, 3, 4, dan 5; mikro 1 dan 2; vitamin; glisin; dan mio-inositol. Pengelompokan bahan dasar tersebut terdapat pada Tabel 3.4.2(1). termasuk juga keterangan mengenai volume masing-masing larutan stok yang dibuat dan volume yang dibutuhkan untuk membuat 1000 ml medium.

Larutan stok NAA dan BAP disediakan dalam konsentrasi 100 mg l^{-1} . Larutan stok tersebut dibuat dengan melarutkan masing-masing 10 mg NAA dan BAP dengan air hingga volume total 100 ml. Namun, NAA harus dilarutkan terlebih dahulu dengan NaOH 0,1 N sedangkan BAP dilarutkan dengan HCl 0,1 N (masing-masing kurang lebih 3 ml). Masing-masing larutan stok disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.2 Pembuatan medium

Gula, agar-agar, dan arang aktif ditimbang masing-masing 20 g, 8 g, dan 2 g. Setelah itu, disiapkan Erlenmeyer 1000 ml, kemudian ke dalam masing-masing Erlenmeyer dituang secara berturut-turut 10 ml air, larutan stok makro 1, makro 2, makro 3, makro 4, makro 5, mikro 1, mikro 2, vitamin, asam amino, mio-inositol, NAA, dan BAP sesuai Tabel 3.4.2(1) dan Tabel 3.4.2(2). Setelah itu, gula dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Campuran tersebut kemudian diaduk menggunakan *Hot Plate-Magnetic Stirrer* tanpa menyalakan pemanas. Setelah campuran tersebut homogen, derajat keasaman (pH) diatur hingga 5,8 dengan menambahkan NaOH 0,1 N untuk menaikkan pH atau menambahkan HCl 0,1 N untuk menurunkan pH. Setelah itu, campuran dipindahkan ke labu ukur 1000 ml dan ditambahkan air hingga volume 1000 ml. Selanjutnya, campuran dipindahkan kembali ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan arang aktif serta agar sambil diaduk dan dipanaskan. Setelah mendidih, campuran tersebut dituang ke dalam botol bekas balsem, masing-masing sebanyak kurang lebih 10 ml. Masing-masing

botol berisi medium ditutup dengan plastik tahan panas dan bagian leher botol diikat dengan karet gelang. Botol-botol medium tersebut kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1,2 atm dan suhu 121° C selama 20 menit.

Tabel 3.4.2(1). Komposisi dan kadar bahan dasar medium Murashige & Skoog (MS) modifikasi serta komposisi dan volume larutan stok.

No	Komposisi	Konsentrasi pada resep (mg l ⁻¹)	Bilangan pengali	Berat zat kimia yang ditimbang (mg)	Volume akhir (ml)	Volume dibutuhkan untuk 1000 ml medium ½MS (ml)
1.	Makro 1 NH ₄ NO ₃	1650	10	16500	100	5
2.	Makro 2 KNO ₃	1900	10	19000	200	10
3.	Makro 3 CaCl ₂ .2H ₂ O	440	10	4400	200	10
4.	Makro 4 MgSO ₄ .7H ₂ O	370	10	3700	100	5
5.	Makro 5 KH ₂ PO ₄	170	10	1700	100	5
6.	Mikro 1 KI H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O	0,83 6,2 22,3 8,6 0,25 0,025 0,025	100	83 620 2230 860 25 0,25 0,25	100	0,5
7.	Mikro 2 Na ₂ .EDTA FeSO ₄ .7H ₂ O	37,3 27,8	25	932,5 695	100	2
8.	Vitamin Piridoksin HCl Tiamin HCl Asam Nikotinat	0,5 0,1 0,5	100	50 10 50	100	1
9.	Asam amino Glisin	2,0	25	50	100	2
10.	Mio-inositol	100	25	2500	100	2

Tabel 3.4.2(2). Komposisi dan kadar bahan tambahan pada medium Murashige & Skoog (MS) modifikasi

No	Komposisi	Konsentrasi (mg ^l ⁻¹)	Bilangan pengali	Berat zat kimia yang ditimbang (mg)	Volume akhir (ml)	Volume dibutuhkan untuk 1000 ml medium ¹ / ₂ MS (ml)
1.	ZPT NAA BAP	1 0,1	10 100	10 10	100 100	10 1
2.	Gula	2000	-	-	-	-
3.	Agar	800	-	-	-	-
4.	Arang aktif	200	-	-	-	-

3.4.3 Sterilisasi alat dan bahan

Alat seperti pinset, skalpel, cawan Petri, dan cawan Petri berisi kertas saring dibungkus dengan kertas *Yellow Pages*. Alat seperti botol bekas selai dan Erlenmeyer ditutup mulut botolnya dengan plastik atau kertas alumunium, kemudian ditutup kembali dengan kertas *Yellow Pages* dan diikat dengan karet gelang. Selain itu, botol bekas selai yang berisi 100 ml air ditutup dengan kertas *Yellow Pages* dan plastik kemudian diikat dengan karet gelang. Alat dan bahan tersebut disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1,2 atm dan suhu 121°C selama 20 menit.

3.4.4 Penanaman eksplan

Eksplan daun diperoleh dari bibit hasil perkecambahan biji yang kondisinya masih steril di dalam botol bekas saus dengan daun berukuran 4--8 cm. Bibit tersebut diambil menggunakan pinset panjang dan diletakkan di cawan Petri. Setelah itu, daun dipisahkan dari bagian lainnya kemudian diberikan perlakuan berbeda sebelum ditanam. *Pretreatment* pertama, yaitu daun dimasukkan ke dalam cawan Petri berisi air steril kemudian dipotong di dalam air

tersebut (DA) dan *pretreatment* kedua, yaitu daun dipotong kemudian direndam di dalam air steril selama 10 menit (DR). Sementara itu, *pretreatment* sebagai kontrol, eksplan dipotong tanpa perlakuan, yaitu langsung ditanam pada medium (L). Masing-masing potongan eksplan tersebut berukuran sekitar 8 mm x 5 mm. Setelah dipotong dan diberi perlakuan, sebanyak 15 eksplan masing-masing perlakuan ditanam pada medium dengan posisi abaksial menyentuh medium, dengan sebelumnya ditiriskan terlebih dahulu di atas kertas saring. Masing-masing perlakuan terdiri atas 10 botol kultur. Botol-botol kultur tersebut diberi label tanggal penanaman dan kode perlakuan.

3.4.5 Pemeliharaan kultur

Botol kultur diletakkan pada rak kultur tertutup yang diberi cahaya dengan fotoperiodisitas terang kontinu. Cahaya tersebut berasal dari 1 buah lampu TL 20 Watt untuk menyinari setiap rak berukuran 400 cm², yang berjarak 25 cm di atas botol kultur. Botol kultur dipelihara pada suhu antara 26--28° C dan disemprot dengan alkohol 70 % setiap hari.

3.4.6 Pengamatan

3.4.6.1 Parameter kualitatif

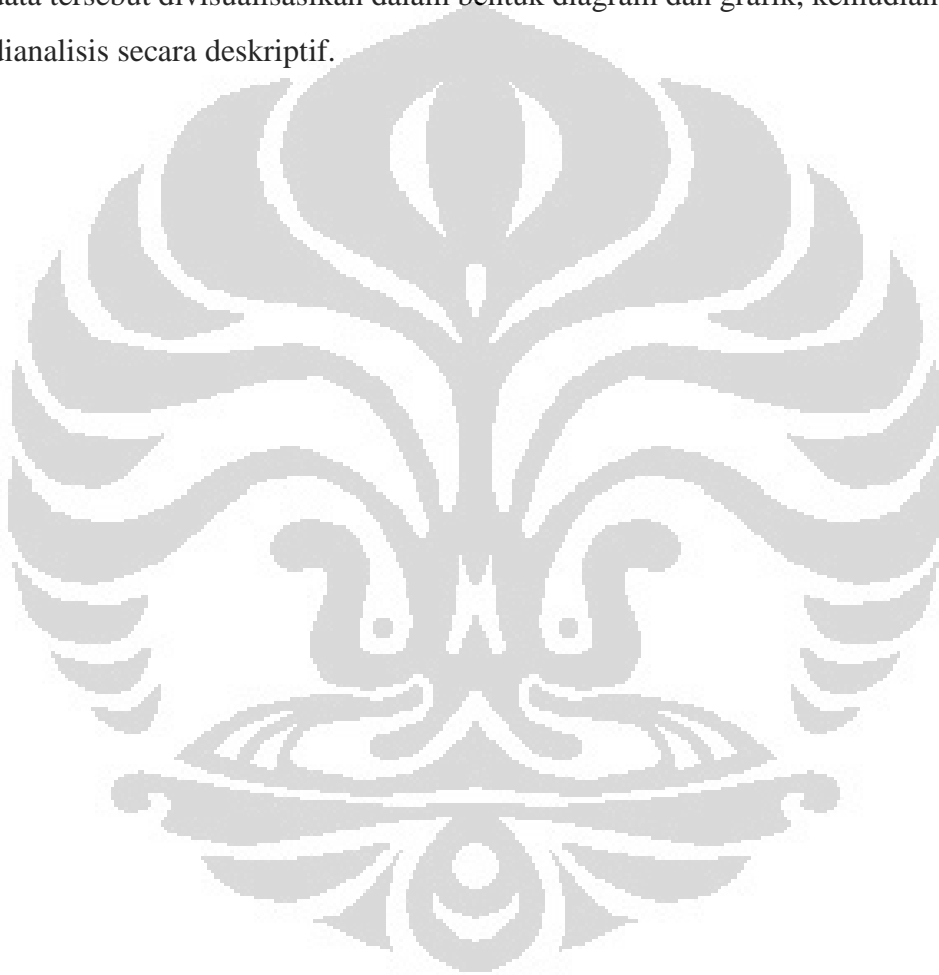
Parameter kualitatif yang diamati pada setiap botol perlakuan adalah ada atau tidak pencokelatan, ada atau tidak pemutihan, dan ada atau tidak eksplan hijau. Pengamatan dilakukan secara makroskopis. Pengamatan tersebut dilakukan hingga pekan ke-4 setelah penanaman.

3.4.6.2 Parameter kuantitatif

Parameter kuantitatif yang diamati pada setiap botol perlakuan ialah jumlah eksplan yang mengalami pencokelatan, jumlah eksplan yang mengalami pemutihan, dan jumlah eksplan hijau (tanpa pemutihan dan pencokelatan eksplan). Pengamatan dilakukan secara makroskopis. Pengamatan tersebut dilakukan hingga pekan ke-4 setelah penanaman.

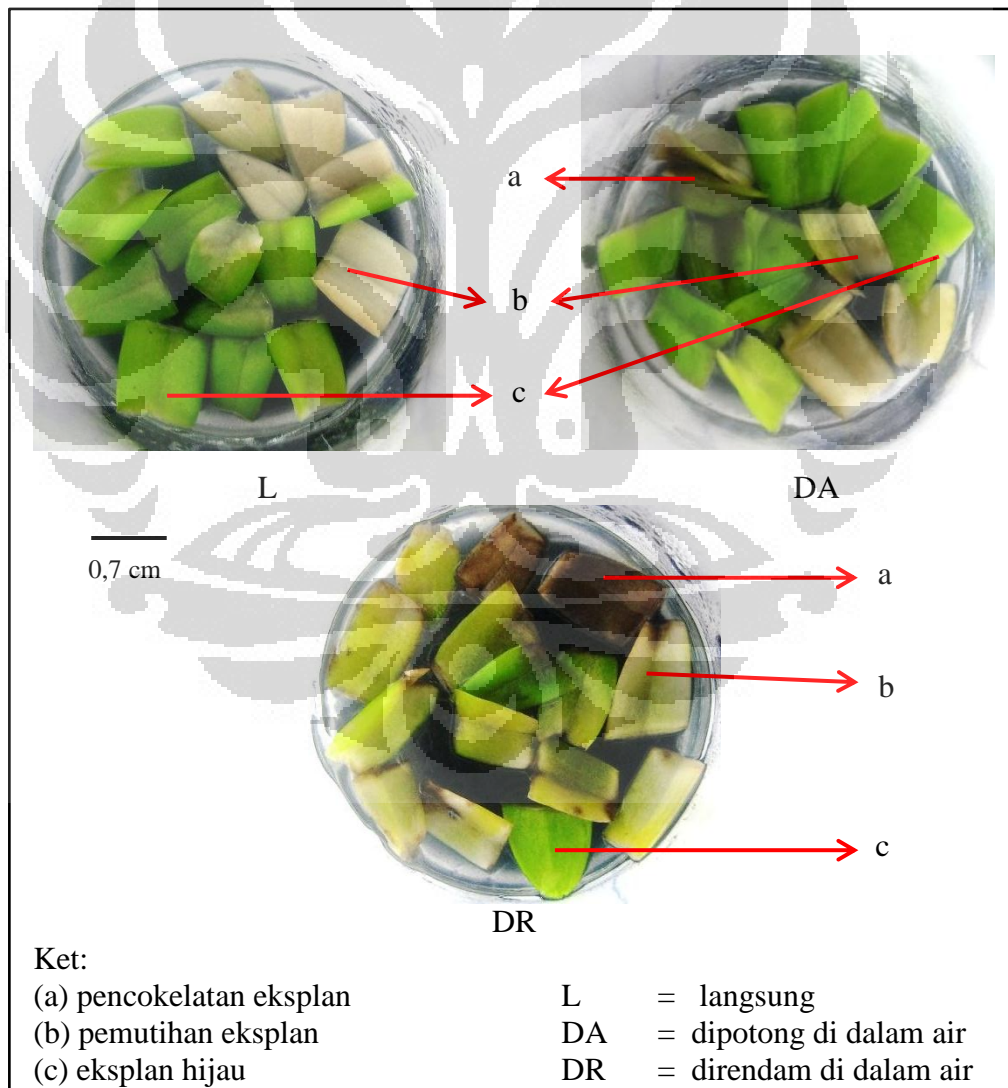
3.4.7 Analisis data

Data kualitatif yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabel hasil penelitian. Sementara itu, untuk data kuantitatif, eksplan setiap respons dijumlah pada masing-masing perlakuan. Setelah itu, dihitung nilai rata-rata (\bar{X}) kemudian dihitung juga standar deviasi (SD). Nilai rata-rata dan standar deviasi tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabel rekapitulasi. Selanjutnya, masing-masing data tersebut divisualisasikan dalam bentuk diagram dan grafik, kemudian dianalisis secara deskriptif.



BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

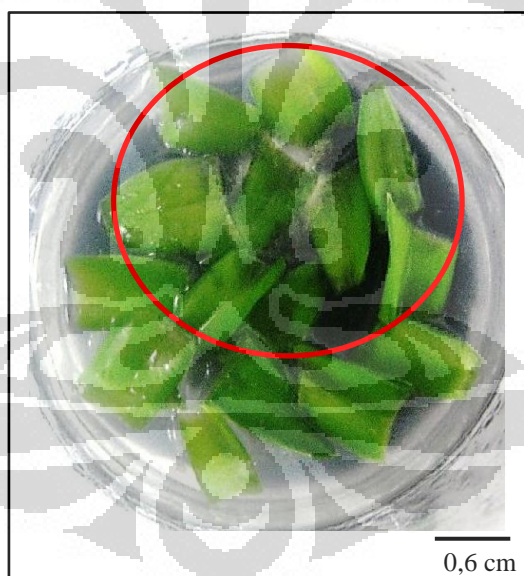
Secara umum, respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang ditanam menunjukkan pencokelatan eksplan. Selain itu, ada pula eksplan yang memberikan respons pemutihan dan ada yang tetap berwarna hijau, Gambar 4(1). Respons eksplan tersebut secara umum ada pada masing-masing *pretreatment*, yaitu eksplan langsung ditanam setelah dipotong (L), eksplan dipotong di dalam air sebelum ditanam (DA), dan eksplan direndam selama 10 menit di dalam air setelah dipotong (DR).



Gambar 4(1). Respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm terhadap *pretreatment* L, DA, dan DR pada pekan ke-4

Masing-masing *pretreatment* terdiri atas 10 botol dan dalam 1 botol ditanami 15 eksplan. Sebanyak 1 botol dari *pretreatment* L terdapat kontaminasi yang disebabkan oleh kapang pada akhir pekan ke-1, Gambar 4(2). Kontaminasi tersebut dapat menyebabkan eksplan gagal tumbuh dan berkembang (George & Sherrington 1984: 7; Gamborg & Phillips 1995: 4). Oleh sebab itu, tersisa 9 botol dari *pretreatment* L hingga pekan ke-4. Sementara itu, semua botol baik pada *pretreatment* DA maupun DR tidak mengalami kontaminasi hingga pekan ke-4, sehingga masing-masing perlakuan tersebut tetap berjumlah 10 botol.

Berdasarkan hasil penelitian, kontaminasi kemungkinan disebabkan oleh medium yang kurang steril. Hal tersebut selain dapat disebabkan oleh kesalahan pada proses sterilisasi medium yang telah dilakukan. Proses sterilisasi medium kadang dapat menyebabkan medium tercampur dengan air dari dalam autoklaf. Kemungkinan tersebut dapat terjadi karena hanya terdapat 1 botol kontaminasi dari total 30 botol (3,34 %).

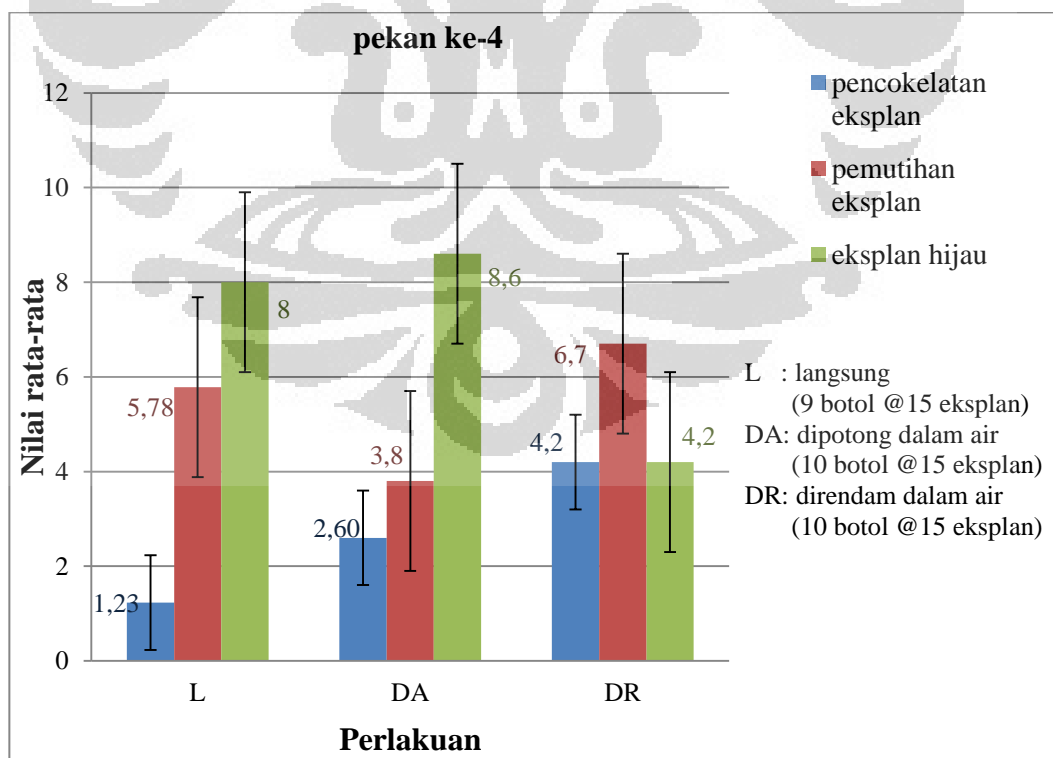


Gambar 4(2). Kontaminasi kultur daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm oleh kapang pada botol *pretreatment* L di pekan ke-1

Kontaminasi yang disebabkan oleh kapang dapat dicegah dengan cara memberikan fungisida. Fungisida tersebut dapat diberikan baik untuk sterilisasi eksplan sebelum ditanam maupun untuk ditambahkan ke dalam medium.

Beberapa contoh fungisida yang dapat digunakan ialah *Amphotericin B*, *Benomyl*, *Clotrimazole*, *Cycloheximide*, dan *Dithane* (Arditti 2008: 91--93).

Sementara itu, respons eksplan pada masing-masing botol *pretreatment* terdiri atas data kualitatif (Lampiran 1--4) dan data kuantitatif (Lampiran 5--8). Selanjutnya, respons eksplan pada pekan ke-4 dari masing-masing *pretreatment* direkapitulasi dalam Gambar 4(3) dan Tabel 4. Data respons eksplan tersebut, yaitu pencokelatan eksplan, pemutihan eksplan, dan eksplan hijau. Jika ditinjau dari respons pencokelatan eksplan, maka *pretreatment* yang memberikan nilai rata-rata pencokelatan eksplan cenderung lebih sedikit ialah *pretreatment* L ($1,23 \pm 1,56$), diikuti DA ($2,60 \pm 1,90$), dan DR ($4,20 \pm 2,04$). Berbeda dengan respons pencokelatan eksplan, nilai rata-rata pemutihan eksplan yang cenderung lebih sedikit ialah pada *pretreatment* DA ($3,80 \pm 1,81$), dibandingkan pada L ($5,78 \pm 1,64$) dan DR ($6,70 \pm 2,50$). Sementara itu, jika ditinjau dari respons eksplan hijau, maka nilai rata-rata eksplan hijau yang cenderung lebih banyak ialah pada *pretreatment* DA ($8,60 \pm 1,58$), diikuti pada L ($8,00 \pm 1,73$) yang tidak jauh berbeda dengan DA, dan DR yang cenderung lebih sedikit ($4,20 \pm 2,39$).



Gambar 4(3). Nilai rata-rata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang memberikan respons terhadap *pretreatment* L, DA, dan DR pada pekan ke-4

Tabel 4. Rekapitulasi data kuantitatif pekan ke-4 pengaruh *pretreatment* L, DA, dan DR terhadap respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm, dalam 9 botol *pretreatment* L dan 10 botol *pretreatment* DA dan DR, yang ditanami 15 eksplan setiap botol

<i>Pretreatment</i>	Jumlah eksplan ($X \pm SD$)		
	Pencokelatan	Pemutihan	Hijau
L	1,23 \pm 1,56	5,78 \pm 1,64	8,00 \pm 1,73
DA	2,60 \pm 1,90	3,80 \pm 1,81	8,60 \pm 1,58
DR	4,20 \pm 2,04	6,70 \pm 2,50	4,20 \pm 2,39

Keterangan: L = Langsung
 DA = Dipotong di dalam air
 DR = Direndam di dalam air
 X = Nilai rata-rata
 SD = Standar deviasi

Pretreatment DA dan DR dapat dianggap kurang efektif untuk mengurangi pencokelatan eksplan. Sementara itu, *pretreatment* yang kemungkinan efektif untuk mencegah pencokelatan eksplan ialah *pretreatment* L karena memberikan nilai rata-rata pencokelatan eksplan cenderung lebih sedikit dibandingkan DA dan DR. Hal tersebut tidak sesuai dengan hipotesis penelitian, yaitu pencokelatan eksplan dapat dikurangi pada *pretreatment* DA. Kemungkinan penyebab ketidaksesuaian tersebut akan dijelaskan pada Sub Bab 4.1.

Sementara itu, secara umum *survival* eksplan yang cenderung lebih baik terdapat pada *pretreatment* DA. Hal tersebut dikarenakan pada DA terdapat eksplan hijau yang cenderung lebih banyak dan jumlah pemutihan eksplan (mati) yang cenderung lebih sedikit dibandingkan pada L dan DR. Namun, pemutihan eksplan tersebut bukan merupakan parameter efektif atau tidak *pretreatment* yang diberikan. Hal tersebut dikarenakan, *pretreatment* yang diberikan tersebut bertujuan untuk mengurangi pencokelatan eksplan, bukan pemutihan eksplan. Oleh sebab itu, pemutihan eksplan dapat dikurangi dengan perlakuan lain.

Meskipun demikian, Tabel 4 dan Gambar 4(3) juga menunjukkan standar deviasi yang cenderung cukup besar. Nilai standar deviasi yang besar dapat diduga karena jumlah botol kultur masing-masing perlakuan yang kurang banyak sehingga memberikan hasil yang kurang akurat. Sementara itu, standar deviasi

data pencokelatan pada *pretreatment* L lebih besar dari nilai rata-rata ($X \pm SD = 1,23 \pm 1,56$). Hal tersebut diduga karena terjadi kontaminasi pada *pretreatment* L sehingga jumlah botol menjadi lebih sedikit dibandingkan *pretreatment* DA dan DR, yaitu tersisa 9 botol.

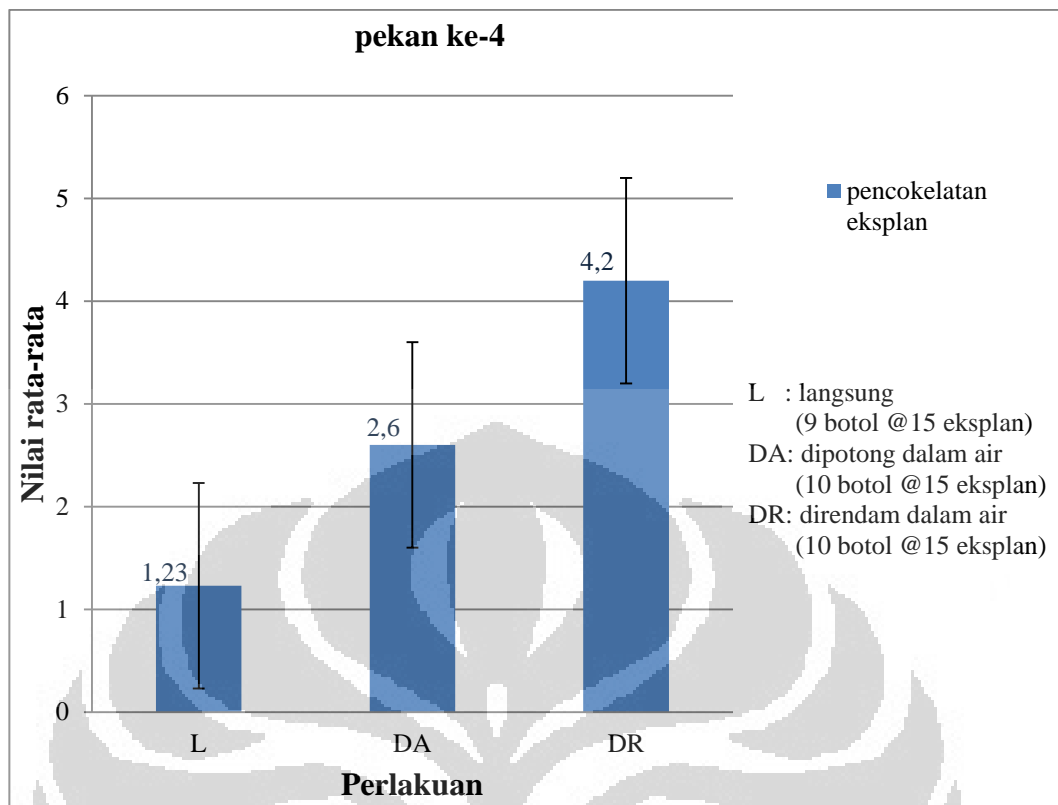
Selain itu, standar deviasi yang cukup besar juga dapat disebabkan oleh heterogenitas eksplan yang digunakan. Eksplan yang digunakan tersebut berasal dari semua daun pada tanaman donor, sehingga kandungan fenol di dalam jaringan eksplan juga dapat berbeda. Menurut Achakzai *dkk.* (2009: 2133), kandungan fenol daun tua lebih banyak dibandingkan daun muda, seperti pada *Rhododendron* sp., *Nerium oleander*, *Melia azedarach*, dan *Berberis vulgaris*.

Penelitian Chutichudet *dkk.* (2011: 217--221) juga menunjukkan bahwa kandungan fenol lebih banyak pada daun tua *Lettuce* cv. Grand Rapids. Selain fenol, kandungan enzim polifenol oksidase juga lebih banyak pada daun tua. Oleh sebab itu, pencokelatan eksplan lebih mungkin terjadi pada daun tua.

4.1 PENCOKELATAN EKSPLAN

Data pengamatan terhadap pencokelatan eksplan secara khusus pada pekan ke-4, Gambar 4.1(1), menunjukkan bahwa *pretreatment* DR merupakan *pretreatment* yang cenderung tidak efektif untuk mengurangi pencokelatan dibandingkan dengan *pretreatment* L dan DA. Hasil tersebut tidak sesuai dengan teori. Menurut George dan Sherrington (1984: 341), perendaman eksplan di dalam air sebelum ditanam dapat mengurangi pencokelatan eksplan. Hal tersebut dikarenakan fenol menjadi larut di dalam air sehingga mengurangi oksidasi fenol yang menyebabkan pencokelatan eksplan (George & Sherrington 1984: 341; Salisbury & Ross 1992: 319).

Perbedaan hasil dengan teori tersebut diduga karena waktu perendaman eksplan yang kurang tepat pada *pretreatment* DR. Idris *dkk.* (2006: 3--6) juga memberikan *pretreatment* perendaman pada pucuk dan nodus *Psidium guajava* L. sebelum ditanam. *Pretreatment* tersebut menunjukkan bahwa pencokelatan eksplan menjadi berkurang setelah dilakukan perendaman eksplan selama 3 jam di dalam air sebelum ditanam.



Gambar 4.1(1). Nilai rata-rata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang mengalami pencokelatan pada *pretreatment* L, DA, dan DR

Sementara itu, *pretreatment* perendaman eksplan pada penelitian ini dilakukan lebih sebentar, yaitu hanya selama 10 menit. Waktu perendaman tersebut mungkin tidak cukup untuk melarutkan lebih banyak fenol yang terdapat pada eksplan daun *D. lasianthera*. Penelitian Idris *dkk.* (2006: 5--6) juga menunjukkan bahwa *pretreatment* yang lebih efektif untuk mengurangi pencokelatan eksplan ialah perendaman eksplan selama 3--20 jam, di dalam air yang ditambah arang aktif sebanyak $0,5 \text{ gl}^{-1}$. Penambahan arang aktif tersebut membantu proses pengeluaran fenol dari dalam eksplan, karena arang aktif mampu menyerap senyawa fenol (George *dkk.* 2008: 259).

Berbeda dengan penelitian Idris *dkk.* (2006: 3--6), Abdullah *dkk.* (1987: 125--128) menyatakan bahwa semakin lama *pretreatment* perendaman eksplan yang dilakukan, maka pencokelatan eksplan juga akan semakin banyak. Abdullah *dkk.* (1987: 125--128), melakukan perendaman eksplan di dalam air dalam waktu yang berbeda, yaitu selama 1, 2, 4, 8, 12, dan 24 jam. Pencokelatan eksplan paling sedikit ialah pada *pretreatment* perendaman selama 1 jam dan paling

banyak terdapat pada perendaman selama 24 jam. Hasil tersebut menunjukkan semakin lama perendaman eksplan dilakukan, maka pencokelatan eksplan akan semakin banyak.

Perbedaan hasil penelitian Idris *dkk.* (2006: 3--6) dan Abdullah *dkk.* (1987: 125--128) tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan macam eksplan dan tanaman yang digunakan. Idris *dkk.* (2006: 3--6) menggunakan pucuk dan nodus *Psidium guajava* L. sebagai eksplan, sedangkan Abdullah *dkk.* (1987: 124) menggunakan eksplan pucuk fasikula *Pinus brutia* Ten. Hal tersebut menunjukkan bahwa lama perendaman eksplan untuk mengurangi pencokelatan eksplan dapat berbeda, sesuai dengan jenis tumbuhan dan macam eksplan yang digunakan.

Perbedaan tersebut dapat disebabkan senyawa fenol pada jenis tumbuhan dan eksplan yang digunakan terdapat dalam jumlah yang berbeda, sehingga proses pelarutan fenol juga membutuhkan waktu yang berbeda. Semakin banyak fenol pada eksplan, maka kemungkinan waktu perendaman yang dibutuhkan akan lebih lama. Sementara itu, belum diketahui jumlah senyawa fenol yang terdapat pada daun *D. lasianthera* sehingga belum dapat dipastikan waktu perendaman yang tepat untuk eksplan daun *D. lasianthera* pada *pretreatment* DR.

Selain *pretreatment* DR, *pretreatment* DA juga seharusnya dapat mengurangi pencokelatan eksplan dibandingkan dengan *pretreatment* L. Sama halnya dengan *pretreatment* DR, *pretreatment* DA tersebut juga dilakukan berdasarkan pada sifat fenol yang dapat larut dalam air (George & Sherrington 1984: 341; Salisbury & Ross 1992: 319). Selain itu, *pretreatment* DA juga merupakan cara untuk mengurangi kontak sel eksplan dengan udara, karena menurut Bidwell (1979: 128--129) serta Uddin dan Titov (2007: 38), pencokelatan eksplan dapat dikurangi dengan cara memperkecil kontak sel eksplan dan udara. Hal tersebut bertujuan untuk mencegah oksidasi senyawa fenol oleh enzim polifenol oksidase (George & Sherrington 1984: 335; Pierik 1987: 81; Widastoety *dkk.* 1991: 7).

Namun, *pretreatment* DA juga cenderung kurang efektif karena data penelitian pekan ke-4 menunjukkan bahwa terdapat pencokelatan eksplan yang cenderung lebih banyak dibandingkan pada L. Hal tersebut dapat diduga karena hanya sedikit fenol yang larut pada air saat pemotongan eksplan. Selain itu juga

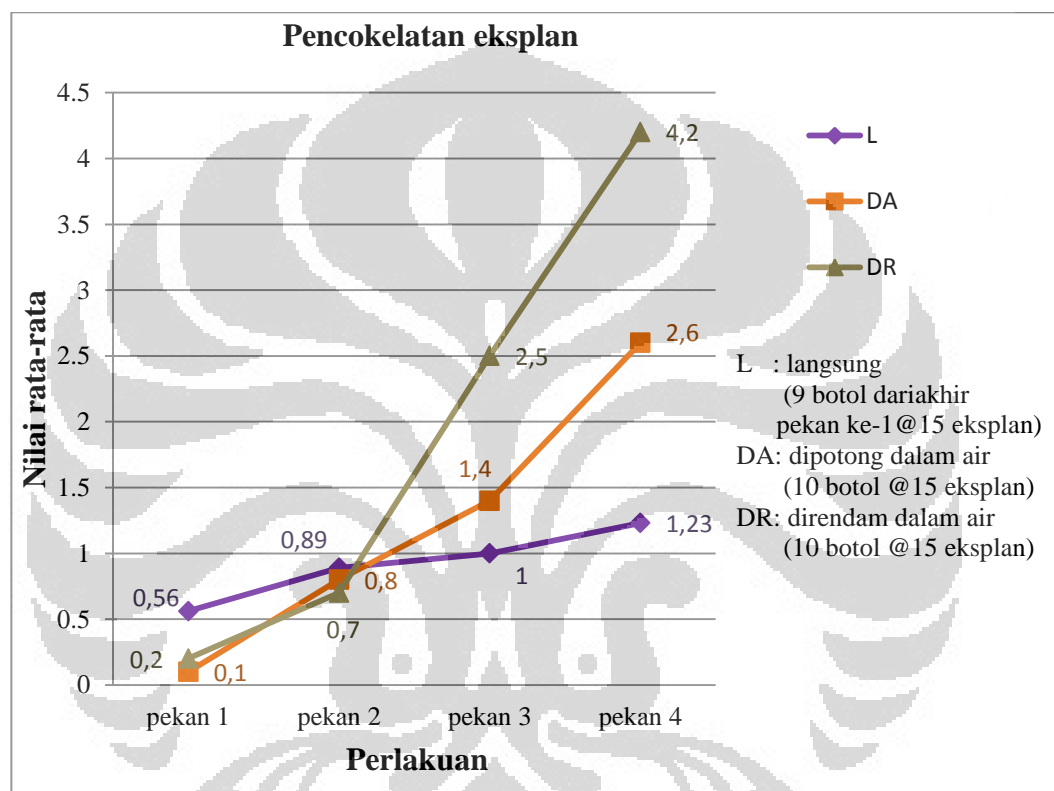
kemungkinan disebabkan oleh masih ada kontak sel eksplan dengan udara sehingga oksidasi fenol masih dapat terjadi.

Sementara itu, data pengamatan menunjukkan bahwa *pretreatment* yang cenderung efektif untuk mengurangi pencokelatan eksplan ialah *pretreatment* L. Pencokelatan eksplan tersebut dapat dikurangi dengan baik meskipun eksplan langsung ditanam setelah dipotong. Hal tersebut dapat disebabkan oleh waktu yang dibutuhkan eksplan untuk ditanam ke medium lebih sedikit dibandingkan dengan *pretreatment* DA dan DR. Oleh sebab itu, arang aktif yang terdapat pada medium dapat langsung berpengaruh terhadap eksplan. Pengaruh arang aktif tersebut ialah dapat menyerap fenol (Widiastoety & Marwoto 2004: 1--4; George *dkk.* 2008: 259; Ko *dkk.* 2008: 140) dan kuinon (Chattopadyay 2001: 2064) yang terdapat pada eksplan. Oleh sebab itu, pencokelatan eksplan kemungkinan dapat dikurangi pada *pretreatment* L. *Pretreatment* L juga dianggap lebih efisien dibandingkan dengan DA dan DR dalam hal waktu, alat, dan tenaga.

Pencokelatan eksplan pada *pretreatment* L, DA, dan DR cenderung mengalami penambahan dari pekan ke-1 hingga pekan ke-4, Gambar 4.1(2). Nilai rata-rata pencokelatan eksplan yang mengalami kecenderungan lebih banyak pada pekan ke-1 ialah eksplan dengan *pretreatment* L ($0,56 \pm 0,88$). Sementara itu, nilai rata-rata pencokelatan eksplan yang cenderung lebih sedikit ialah pada *pretreatment* DA ($0,10 \pm 0,32$) yang tidak jauh berbeda dengan DR ($0,20 \pm 0,63$). Setelah itu, pada pekan ke-2, nilai rata-rata pencokelatan eksplan pada masing-masing *pretreatment* menunjukkan kemiripan, yaitu cenderung lebih sedikit pada DR (bertambah 0,50 menjadi $0,70 \pm 0,82$), diikuti pada DA (bertambah 0,70 menjadi $0,80 \pm 1,32$) dan L (bertambah 0,33 menjadi $0,89 \pm 1,36$).

Namun, pada pekan ke-3 nilai rata-rata pencokelatan eksplan DR memiliki kecenderungan penambahan yang cukup banyak dari pekan ke-2 (sebanyak 1,80). Oleh sebab itu, nilai rata-rata pencokelatan eksplan cenderung lebih banyak terdapat pada *pretreatment* DR ($2,50 \pm 1,51$), dibandingkan dengan DA (bertambah 0,60 menjadi $1,40 \pm 1,26$) dan L (bertambah 0,11 menjadi $1,00 \pm 1,58$). Selanjutnya, pada pekan ke-4 nilai rata-rata pencokelatan eksplan yang cenderung lebih banyak ialah *pretreatment* DR ($4,20 \pm 2,04$) karena penambahan nilai rata-rata cukup banyak (sebanyak 1,7) dari pekan ke-3. Sama halnya dengan

pretreatment DR, DA juga mengalami penambahan nilai rata-rata pencokelatan eksplan yang cenderung cukup banyak (sebanyak 1,20) menjadi $2,60 \pm 1,90$. Sementara itu, kecenderungan nilai pencokelatan eksplan yang lebih sedikit pada pekan ke-4 ialah *pretreatment* L ($1,23 \pm 1,56$), karena nilai rata-rata bertambah sangat sedikit baik dari pekan ke-3 (sebanyak 0,23) maupun setiap pekan (sebanyak $\pm 0,20$).



Gambar 4.1(2). Perubahan nilai rata-rata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang mengalami pencokelatan pada *pretreatment* L, DA, dan DR setiap pekan selama 4 pekan

Berdasarkan Tabel 4.1 dan penambahan nilai rata-rata pencokelatan tersebut, diketahui bahwa pekan ke-2 merupakan rata-rata pekan awal terjadinya pencokelatan eksplan pada *pretreatment* L ($2,60 \pm 1,63$), DA ($2,75 \pm 1,16$), dan DR ($2,70 \pm 0,95$). Oleh sebab itu, dapat dilakukan proses subkultur pada pekan ke-2 ($2,68 \pm 0,08$) untuk mengurangi akumulasi fenol maupun kuinon. Mok dan Nuurzulani (2007: 34) melakukan subkultur terhadap tunas adventif *Capsicum Annuum* pada pekan ke-2 untuk mengurangi pencokelatan. Menurut Reed *dkk.*

(2005: 33), frekuensi subkultur untuk mencegah pencokelatan eksplan dapat bervariasi, setiap pekan atau setiap bulan.

Tabel 4.1. Rekapitulasi data waktu terjadi pencokelatan eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada *pretreatment* L, DA, dan DR.

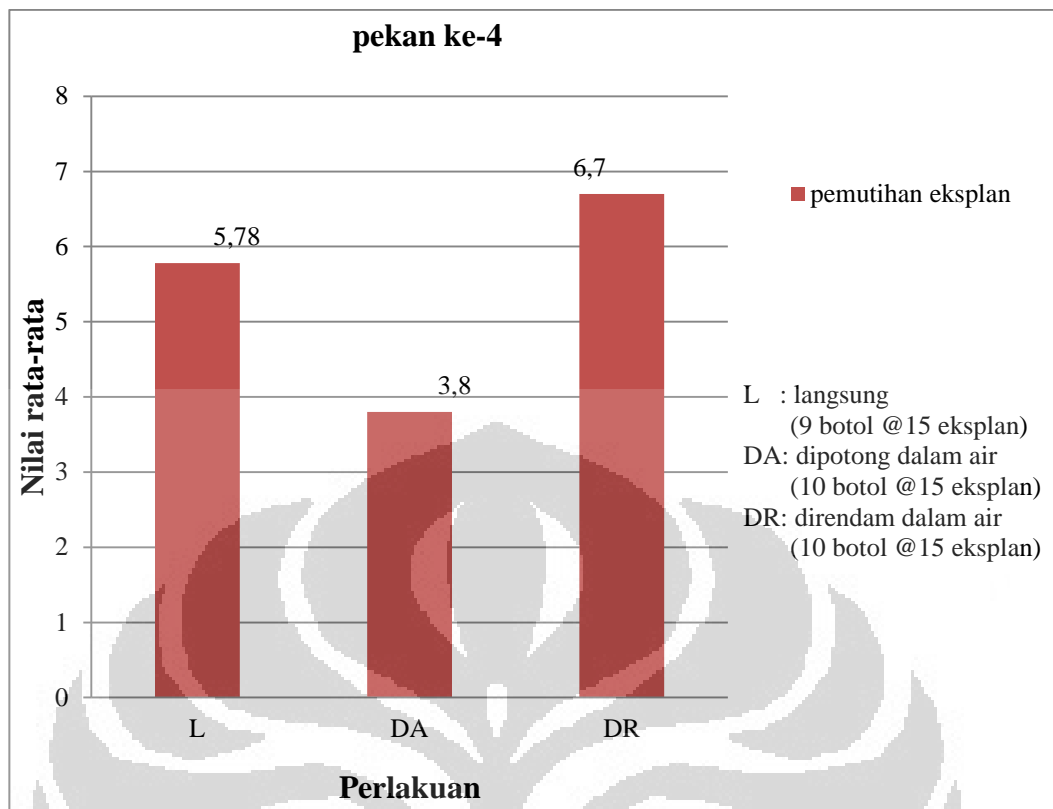
<i>Pretreatment</i>	Terjadi pencokelatan pada pekan ke- ($X \pm SD$)
L	$2,60 \pm 1,63$
DA	$2,75 \pm 1,16$
DR	$2,70 \pm 0,95$
$X \pm SD$	$2,68 \pm 0,08$

Keterangan: L = Langsung
 DA = Dipotong di dalam air
 DR = Direndam di dalam air
 X = Nilai rata-rata pekan
 SD = Standar deviasi

4.2 PEMUTIHAN EKSPLAN

Selain pencokelatan, pemutihan eksplan juga merupakan respons yang terjadi pada *pretreatment* L, DA, dan DR. Data pengamatan mengenai pemutihan eksplan secara khusus pada Gambar 4.2(1) menunjukkan bahwa pemutihan eksplan cenderung lebih sedikit terdapat pada *pretreatment* DA ($3,80 \pm 1,81$), diikuti pada L ($5,78 \pm 1,64$), dan DR ($6,70 \pm 2,50$). Meskipun demikian, data pemutihan eksplan tersebut tidak dapat dijadikan parameter keefektifitasan *pretreatment* yang diberikan, karena *pretreatment* tersebut bukan merupakan upaya untuk mengurangi pemutihan eksplan melainkan untuk mengurangi pencokelatan eksplan.

Pemutihan eksplan dapat memengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Menurut Salisbury dan Ross (1992: 259), pemutihan eksplan merupakan hilangnya zat warna hijau atau klorofil dari dalam sel eksplan sehingga proses fotosintesis menjadi terganggu. Selain itu, pemutihan eksplan juga dapat menyebabkan kematian eksplan, seperti pada eksplan kotiledon *Lycopersicon esculentum* Mill cv. *Mt11* (Siti Suhaila S.A.R. & Saleh N.M 2010: 82).



Gambar 4.2(1). Nilai rata-rata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang mengalami pemutihan pada *pretreatment* L, DA, dan DR

Penyebab umum terjadi pemutihan eksplan ialah proses sterilisasi yang terlalu lama atau penggunaan kadar bahan sterilisasi yang terlalu tinggi (Ozel & Arslan 2006: 627--628). Bahan sterilisasi yang dapat digunakan biasanya ialah *calcium hypochlorite* ($\text{Ca}(\text{OCl}_2)$), etanol (Vejsadova 2006: 111), dan NaOCl (Ozel & Arslan 2006: 627; Vejsadova 2006: 111). Namun, pemutihan eksplan tetap terjadi pada penelitian ini meskipun tanpa ada proses sterilisasi, sehingga pemutihan eksplan yang terjadi bukan disebabkan oleh bahan sterilisasi.

Pemutihan eksplan yang terjadi pada penelitian mungkin disebabkan oleh fotoperiodisitas pemeliharaan yang kurang sesuai, yaitu terang kontinu. Menurut Reed *dkk.* (2005: 23) dan Poobhaty *dkk.* (2009: 72), pemutihan eksplan dapat terjadi karena paparan cahaya yang terlalu lama. Hal tersebut terjadi pada PLBs *Ascocenda* 'Princess Mikasa' yang mengalami pemutihan akibat dipelihara pada terang kontinu. Oleh sebab itu, kultur langsung dipindahkan ke tempat gelap selama 48 jam kemudian dipelihara pada fotoperiodisitas 16 jam untuk mencegah pemutihan eksplan menjadi bertambah (Poobhaty *dkk.* 2009: 72).

Berdasarkan Tabel 4.2, pekan rata-rata pemutihan eksplan terjadi pada pekan $1,90 \pm 0,43$. Pemutihan eksplan mungkin dapat dikurangi dengan memindahkan botol kultur ke gelap kontinu pada pekan tersebut. Namun, hal tersebut belum dibuktikan dalam penelitian ini.

Tabel 4.2. Rekapitulasi data waktu terjadi pemutihan eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada *pretreatment* L, DA, dan DR.

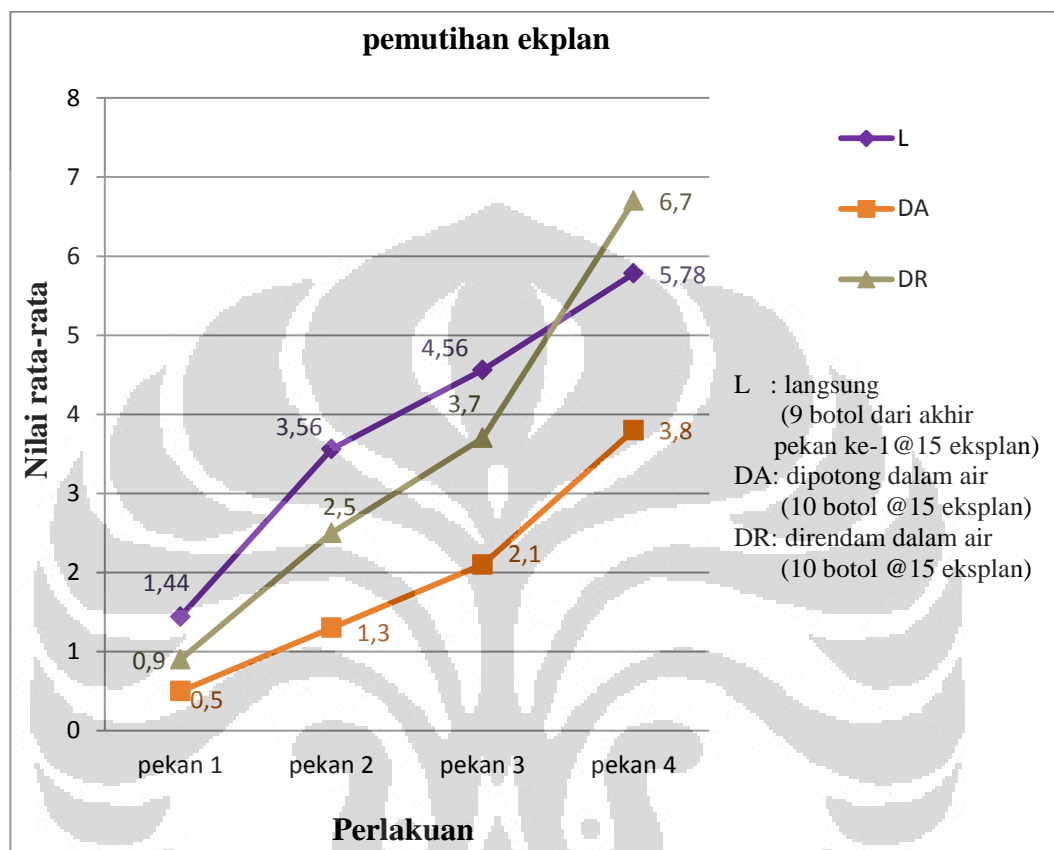
<i>Pretreatment</i>	Terjadi pemutihan pada pekan ke- ($X \pm SD$)
L	$1,40 \pm 0,70$
DA	$2,20 \pm 1,13$
DR	$2,10 \pm 0,87$
$X \pm SD$	$1,90 \pm 0,43$

Keterangan: L = Langsung
 DA = Dipotong di dalam air
 DR = Direndam di dalam air
 X = Nilai rata-rata pekan
 SD = Standar deviasi

Jika ditinjau dari perkembangan pemutihan eksplan pada Gambar 4.2(2), pemutihan eksplan pada *pretreatment* L, DA, dan DR cenderung mengalami penambahan setiap pekan. Gambar tersebut secara umum menunjukkan bahwa hingga pekan ke-3, nilai rata-rata pemutihan eksplan yang cenderung lebih banyak ialah pada *pretreatment* L, diikuti pada DR, dan pada DA. Nilai rata-rata pemutihan eksplan pada pekan ke-1, yaitu cenderung lebih sedikit pada DA $0,50 \pm 1,10$; DR $0,90 \pm 0,85$; dan L $1,44 \pm 1,24$. Selanjutnya, nilai rata-rata pemutihan eksplan pada pekan ke-2 cenderung bertambah pada masing-masing *pretreatment*. *Pretreatment* L bertambah sebanyak 2,12; DR bertambah sebanyak 1,60; dan DA bertambah sebanyak 0,80. Hal tersebut menyebabkan nilai rata-rata pemutihan eksplan yang memiliki kecenderungan lebih sedikit tetap terdapat pada *pretreatment* DA ($1,30 \pm 0,82$), diikuti pada DR ($2,50 \pm 1,58$) dan L ($3,56 \pm 1,94$).

Sama halnya pada pekan ke-2, nilai rata-rata pemutihan eksplan pada pekan ke-3 cenderung lebih banyak terdapat pada L (bertambah 1,00 menjadi $4,56 \pm 1,42$), diikuti pada DR (bertambah 1,20 menjadi $3,70 \pm 2,31$) dan DA (bertambah 0,80 menjadi $2,10 \pm 1,20$). Namun, pada pekan ke-4, *pretreatment*

DR memberikan kecenderungan nilai rata-rata pemutihan eksplan lebih banyak ($6,70 \pm 2,50$ ditambah 3,00), dibandingkan dengan *pretreatment* L ($5,78 \pm 1,64$ ditambah 1,22) dan DA ($3,80 \pm 1,81$ ditambah 1,7).



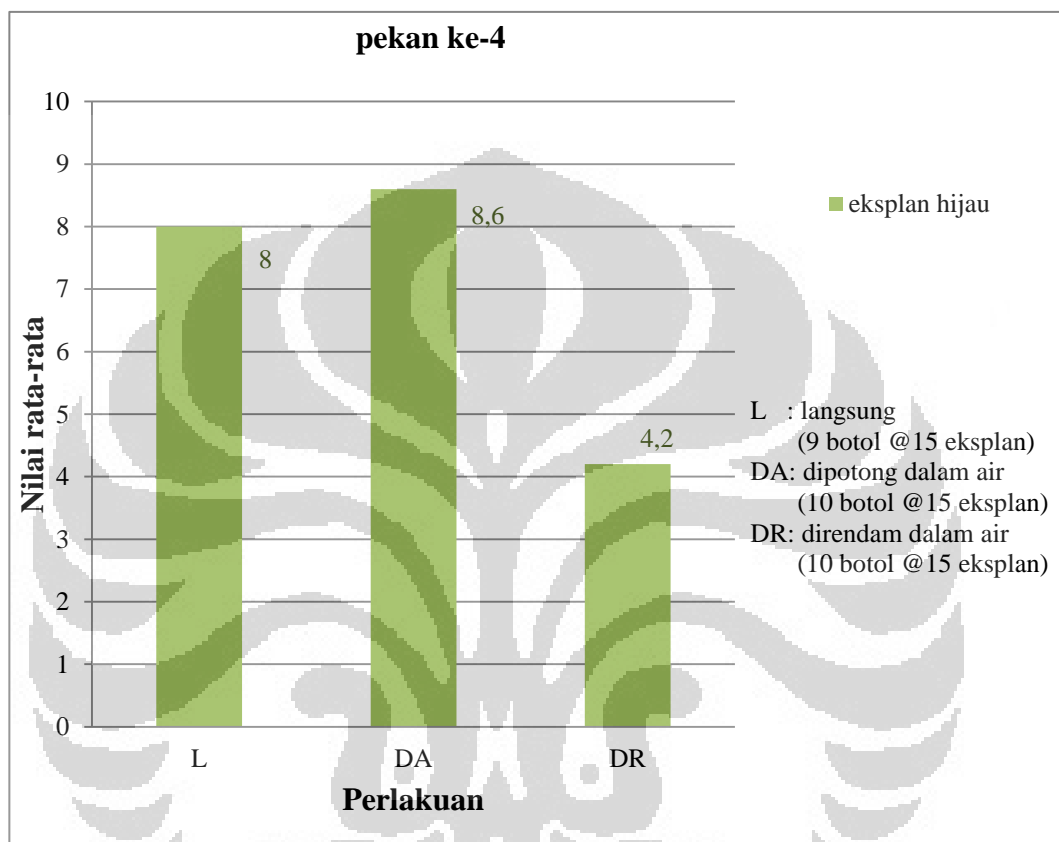
Gambar 4.2(2). Perubahan nilai rata-rata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang mengalami pemutihan pada *pretreatment* L, DA, dan DR setiap pekan selama 4 pekan

4.3 EKSPLAN HIJAU

Eksplan yang tetap berwarna hijau merupakan parameter bahwa sel-sel eksplan masih hidup (*survive*). Nilai rata-rata eksplan hijau dipengaruhi oleh nilai rata-rata pencokelatan dan pemutihan eksplan. Semakin banyak terjadi pencokelatan dan pemutihan eksplan maka nilai eksplan hijau akan semakin sedikit, dan sebaliknya.

Gambar 4.3(1) menunjukkan nilai rata-rata eksplan hijau pada *pretreatment* L, DA, dan DR. Nilai rata-rata eksplan hijau cenderung lebih banyak terdapat

pada *pretreatment* DA ($8,60 \pm 1,58$), diikuti pada L ($8,00 \pm 1,73$), dan DR ($4,20 \pm 2,39$). Hal tersebut menunjukkan bahwa secara umum, pertumbuhan eksplan cenderung lebih baik pada *pretreatment* DA dibandingkan pada *pretreatment* L dan DR.

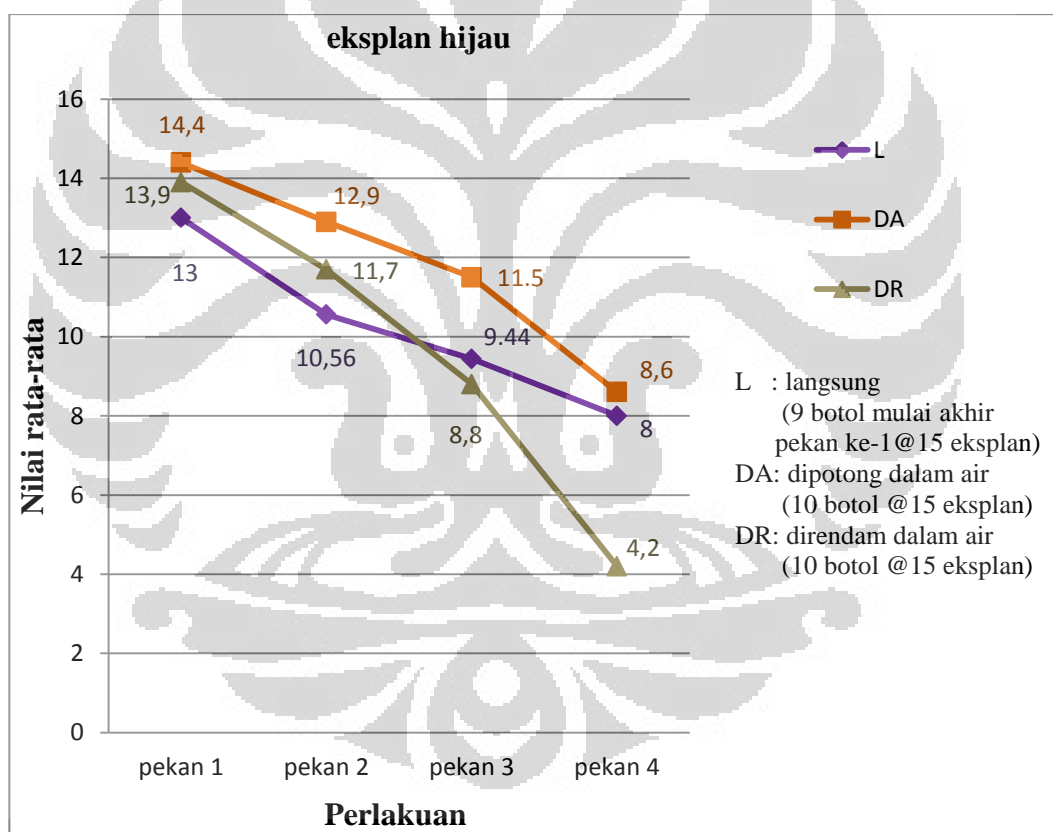


Gambar 4.3(1). Nilai rata-rata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang hijau pada *pretreatment* L, DA, dan DR

Nilai rata-rata eksplan hijau cenderung mengalami penurunan dari pekan ke-1 hingga pekan ke-4. Hal tersebut terjadi pada *pretreatment* L, DA, dan DR, Gambar 4.3(2). Nilai rata-rata eksplan hijau yang cenderung lebih banyak pada pekan ke-1 ialah pada *pretreatment* DA ($14,40 \pm 0,84$), diikuti pada DR ($13,90 \pm 1,29$) dan L ($13,00 \pm 1,00$). Sama halnya dengan pekan ke-1, nilai rata-rata eksplan hijau cenderung paling banyak pada pekan ke-2 ialah pada *pretreatment* DA (berkurang 1,50 menjadi $12,90 \pm 1,37$), dibandingkan dengan DR (berkurang 2,20 menjadi $11,7 \pm 1,64$) dan L (berkurang 2,44 menjadi $10,56 \pm 1,74$).

Nilai rata-rata eksplan hijau pada pekan ke-3 cenderung semakin berkurang pada masing-masing *pretreatment*. *Pretreatment* DA berkurang

sebanyak 1,40; L sebanyak 1,12; dan cenderung berkurang lebih banyak terjadi pada DR, sebanyak 2,26. Oleh sebab itu, eksplan hijau yang mengalami kecenderungan lebih banyak terdapat pada DA ($11,5 \pm 1,18$), diikuti pada L ($9,44 \pm 1,81$), dan DR ($8,80 \pm 2,04$). Selanjutnya, urutan tersebut sama halnya pada pekan ke-4. *Pretreatment* DA cenderung berkurang cukup banyak (berkurang 2,9) sehingga nilai rata-rata eksplan menjadi $8,6 \pm 1,56$. Nilai tersebut cenderung hampir sama dengan nilai rata-rata eksplan L ($8,00 \pm 1,73$) yang sedikit berkurang dari pekan ke-3 hingga pekan ke-4 (berkurang 1,44). Sementara itu, nilai rata-rata eksplan hijau pada *pretreatment* DR cenderung lebih sedikit ($4,20 \pm 2,39$) karena berkurang cukup banyak pada pekan ke-4 (berkurang 4,60).



Gambar 4.3(2). Perubahan nilai rata-rata eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm yang hijau pada *pretreatment* L, DA, dan DR setiap pekan selama 4 pekan

Nilai rata-rata eksplan hijau yang semakin berkurang pada semua *pretreatment* dipengaruhi oleh beberapa hal, yaitu kontaminasi, pencokelatan eksplan, dan pemutihan eksplan yang dapat menyebabkan kematian eksplan. Oleh sebab itu, perlu dilakukan upaya untuk mengurangi kontaminasi, pencokelatan

eksplan, dan pemutihan eksplan agar eksplan tidak mati dan tetap hijau (*survive*). Semakin banyak eksplan yang tetap hijau, maka kemungkinan eksplan untuk memberikan respons tumbuh dan berkembang juga akan semakin banyak.

Sementara itu, hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan hijau pada semua perlakuan tidak memberikan respons lebih lanjut seperti, pembentukan kalus maupun PLBs. Meskipun demikian, dilihat dari perbandingan sayatan preparat segar eksplan pada hari ke-0 dan ke-51, diperoleh gambaran bahwa sel eksplan mengalami pembesaran (Lampiran 9). Hal tersebut menyebabkan ukuran eksplan juga menjadi lebih besar (Lampiran 10).



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

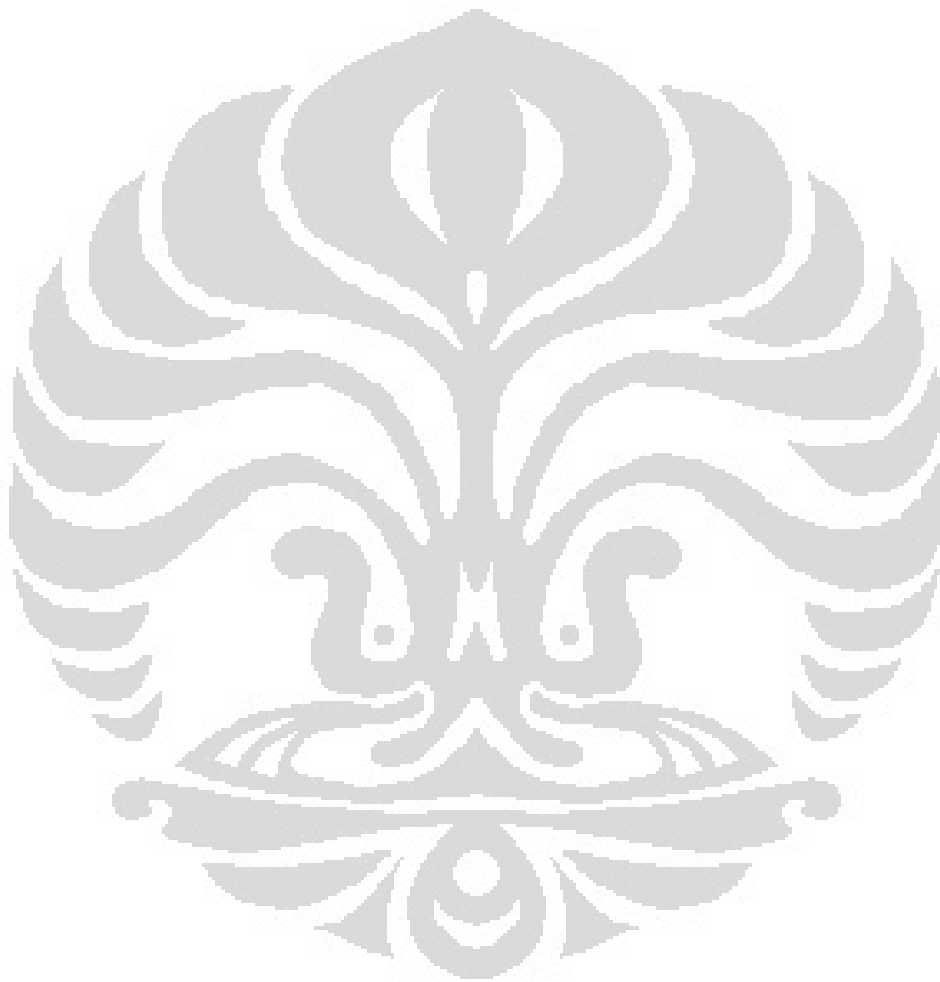
5.1 KESIMPULAN

1. Respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm secara umum pada *pretreatment* L, DA, dan DR ialah pencokelatan eksplan, pemutihan eksplan, dan eksplan tetap hijau.
2. *Pretreatment* L cenderung lebih baik untuk mengurangi pencokelatan eksplan (tidak sesuai dengan hipotesis).
3. *Pretreatment* DA cenderung lebih baik untuk *survival* eksplan (eksplan hijau).
4. Nilai rata-rata pencokelatan eksplan dari terendah ke tertinggi ialah *pretreatment* L ($1,23 \pm 1,56$), DA ($2,56 \pm 1,90$), dan DR ($4,20 \pm 2,04$).
5. Nilai rata-rata pemutihan eksplan dari terendah ke tertinggi ialah *pretreatment* DA ($3,80 \pm 1,81$), L ($5,78 \pm 1,64$), dan DR ($6,70 \pm 2,50$).
6. Nilai rata-rata eksplan hijau dari tertinggi ke terendah ialah *pretreatment* DA ($8,60 \pm 1,58$), L ($8,00 \pm 1,73$), dan DR ($4,20 \pm 2,39$).

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan jumlah ulangan yang lebih banyak untuk memperoleh data yang lebih akurat.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai *pretreatment* DA secara khusus, yaitu memberikan variasi zat tambahan, seperti arang aktif ke dalam air pada saat pemotongan eksplan.
3. Perlu dilakukan penelitian mengenai *pretreatment* DR secara khusus, yaitu memberikan variasi yang lebih banyak dalam hal waktu perendaman dan pemberian zat tambahan, seperti arang aktif pada larutan saat perendaman eksplan.
4. Perlu dilakukan penelitian mengenai faktor-faktor subkultur yang tepat untuk mengurangi pencokelatan eksplan seperti, waktu, medium, dan lingkungan pemeliharaan.

5. Perlu dilakukan penelitian mengenai cara terbaik untuk mengurangi pemutihan eksplan, seperti pemberian fotoperiodisitas yang berbeda selama pemeliharaan.



DAFTAR REFERENSI

- Abdullah, A.A., M.M. Yeoman & J. Grace. 1987. Micropropagation of mature Calabrian pine (*Pinus brutia* Ten.) from fascicular buds. *Tree Physiology* **3**: 123--136.
- Achakzai, A.K.K., P. Achakzai, A. Masood, S.A. Kayani & R.B. Tareen. 2009. Respons of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. *Pakistan Journal Botanica* **41**(5): 2129--2135.
- Aktar, S., K.M. Nasiruddin & H. Huq. 2007. *In vitro* root formation in *Dendrobium* orchid plantlets with IBA. *Journal of Agriculture & Rural Development* **5**(1&2): 48--51.
- Alam, M.K., M.H. 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.
- Andrade, L.S., E.A. Laurindo, R.V. de Oliveira, R.C. Rocha-Filho & Q.B. Cass. 2006. Development of a HPLC method to follow the degradation of phenol by electrochemical or photoelectrochemical treatment. *Journal Brazil Chemical Social* **17**(2): 369--373.
- Arditti, J. 2008. *Micropropagation of orchids: Volume 1*. 2nd ed. Blackwell Publishing, Malden: xxi + 1523 hlm.
- Arditti, J. & R. Ernst. 1993. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & sons, Inc., New York: xiii + 682 hlm.
- Bidwell, R.G.S. 1979. *Plant physiology*. 2nd ed. Macmillan Publishing Co. Inc., New York: xx + 726 hlm.
- Bin Zhou, Xinfang Wei, Rongting Wang & Jingming Jia. 2010. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. *Asian Journal of Traditional Medicines* **5**(3): 109--116.
- Chattopadhyay, S., A.K. Srivastava, S.S. Bhojwani & V.S. Bisaria. 2001. Development of suspension culture of *Podophyllum hexandrum* for production of podophyllotoxin. *Biotechnology Letters* **23**: 2063--2066.

- Chutichudet, B., P. Chutichudet & S. Kaewsit. 2011. Influence of developmental stage on activities of polyphenol oxidase, internal characteristics and colour of Lettuce cv. Grand Rapids. *American Journal of Food Technology* **6**(3): 215--225.
- Dressler, R.L. 1990. *The orchids: Natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge: 332 hlm.
- Gamborg, O.L. & G.C. Phillips. 1995. *Plant cell, tissue, and organ culture: Fundamental method*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York: xxi + 358 hlm.
- George, E.F., M.A. Hall & G.J. de Klerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture: The background*. 3rd ed. Springer, Dordrecht: xi + 501 hlm.
- George, E.F. & P.D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetic Limited, Basingstokes: vii + 709 hlm.
- Hew, C.S. & J.W.H. Yong. 1997. *The physiology of tropical orchids in relation to the industry*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore: xiii + 331 hlm.
- Hopkins, W.G. 1999. *Introduction to plant physiology*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xv + 512 hlm.
- Hsiao-Hang Chung, Jen-Tsung Chen & Wei-Chin Chang. 2005. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai Pink and subsequent plant regeneration. *In Vitro Cell Development Biology Plant* **41**: 765--769.
- Hsiao-Hang Chung, Jen-Tsung Chen & Wei-Chin Chang. 2007. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biologia Plantarum* **51**(2): 346--350.
- Idris, T.I.M., M.M. El Fatih & A.E. Said. 2006. Enhancement of growth and control of browning of tissue cultures of guava (*Psidium Guajava L.*). *Journal Science Technology* **7**(1): 1--10.
- 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 Organ Culture* **93**: 333--340.

- Kiong, A.L.P., Yeo Shu Thing, J.A. Gansau & S. Hussein. 2008. Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revolute*. *African Journal of Biotechnology* **7**(23): 4279--4284.
- Ko, W.H., C.C. Su, C. L. Chen & C. P. Chao. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **96**: 137--141.
- Kong, Q., S.Y. Yuan & Gy. Végvári. 2007. Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* 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 antennatum* Lindl. secara *in vitro*. Skripsi Sarjana Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam dan Matematika, Universitas Indonesia, Depok: x +72 hlm.
- Ledo, A. da S., O.A. Lameira, A.K. Benbadis, I.C. de Menezes, M. do S.P. de Oliveira & S.M. Filho. 2002. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Rev. Bras. Frutic* **24**(3): 601--603.
- Millar, A. 1999. *Orchids of Papua New Guinea*. Timber Press, Portland: x + 118 hlm.
- Mok, S.H. & K. Norzuulani. 2007. Trouble shooting for recalcitrant bud formation in *Capsicum Annuum* var. Kulai. *AsPac Journal Molecular Biology Biotechnology* **15**(1): 33--38.
- Nguyen Thi Hong Nhat & Tran Thi Dung. 2006. *In vitro* propagation of *Dendrobium* orchid through thin stem section culture. *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*: 154--155.
- 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* **8**(5): 626--629.
- Pierik, L.R.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.
- Prasetya, R. 2007. Ragam spesies *Dendrobium* unggul. *Anggrek Indonesia*. **4**: 21--34.
- Puchooa, D. 2004. Comparison of different culture media for the in vitro culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). *International Journal of Agriculture & Biology* **6**(5): 884--888.
- Reed, B.M., F. Engelmann, E. Dulloo & J.M.M. Engels. 2005. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. IPGRI, Roma: 95 hlm.
- Richards, S.J. & S. Suryadi. 2002. *A Biodiversity Assessment of Yongsu-Cyclops Mountains and the Southern Mamberamo Basin, Papua, Indonesia*. Conservation International, Washington: 180 hlm.
- Salisbury, F.B. & C.W. Ross. 1992. *Plant physiology*. 4th ed. Wadsworth Inc., California: xviii + 682 hlm.
- Satsijati. 1991. Pengaruh media tumbuh terhadap pertumbuhan bibit anggrek *Dendrobium youpphadeewan*. *Jurnal Hortikultura* **1**(3): 15--22.
- Sheehan, T.J. & M. Sheehan. 1994. *An illustrated survey of orchid genera*. Timber Press, Inc., Portland: 422 hlm.
- Siti Suhaila S.A.R. & Saleh N.M. 2010. Inhibitory Effect of Kanamycin on *In Vitro* Culture of *Lycopersicon esculentum* Mill cv. *Mt11*. *Journal Agrobiotechnology* **1**: 79--86.
- Soontornchainaksaeng, P., S. Chaicharoen, M. Sirijuntarut & M. Kruatrachue. 2001. In vitro studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit.) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. *Science Asia* **27**: 233--237.
- Sunitibala, H. & R. Kishor. 2009. Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. From axenic pseudobulb segments. *Indian Journal of Biotechnology* **8**: 448--452.
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan tanaman secara in vitro*. Kanisius, Yogyakarta: 252 hlm.

- Teoh Eng Soon. 2005. *Orchids of Asia*. 3rd ed. Marshall Cavendish, Singapore: 367 hlm.
- Uddin, S.N. & S. Titov. 2007. Somatic embryogenesis of *Musa* sp. cv. Kanthali using floral bud explants. *Journal of Plant Sciences* **2**(1): 35--44.
- Vejsadova, H. 2006. Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **48**(1): 109--113.
- Wen-Hei Chen & Hong-Hwa Chen. 2007. *Orchid biotechnology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., New Jersey: xviii + 258 hlm.
- Wetter, L.R. & F. Constabel. 1991. *Metode kultur jaringan tanaman*. ed ke-2. Terj. dari *Plant tissue culture methods* oleh Widiyanto, M.B. Penerbit ITB Bandung: 13a + 191 hlm.
- Widiastoety, D. & B. Marwoto. 2004. Pengaruh berbagai sumber arang dalam media kultur *in vitro* terhadap pertumbuhan plantlet *Oncidium*. *Jurnal Hortikultura* **14**(1): 1--4.
- Widiastoety, D. & F.A. Bahar. 1995. Pengaruh berbagai sumber dan kadar karbohidrat terhadap pertumbuhan plantlet anggrek *Dendrobium*. *Jurnal Hortikultura* **5**(3): 76--80.
- Widiastoety, D., Syafril & B. Haryanto. 1991. Kultur *in vitro* anggrek *Dendrobium* dalam medium cair. *Jurnal Hortikultura* **1**(3): 6--10.
- Yildiz, M., S. Önde & M. Özgen. 2007. Sucrose effects on phenolic Concentration and plant regeneration from sugarbeet leaf and petiole explants. *Journal OF Sugar Beet Research* **44**(1&2): 1--15.

Lampiran 1
Data kualitatif respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada pekan ke-1 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR

Respons <i>Pretreatment</i>	Pencokelatan			Pemutihan			Hijau		
	L	DA	DR	L	DA	DR	L	DA	DR
No. botol									
1	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
2	K	-	-	K	+	-	K	+++	+++
3	-	+	-	+	-	-	+++	+++	+++
4	+	-	-	+	-	+	+++	+++	+++
5	-	-	-	+	-	+	+++	+++	+++
6	-	-	-	+	+	-	+++	+++	+++
7	-	-	-	+	-	+	+++	+++	+++
8	+	-	-	-	-	+	+++	+++	+++
9	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
10	-	-	+	+	+	+	+++	+++	+++

Keterangan:

- L = Langsung
- DA = Dipotong di dalam air
- DR = Direndam di dalam air
- K = Kontaminasi
- = Tidak ada
- + = Ada, sedikit
- ++ = Ada, sedang
- +++ = Ada, banyak

Lampiran 2
Data kualitatif respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada pekan ke-2 di dalam botol pretreatment L, DA, dan DR

Respons <i>Pretreatment</i>	Pencokelatan			Pemutihan			Hijau		
	L	DA	DR	L	DA	DR	L	DA	DR
No. botol									
1	-	-	+	+	+	+	+++	+++	+++
2	K	-	-	K	+	+	K	+++	+++
3	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++
4	-	-	-	+	+	+	++	+++	+++
5	-	+	-	+	-	+	+++	+++	+++
6	+	+	+	+	+	-	++	+++	+++
7	-	-	-	+	-	+	+++	+++	+++
8	-	-	-	++	+	+	++	+++	+++
9	+	+	+	-	+	+	+++	+++	++
10	-	-	+	+	+	+	+++	+++	++

Keterangan:

- L = Langsung
- DA = Dipotong di dalam air
- DR = Direndam di dalam air
- K = Kontaminasi
- = Tidak ada
- +
- ++ = Ada, sedang
- +++ = Ada, banyak

Lampiran 3
Data kualitatif respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada pekan ke-3 di dalam botol *pretreatment* L, DA, dan DR

Respons <i>Pretreatment</i>	Pencokelatan			Pemutihan			Hijau		
	L	DA	DR	L	DA	DR	L	DA	DR
No. botol									
1	-	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
2	K	+	+	K	+	+	K	++	+++
3	+	+	+	+	+	+	++	+++	++
4	-	+	+	++	+	+	++	+++	+++
5	-	+	+	+	-	++	+++	+++	++
6	+	+	+	+	+	-	++	+++	++
7	-	+	+	+	+	+	+++	+++	++
8	-	-	+	++	+	+	++	+++	++
9	+	+	+	+	+	+	+++	+++	++
10	-	-	+	+	+	+	++	+++	++

Keterangan:

- L = Langsung
- DA = Dipotong di dalam air
- DR = Direndam di dalam air
- K = Kontaminasi
- = Tidak ada
- + = Ada, sedikit
- ++ = Ada, sedang
- +++ = Ada, banyak

Lampiran 4
Data kualitatif respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada pekan ke-4 di dalam botol *pretreatment* L, DA, dan DR

Respons <i>Pretreatment</i>	Pencokelatan			Pemutihan			Hijau		
	L	DA	DR	L	DA	DR	L	DA	DR
No. botol									
1	-	+	+	++	++	+	++	++	++
2	K	+	+	K	+	++	K	++	++
3	+	+	++	+	+	+	+	++	++
4	+	++	+	++	+	++	++	++	++
5	+	+	+	+	+	+++	++	++	+
6	+	+	+	+	++	++	++	++	+
7	-	+	+	++	+	++	++	++	+
8	-	+	++	++	+	++	++	++	+
9	+	+	+	+	+	++	++	++	+
10	+	-	+	++	+	++	++	+++	+

Keterangan:

- L = Langsung
- DA = Dipotong di dalam air
- DR = Direndam di dalam air
- K = Kontaminasi
- = Tidak ada
- + = Ada, sedikit
- ++ = Ada, sedang
- +++ = Ada, banyak

Lampiran 5
Data kuantitatif respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada pekan ke-1 di dalam botol *pretreatment* L, DA, dan DR

Respons <i>Pretreatment</i>	Pencokelatan			Pemutihan			Hijau		
	L	DA	DR	L	DA	DR	L	DA	DR
No. botol									
1	0	0	0	0	0	0	15	15	15
2	K	0	0	K	2	0	K	13	15
3	0	1	0	2	0	0	13	14	15
4	1	0	0	2	0	1	12	15	14
5	0	0	0	2	0	3	13	15	12
6	0	0	0	3	2	0	12	13	15
7	0	0	0	1	0	2	14	15	13
8	2	0	0	0	0	2	13	15	13
9	2	0	0	0	0	0	13	15	15
10	0	0	2	3	1	1	12	14	12
X	0,56	0,10	0,20	1,44	0,50	0,90	13,00	14,40	13,90
SD	0,88	0,32	0,63	1,24	1,10	0,85	1,00	0,84	1,29

Keterangan: L = Langsung
 DA = Dipotong di dalam air
 DR = Direndam di dalam air
 K = Kontaminasi
 X = Nilai rata-rata
 SD = Standar deviasi

Lampiran 6
Data kuantitatif respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada pekan ke-2 di dalam botol *pretreatment* L, DA, dan DR

Respons <i>Pretreatment</i>	Pencokelatan			Pemutihan			Hijau		
	L	DA	DR	L	DA	DR	L	DA	DR
No. botol									
1	0	0	1	4	1	2	11	14	12
2	K	0	0	K	2	1	K	13	13
3	3	2	1	3	2	2	9	11	12
4	0	0	0	5	1	1	10	14	14
5	0	4	0	2	0	4	13	11	11
6	3	1	2	3	2	0	9	12	13
7	0	0	0	4	0	3	11	15	12
8	0	0	0	7	2	3	8	13	12
9	2	1	1	0	2	5	13	12	9
10	0	0	2	4	1	4	11	14	9
X	0,89	0,80	0,70	3,56	1,30	2,50	10,56	12,90	11,7
SD	1,36	1,32	0,82	1,94	0,82	1,58	1,74	1,37	1,64

Keterangan: L = Langsung
 DA = Dipotong di dalam air
 DR = Direndam di dalam air
 K = Kontaminasi
 X = Nilai rata-rata
 SD = Standar deviasi

Lampiran 7
Data kuantitatif respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada pekan ke-3 di dalam botol *pretreatment* L, DA, dan DR

Respons <i>Pretreatment</i>	Pencokelatan			Pemutihan			Hijau		
	L	DA	DR	L	DA	DR	L	DA	DR
No. botol									
1	0	1	2	4	3	2	11	11	11
2	K	1	1	K	4	3	K	10	11
3	4	2	5	5	2	2	6	11	8
4	0	1	1	6	3	2	9	11	12
5	0	4	1	4	0	8	11	11	6
6	3	1	5	4	3	0	8	11	10
7	0	3	2	4	1	5	11	11	8
8	0	0	2	7	2	5	8	13	8
9	2	1	3	2	2	5	11	12	7
10	0	0	3	5	1	5	10	14	7
X	1,00	1,40	2,50	4,56	2,10	3,70	9,44	11,5	8,80
SD	1,58	1,26	1,51	1,42	1,20	2,31	1,81	1,18	2,04

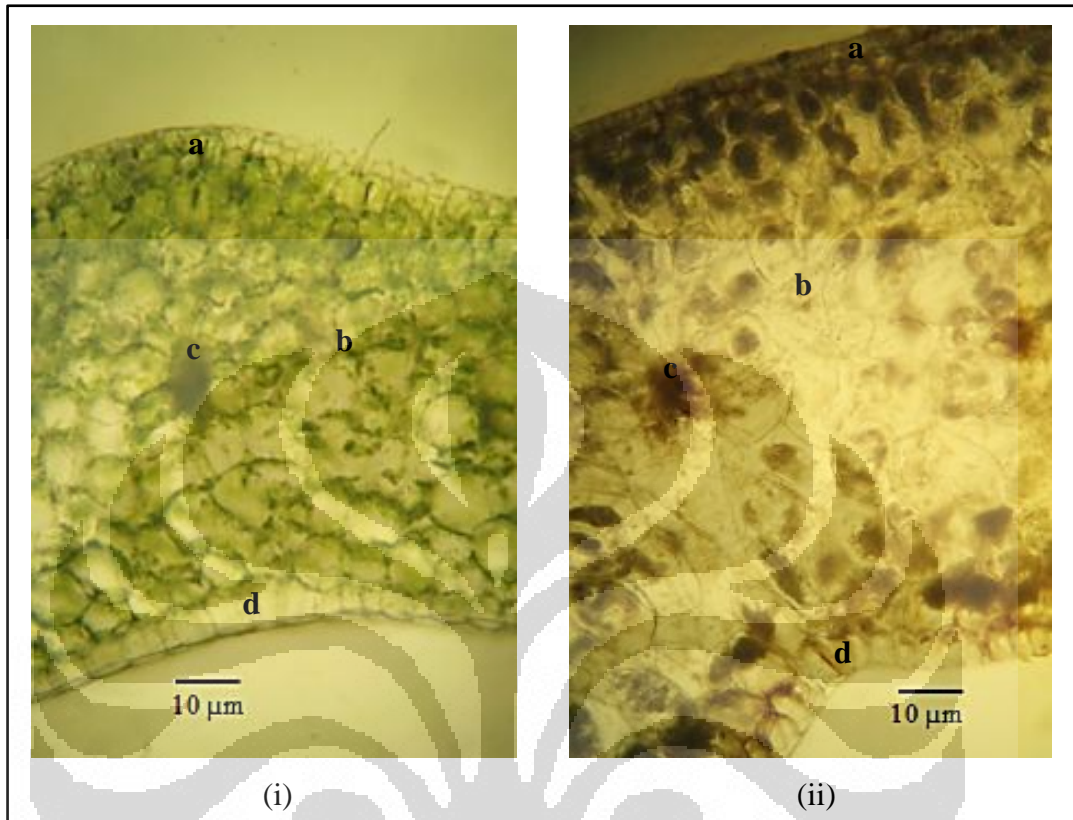
Keterangan: L = Langsung
 DA = Dipotong di dalam air
 DR = Direndam di dalam air
 K = Kontaminasi
 X = Nilai rata-rata
 SD = Standar deviasi

Lampiran 8
Data kuantitatif respons eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada pekan ke-4 di dalam botol *pretreatment* L, DA, dan DR

Respons <i>Pretreatment</i>	Pencokelatan			Pemutihan			Hijau		
	L	DA	DR	L	DA	DR	L	DA	DR
No. botol									
1	0	1	2	7	7	5	8	7	8
2	K	4	3	K	4	6	K	7	6
3	5	2	7	5	4	2	5	9	7
4	1	6	3	7	1	6	7	8	6
5	1	5	2	4	2	11	10	8	2
6	1	2	5	5	6	7	9	7	3
7	0	3	3	6	3	9	9	9	3
8	0	1	8	7	5	6	8	9	1
9	2	2	5	3	3	6	10	10	4
10	1	0	4	8	3	9	6	12	2
X	1,23	2,60	4,20	5,78	3,80	6,70	8,00	8,60	4,20
SD	1,56	1,90	2,04	1,64	1,81	2,50	1,73	1,58	2,39

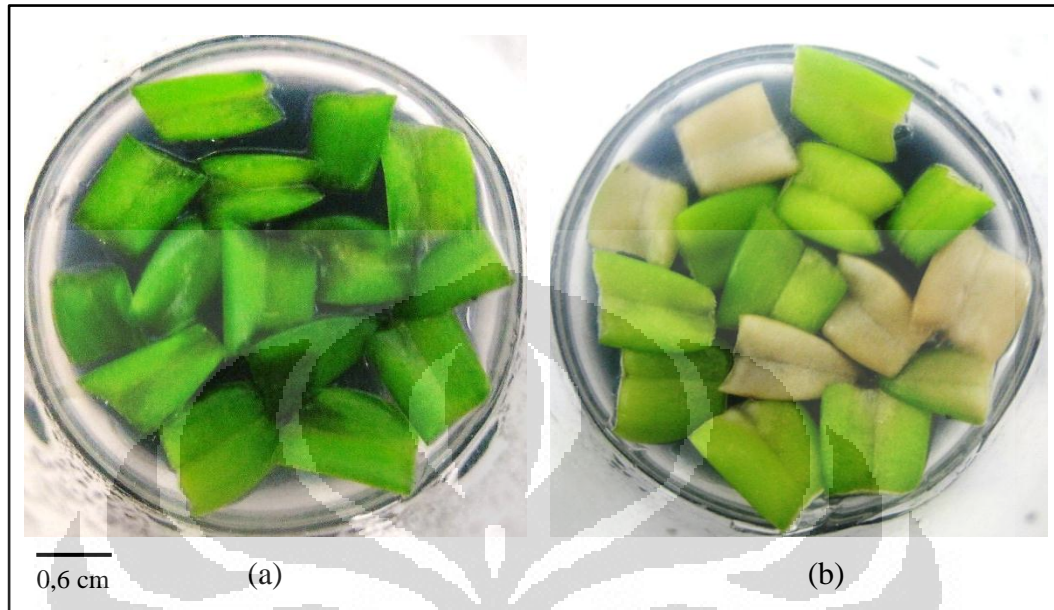
Keterangan: L = Langsung
 DA = Dipotong di dalam air
 DR = Direndam di dalam air
 K = Kontaminasi
 X = Nilai rata-rata
 SD = Standar deviasi

Lampiran 9
Perbandingan anatomi eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada hari ke-0 dan hari ke-51 setelah penanaman



- Keterangan:
- (i) = anatomi eksplan daun hari ke-0
 - (ii) = anatomi eksplan daun hari ke-51
 - a = epidermis atas
 - b = mesofil
 - c = jaringan pembuluh angkut
 - d = epidermis bawah

Lampiran 10
Perbandingan morfologi eksplan daun *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm pada hari ke-0 dan hari ke-51 setelah penanaman



Keterangan: (a) = morfologi eksplan daun hari ke-0
(b) = morfologi eksplan daun hari ke-51