

Combination of thidiazuron and basal media type on optimizing in vitro growth of *Grammatophyllum stapeliiflorum* orchids

Kombinasi thidiazuron dan jenis media dasar dalam optimalisasi in vitro pertumbuhan anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum*

Yuniati, Mayta Novaliza Isda*

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia

ARTICLE INFO

Article History

Received: Jan 16, 2023
Accepted: Dec 27, 2023
Available Online: March 30, 2024

Keywords:

Grammatophyllum stapeliiflorum,
growth regulation,
in vitro,
orchid conservation,
protocorm

Cite this:

J. Ilm. Pertan., 2024, 21 (1) 21-32
DOI:
<https://doi.org/10.31849/jip.v21i1.12829>

ABSTRACT

Grammatophyllum stapeliiflorum, recognized as the melancholic orchid, represents one of the elusive orchid species facing the brink of extinction, thus exacerbating its rarity. Tissue culture technology becomes imperative for the propagation of this orchid species. This study aims to scrutinize the influence of different concentrations of the synthetic growth regulator thidiazuron (TDZ) on distinct basal media types, Murashige Skoog (MS) and Vacin and Went (VW), on the in vitro growth of *G. stapeliiflorum* orchids. Employing a complete randomized factorial design, the study entails two research factors: TDZ concentration with 4 treatment levels, A0 = 0 mg/L, A1 = 0.25 mg/L, A2 = 0.50 mg/L, and A3 = 0.75 mg/L, and the second factor being the media type, B1 = ½ MS and B2 = ½ VW. Findings indicate significant effects of MS and VW media on the percentage of viable explants, browning, globular forms, and shoots. Interaction between TDZ concentration and media type didn't yield significant effects on each experimental parameter. Treatment with 0.25 and 0.50 mg/L TDZ on ½ VW media demonstrated optimal results for explant growth percentage, browning, and explants in the globular phase, at 97.33%, 2.67%, and 2.67%, respectively. Moreover, treatment with 0.75 mg/L TDZ on ½ VW media resulted in the highest percentage of explant coloration. The combination of TDZ and media has shown the potential to enhance the production efficiency and conservation of this rare orchid species through tissue culture technology.

ABSTRAK

Grammatophyllum stapeliiflorum dikenal sebagai anggrek sendu, salah satu jenis anggrek yang sulit ditemui dan hampir punah sehingga kelangkaannya terus meningkat. Teknologi kultur jaringan dibutuhkan dalam perbanyakan jenis anggrek ini. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh konsentrasi zat pengatur tumbuh sintetik Thidiazuron (TDZ) dengan jenis media dasar berbeda, yaitu media Murashige & Skoog (MS) dan Vacin and Went (VW), terhadap pertumbuhan anggrek *G. stapeliiflorum* secara in vitro. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan dua faktor penelitian, yaitu konsentrasi TDZ dengan 4 taraf perlakuan, A0 = 0 mg/L, A1 = 0.25 mg/L, A2 = 0.50 mg/L, dan A3 = 0.75 mg/L. Faktor kedua adalah jenis media, yaitu B1 = ½ MS dan B2 = ½ VW. Penelitian ini terdiri dari 8 perlakuan dan 5 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan media MS dan VW memberikan pengaruh nyata terhadap persentase eksplan hidup, *browning*, globular, dan tunas. Interaksi antara konsentrasi TDZ dan jenis media tidak memberikan pengaruh nyata pada setiap parameter percobaan. Perlakuan 0.25 dan 0.50 mg/L TDZ pada media ½ VW merupakan perlakuan terbaik untuk persentase pertumbuhan eksplan, *browning*, dan eksplan pada fase globular sebesar 97.33%, 2.67%, dan 2.67%. Sementara itu, perlakuan 0.75 mg/L TDZ pada media ½ VW merupakan perlakuan terbaik pada persentase warna eksplan. Kombinasi TDZ dan media telah menunjukkan potensi untuk meningkatkan efisiensi produksi dan konservasi anggrek yang langka ini melalui teknologi kultur jaringan.

*Corresponding author

E-mail: mayta.isda@lecturer.unri.ac.id

PENDAHULUAN

Anggrek merupakan tanaman yang memiliki keunikan. Menurut Agustina & Widowati (2015) keunikan anggrek ada pada bunganya yang memiliki warna, ukuran dan bentuk bervariasi. Markal et al. (2015) menyampaikan bahwa keunikan dari anggrek menyebabkan sebagian jenis anggrek menjadi langka akibat perburuan sehingga beberapa jenis anggrek sulit ditemukan di habitat aslinya. Salah satu anggrek yang sudah langka dan sulit ditemukan adalah genus *Grammatophyllum*. *Grammatophyllum* telah terdaftar sebagai spesies tanaman langka dan terancam punah oleh *Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES) yang menandakan kemungkinan genus ini punah jika perdagangan tidak dikendalikan (Sulong et al., 2016). Beberapa spesies anggrek yang termasuk genus *Grammatophyllum* adalah anggrek macan (*G. scriptum*), anggrek tebu (*G. speciosum*), dan anggrek sendu (*G. stapeliiflorum*).

Perbanyakan dengan metode kultur *in vitro* merupakan perbanyakan tanaman dengan waktu yang singkat dan berkualitas dalam menghasilkan tanaman (Markal et al., 2015). Perbanyakan anggrek dengan metode kultur *in vitro* dapat menggunakan protokorm dari perkecambahan biji anggrek sebagai sumber eksplan. Protokorm merupakan suatu struktur berbentuk bulat, berwarna kuning, hijau atau hijau kekuningan yang dihasilkan dari perkecambahan biji-biji anggrek (Dwiyani, 2015). Salah satu hal penting dalam keberhasilan metode kultur *in vitro* adalah jenis media. Menurut Tuhuteru et al. (2018), media merupakan faktor utama dalam keberhasilan perbanyakan secara kultur *in vitro* terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang dihasilkan. Perbanyakan tanaman anggrek melalui kultur *in vitro* selain dipengaruhi oleh media, juga dipengaruhi zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan. ZPT yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* adalah kelompok sitokinin. Salah satu jenis yang aktif dari sitokinin sintetik adalah thidiazuron (TDZ) yang berfungsi dalam pembentukan tunas dan morfogenesis (Rodinah et al., 2018). Menurut Prasiwi & Wardiyati (2018), TDZ merupakan salah satu sitokinin tipe *Phenylurea* sintetik yang memiliki kemampuan lebih baik dalam menginduksi tunas, dibandingkan dengan jenis sitokinin lainnya.

Penelitian mengenai perbanyakan *G. stapeliiflorum* secara *in vitro* masih sangat terbatas. Menurut penelitian Restiani et al. (2016), media $\frac{1}{2}$ Murashige & Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) media yang memiliki unsur makro dengan komposisi setengah, namun unsur mikro dan nutrisi lainnya memiliki komposisi penuh, merupakan media yang optimal dalam meningkatkan pertumbuhan biji anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) sebesar 98.41% pada fase 4 (protokorm dengan satu daun). Kecepatan pertumbuhan yang tinggi juga dijumpai pada medium VW yaitu sebesar 91.68 % dapat mencapai fase 4 (protokorm dengan satu daun). Menurut Rupawan et al. (2014), komposisi media VW yang ditambahkan 2 ppm giberelin sebagai ZPT, dan 250 mL air kelapa per liter media menunjukkan pertumbuhan anggrek bulan terbaik pada rata-rata tinggi planlet (1.82 cm), jumlah tunas (2.55 tunas), jumlah daun (2.00 helai) dan jumlah akar (2.25 helai).

Hasil penelitian Karyanti (2017) pada anggrek *Vanda douglas* dengan pemberian jenis sitokinin yaitu TDZ, *Benzylamino Purin* (BAP) dan kinetin (0, 0.5, 1, dan 1.5 mg/L) pada media $\frac{1}{2}$ MS memberikan hasil terbaik pada penambahan konsentrasi 0.5 mg/L TDZ terhadap pertumbuhan rata-rata tinggi tanaman (0.53 cm), jumlah tunas (8.00 tunas) dan jumlah daun (12.25 helai). Berdasarkan pemaparan tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang anggrek *G. stapeliiflorum* menggunakan eksplan protokorm melalui penambahan zat pengatur tumbuh sintetik TDZ dengan media $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{2}$ VW secara *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menganalisis pengaruh pemberian TDZ dan media berbeda serta interaksinya terhadap pertumbuhan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro* dan menentukan konsentrasi optimum TDZ pada jenis media yang berbeda untuk pertumbuhan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro*.

BAHAN & METODE

Bahan-bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah protokorm anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum* berumur 7 (tujuh) bulan yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Terpadu, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, media Murashige & Skoog (MS) instan (*Caisson Labs*), media Vacin & Went (VW) instan (*SNPlants*),

ZPT *Thidiazuron* (TDZ) instan (*phygenera*), arang aktif (*DEPHYTE AD123*, Germany), gula, air kelapa muda dan agar-agar kemasan.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial terdiri dua faktor. Faktor pertama adalah TDZ yang terdiri dari 4 taraf konsentrasi dan faktor kedua adalah media yang terdiri dari 2 taraf jenis media. Penelitian ini terdiri dari 8 perlakuan dan 5 ulangan, sehingga didapatkan 40 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdapat 15 protokorm fase globular. Adapun kombinasi perlakuan yang digunakan yaitu: 0 mg/L TDZ + 1/2 MS, 0.25 mg/L TDZ + 1/2 MS, 0.50 mg/L TDZ + 1/2 MS, 0.75 mg/L TDZ + 1/2 MS, 0 mg/L TDZ + 1/2 VW, 0.25 mg/L TDZ + 1/2 VW, 0.50 mg/L TDZ + 1/2 VW, 0.75 mg/L TDZ + 1/2 VW.

Tahapan pada penelitian ini yaitu persiapan alat dan bahan, sterilisasi alat, pembuatan media. Penanaman eksplan dan inkubasi selama 8 Minggu Setelah Tanam (MST) berdasarkan Ningrum & Isda (2022). Perlakuan selama inkubasi dilakukan dengan penyemprotan alkohol 70% ke botol kultur setiap 2 hari, dan suhu inkubasi diatur menjadi 20-25°C dengan peninaran dengan lampu fluoresens (TL) dengan intensitas 1000-2000 lux.

Pengamatan dilakukan selama 8 Minggu Setelah Tanam (MST). Parameter yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan Ningrum & Isda (2022) yaitu persentase eksplan hidup, protokorm *browning*, persentase tahap pertumbuhan protokorm (globular, hati, torpedo, dan tunas) dan persentase warna pada protokorm yang dianalisis menggunakan *Munsell Color Chart*. Data Analisis kuantitatif dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan program SPSS versi 24, dan apabila berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

HASIL & PEMBAHASAN

Persentase eksplan hidup pada anggrek Grammatophyllum stapeliiflorum

Respon pertumbuhan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* secara *in vitro* telah diamati selama 8 minggu setelah tanam (MST). Hasil ANOVA menunjukkan bahwa jenis media berpengaruh nyata, sedangkan berbagai taraf konsentrasi *Thidiazuron* (TDZ) dan interaksi antara konsentrasi TDZ dengan jenis media tidak pengaruh nyata terhadap persentase eksplan hidup. Persentase eksplan hidup pada eksplan protokorm anggrek sendu (*G. stapeliiflorum*) dengan penambahan zat pengatur tumbuh TDZ dan jenis media baik tunggal maupun kombinasi keduanya secara *in vitro*, diperoleh hasil pengamatan seperti yang terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi TDZ dan jenis media terhadap persentase eksplan hidup protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* pada 8 MST.

Konsentrasi TDZ (mg/L)	Jenis Media		Rerata (%)
	1/2 MS (%)	1/2 VW (%)	
Kontrol	77.33	92.00	84.67
0.25	90.67	97.33	94.00
0.50	86.67	97.33	92.00
0.75	81.33	94.67	88.00
Rerata (%)	84.00 ^a	95.33 ^b	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan berpengaruh nyata (P<0.05) pada uji DMRT taraf 5%.

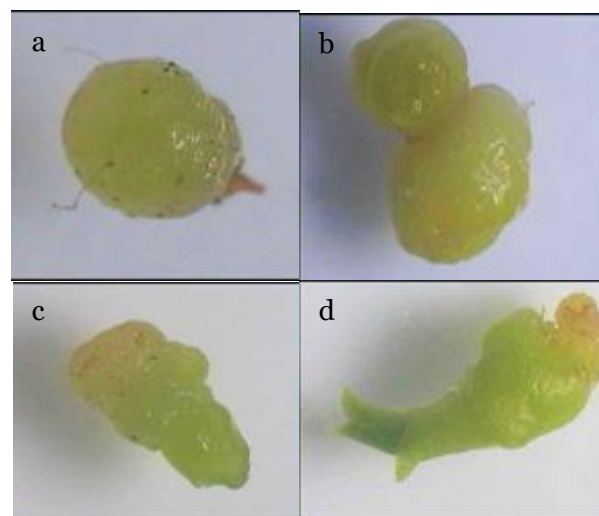
Berdasarkan Tabel 1 persentase eksplan hidup pada protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* kombinasi berbagai taraf konsentrasi TDZ dan jenis media menunjukkan hasil persentase eksplan hidup berkisar 77.33-97.33%. Persentase eksplan hidup ditandai dengan eksplan yang masih berwarna hijau dan tidak mengalami pencoklatan (*browning*) pada eksplan.

Perlakuan kontrol pada media 1/2 MS, menghasilkan persentase eksplan hidup terendah yaitu 77.33%. Persentase eksplan hidup tertinggi yaitu 97.33% yang terdapat pada perlakuan 0.25 mg/L TDZ dan 0.50 mg/L TDZ.

Tabel 1 hasil kombinasi pemberian TDZ pada media 1/2 VW mengalami peningkatan persentase eksplan hidup pada konsentrasi 0.25 mg/L dan 0.50 mg/L merupakan persentase tertinggi sebesar 97.33%, namun terjadi penurunan pada konsentrasi 0.75 mg/L TDZ sebesar 94.67%. Pemberian 0.75 mg/L TDZ memiliki persentase rendah dibandingkan 0.50 dan 0.25 mg/L pada media 1/2 MS yaitu 81.33%, namun memiliki kecenderungan lebih tinggi dari perlakuan kontrol yang merupakan persentase terendah yaitu 77.33%. Penambahan TDZ 0.25 mg/L memiliki persentase eksplan hidup lebih tinggi baik pada media 1/2 MS maupun media 1/2 VW. Hal ini diduga tingginya kandungan sitokinin dan unsur hara makro mikro pada media MS dalam media tanam. Hasil yang sama diperoleh Restanto et al. (2018) jumlah *protocorm like bodis* (PLBs) pada anggrek *Phaleonopsis* mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi TDZ sampai dengan 5 ppm sebanyak 12 pada media MS.

Pertumbuhan protokorm anggrek G. stapeliiflorum

Pengamatan dilakukan setelah 8 minggu setelah tanam (MST) secara langsung dengan melihat perubahan eksplan protokorm dari awal penanaman dalam bentuk globular. Parameter ini bertujuan untuk mengamati respon protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* terhadap perlakuan konsentrasi TDZ dan jenis media. Awal terbentuknya protokorm pada penelitian ini ditandai dengan bulatan kecil yang disebut globular. Globular membengkak membentuk hati. Ujung-ujung dari protokorm merekah membentuk torpedo. Pada tahapan torpedo akan terbentuk bakal tunas hingga membentuk tunas dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Proses pertumbuhan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* setelah perlakuan konsentrasi TDZ dan jenis media menggunakan mikroskop stereo (Microscope OLYMPUS SZX7) pada 8 MST mulai dari tahap a) Globular (1.6x10), b) Hati (1x10), c) Torpedo (0.8x10), d) Tunas (0.8x10).

Persentase eksplan fase globular

Inisiasi pada protokorm anggrek dimulai dari fase globular yaitu sel-sel berkumpul dan membentuk massa sel yang memiliki struktur bulat. Persentase eksplan fase globular pada penelitian ini dihitung untuk mengamati jumlah protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* yang merespon perlakuan konsentrasi dan jenis media. Hasil konsentrasi TDZ dan jenis media persentase pada fase globular dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase fase globular memberikan persentase berbeda setiap perlakuan berkisar 2.6-45.14%. Pada Tabel 2 hasil interaksi antara konsentrasi TDZ dan jenis media menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi kontrol pada media 1/2 MS merupakan persentase tertinggi yaitu 45.14% dibandingkan perlakuan 0.25 mg/L dan 0.50 mg/L TDZ dengan media 1/2 VW yang merupakan

persentase terendah yaitu 2.67%. Pada Tabel 2 dapat dilihat perlakuan konsentrasi TDZ dengan media 1/2 MS memiliki persentase eksplan fase globular lebih tinggi dibandingkan konsentrasi TDZ pada media 1/2 VW. Menurut Maulidina (2020), media kultur *in vitro* yang ditambahkan zat pengatur tumbuh, vitamin, atau asam amino tertentu dapat meningkatkan pertumbuhan sel dan diferensiasi tanaman, sehingga pertumbuhan tanaman menjadi maksimal. Setiap eksplan memiliki respon yang berbeda terhadap jenis media dan zat pengatur tumbuh yang digunakan.

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi TDZ dan jenis media terhadap persentase eksplan fase globular protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* pada 8 MST.

Konsentrasi TDZ (mg/L)	Jenis media		Rerata (%)
	1/2 MS (B1) (%)	1/2 VW (B2) (%)	
Kontrol (A0)	25.33	20.00	22.67
0.25 (A1)	21.33	16.00	18.67
0.50 (A2)	25.33	10.67	18.00
0.75 (A3)	34.67	28.0	31.34
Rerata (%)	26.67 ^b	18.67 ^a	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berpengaruh nyata (P<0.05) pada uji DMRT taraf 5%.

Pada perlakuan pemberian konsentrasi TDZ 0.50 mg/L dengan media 1/2 MS memiliki persentase lebih tinggi dibandingkan konsentrasi 0.75 dan 0.25 mg/L pada media 1/2 MS. Tingginya persentase fase globular diduga sebagian dari eksplan yang ditanam tidak merespon dari perlakuan yang diberikan, sehingga protokorm tidak mengalami pertumbuhan ke tahapan selanjutnya. Hal ini juga dapat disebabkan oleh adanya eksplan *browning* sehingga pertumbuhannya terhambat dan tetap berada pada tahapan globular. Seharusnya dari fase globular pada eksplan akan membentuk fase berikutnya yaitu fase hati. Sebagaimana pernyataan oleh Yan et al. (2020) bahwa Fase globular awalnya dimulai terbentuknya bulatan yang khas pada eksplan, bewarna putih kekuningan. Sel-sel ini akan mengalami terus menerus pembelahan dan akan muncul kotiledon primordia. Sel-sel akan membelah secara bertahap membentuk embrio membentuk hati.

Perlakuan kontrol pada media 1/2 VW memiliki hasil yang sama pada perlakuan pemberian TDZ dengan konsentrasi 0.75 mg/L yaitu 10.67%. Pada parameter persentase protokorm fase globular perlakuan 0.25 dan 0.50 mg/L dengan media 1/2 VW merupakan hasil terbaik. Semakin sedikit persentase protokorm dalam bentuk globular semakin baik dikarenakan protokorm sudah mengalami pertumbuhan ke tahapan berikutnya. Menurut Lestari (2011) penambahan sitokinin ke dalam media dapat meningkatkan hormon endogen di dalam sel, sehingga dapat memicu proses pertumbuhan jaringan.

Tabel 3. Pengaruh konsentrasi TDZ dan jenis media terhadap persentase eksplan fase hati protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* pada 8 MST.

Konsentrasi TDZ (mg/L)	Jenis media		Rerata (%)
	1/2 MS (B1) (%)	1/2 VW (B2) (%)	
Kontrol (A0)	25.33	20.00	22.67
0.25 (A1)	21.33	16.00	18.67
0.50 (A2)	25.33	10.67	18.00
0.75 (A3)	34.67	28.0	31.34
Rerata (%)	26.67	18.67	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berpengaruh nyata (P<0.05) pada uji DMRT taraf 5%.

Persentase eksplan fase hati

Persentase Fase hati pada eksplan dilihat pada akhir pengamatan yaitu 8 MST. Pengaruh jenis media dan konsentrasi TDZ terhadap persentase fase hati anggrek *G. stapeliiflorum* dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil ANOVA menunjukkan perlakuan konsentrasi TDZ dan jenis media tidak berpengaruh nyata. Hasil menunjukkan bahwa pertumbuhan pada tahap fase hati memberikan persentase berbeda setiap perlakuan berkisar 10.67-34.67%. Berdasarkan Tabel 3. interaksi antara konsentrasi TDZ dan jenis media menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi 0.75 mg/L TDZ + 1/2 MS merupakan persentase tertinggi yaitu 34.67% dibandingkan perlakuan 0.50 mg/L TDZ + 1/2 VW yang merupakan persentase terendah yaitu 10.67%. Perlakuan konsentrasi 0.75 mg/L memiliki persentase lebih tinggi dibandingkan kontrol (A0) dengan media 1/2 MS dan 1/2 VW. Pada penelitian ini konsentrasi TDZ 0.75 mg/L terlalu tinggi sehingga dapat menghambat pertumbuhan protokorm. Hal ini sejalan dengan Nurmaningrum et al. (2017) yang menyatakan bahwa konsentrasi TDZ yang tinggi dapat memicu tingginya produksi etilan sehingga menghambat pertumbuhan.

Persentase eksplan fase torpedo

Persentase fase torpedo pada eksplan dilihat pada akhir pengamatan yaitu 8 MST. Pengaruh jenis media dan konsentrasi TDZ terhadap persentase fase torpedo anggrek *G. stapeliiflorum* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh konsentrasi TDZ dan jenis media terhadap persentase eksplan fase torpedo protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* pada 8 MST.

Konsentrasi TDZ (mg/L)	Jenis media		Rerata (%)
	1/2 MS (B1) (%)	1/2 VW (B2) (%)	
Kontrol (A0)	23.99	46.67	35.33
0.25 (A1)	50.67	54.67	52.67
0.50 (A2)	42.67	50.67	46.67
0.75 (A3)	34.67	49.33	42.00
Rerata (%)	38.00	50.34	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berpengaruh nyata ($P < 0.05$) pada uji DMRT taraf 5%.

Hasil ANOVA menunjukkan perlakuan konsentrasi TDZ dan jenis media tidak berpengaruh nyata. Hasil menunjukkan bahwa pertumbuhan pada tahap fase torpedo memberikan persentase berbeda setiap perlakuan berkisar 23.99-54.67%. Berdasarkan Tabel 4 interaksi antara konsentrasi TDZ dan jenis media menunjukkan bahwa Perlakuan 0.25 mg/L TDZ + 1/2 VW merupakan persentase tertinggi yaitu 54.67% dibandingkan perlakuan kontrol pada media 1/2 MS (A0B1) yang merupakan persentase terendah yaitu 23.99%. Pada pemberian konsentrasi TDZ pada media 1/2 VW memiliki persentase yang tinggi dibandingkan kontrol pada media 1/2 VW. Hal ini diduga dengan penggunaan media VW merupakan media yang tepat bagi pertumbuhan anggrek *G. stapeliiflorum*. Menurut Silalahi & Marina (2015) bahwa media 1/2 VW memiliki komposisi fosfat lebih tinggi yang berfungsi sebagai aktifator enzim sehingga meningkatkan pertumbuhan jaringan meristem.

Persentase eksplan fase tunas

Persentase fase tunas pada eksplan dilihat pada akhir pengamatan yaitu 8 MST. Pengaruh jenis media dan konsentrasi TDZ terhadap persentase fase tunas anggrek *G. stapeliiflorum*. Hasil konsentrasi TDZ dan jenis media persentase fase globular dapat dilihat pada Tabel 5. Persentase eksplan fase tunas pada anggrek *G. stapeliiflorum* pada berbagai taraf konsentrasi TDZ dan jenis media. Pada Tabel 5 hasil interaksi antara persentase eksplan fase tunas pada anggrek *G. stapeliiflorum* pada berbagai taraf konsentrasi TDZ dan jenis media. Hasil menunjukkan bahwa pertumbuhan pada tahap fase tunas memberikan persentase berbeda setiap perlakuan berkisar 5.33-36.00%. Hasil interaksi antara konsentrasi TDZ dan jenis media menunjukkan bahwa perlakuan kontrol pada media 1/2 MS menghasilkan persentase terendah pada fase tunas yaitu






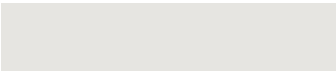
5.33% sedangkan perlakuan 0.50 mg/L pada media 1/2 VW merupakan persentase tertinggi yaitu 36.00%. Diduga media 1/2 VW memiliki respon yang baik pada konsentrasi TDZ 0.5 mg/L terhadap pertumbuhan tunas anggrek *G. stapeliiflorum*.

Tabel 5. Pengaruh konsentrasi TDZ dan jenis media terhadap persentase eksplan fase tunas protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* pada 8 MST.

Konsentrasi TDZ (mg/L)	Jenis media		Rerata (%)
	1/2 MS (B1) (%)	1/2 VW (B2) (%)	
Kontrol (A0)	5.33	22.67	14.00
0.25 (A1)	10.67	26.67	18.67
0.50 (A2)	8.00	36.00	22.00
0.75 (A3)	9.33	12.00	10.67
Rerata (%)	8.33 ^a	24.33 ^b	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berpengaruh nyata ($P < 0.05$) pada uji DMRT taraf 5%.

Tabel 6. Warna eksplan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* berdasarkan Munsell Color Chart.

Gambar	Visual Warna	Munsell Color Chart
		5GY 4/3
		10Y 6/3
		N9

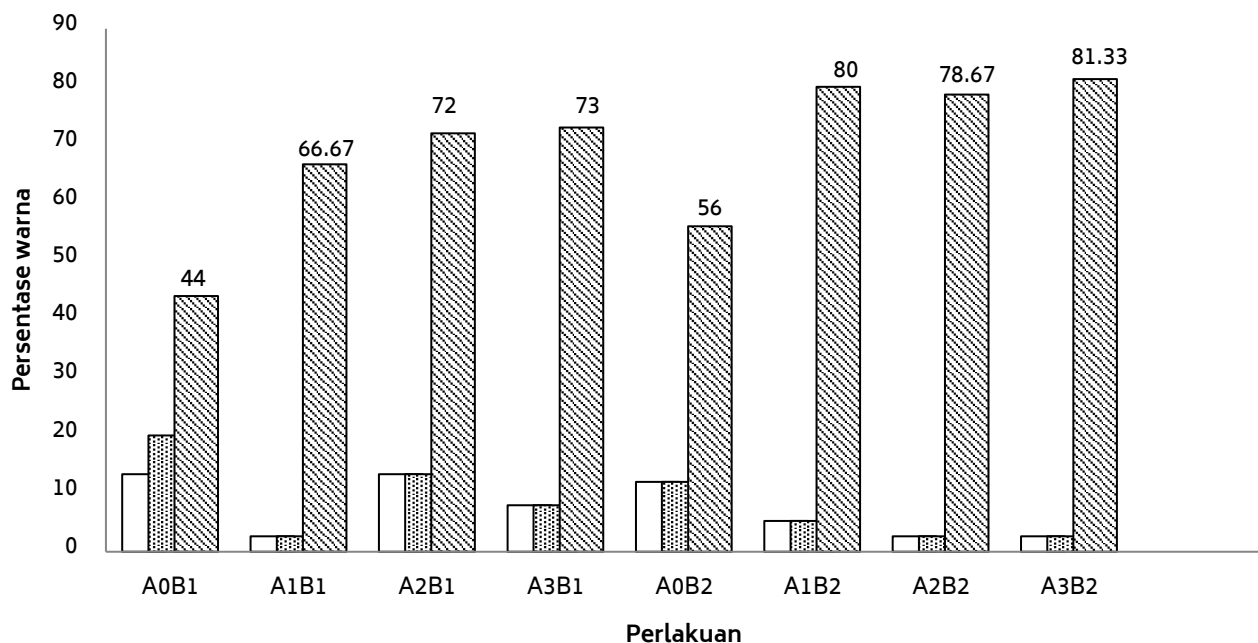
Pada perlakuan A0B1 (kontrol TDZ + 1/2 MS), menghasilkan persentase tunas paling sedikit yaitu 5.33%. Hal ini diduga karena nutrisi dan unsur hara pada media MS memiliki komposisi yang kompleks, dan kandungan ZPT endogen pada eksplan anggrek *G. stapeliiflorum* belum seimbang sehingga belum mampu memicu pembentukan tunas pada akhir pengamatan. Hal ini sesuai dengan Pranata et al. (2015) pemberian ZPT pada eksplan harus seimbang antara ZPT endogen dan ZPT yang ada pada media (eksogen).

Berdasarkan Tabel 5 diperoleh hasil bahwa data interaksi konsentrasi TDZ dengan jenis media dan data tunggal persentase fase tunas paling rendah pada konsentrasi 0.75 mg/L. Persentase tertinggi pada perlakuan 0.50 mg/L. Hal ini diduga bahwa konsentrasi 0.50 mg/L merupakan konsentrasi yang tepat dan dapat memicu pertumbuhan protokorm

hingga fase tunas pada anggrek *G. stapeliiflorum*. Hasil pada penelitian ini sejalan dengan penelitian Karyanti (2017) bahwa jumlah tunas pada anggrek *Vanda douglas* terhadap perlakuan TDZ 0.50 mg/L pada 8 MST menunjukkan jumlah rerata tertinggi yaitu 3.6 (tunas). Menurut Guo et al. (2011), konsentrasi zat pengatur tumbuh TDZ yang tepat pada beberapa tanaman dapat memicu pertumbuhan tunas. Proses eksplan berdiferensiasi tidak hanya dipengaruhi oleh hormon endogen, namun juga dapat dipengaruhi oleh hormon eksogen (Yuniati et al., 2018). Pada penelitian ini konsentrasi TDZ 0.75 mg/L terlalu tinggi sehingga dapat menghambat pertumbuhan fase tunas menurut Nurmaningrum et al. (2017) konsentrasi TDZ yang tinggi dapat memicu tingginya produksi etilen sehingga menghambat pertumbuhan tunas.

Morfologi warna pada eksplan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum*

Warna eksplan pada penelitian dianalisis menggunakan *Munsell Color Chart* yang memiliki kategori warna 5GY 4/3 (hijau, value 4 dan chroma 3) 10Y 6/3 (kuning hijau, value 6 dan chroma 3) dan N9 (putih/netral) warna eksplan yang diamati menggunakan *Munsell Color Chart* dapat dilihat pada Tabel 6. Persentase warna pada eksplan dilihat pada akhir pengamatan yaitu 8 MST. Pengaruh jenis media dan konsentrasi TDZ terhadap warna pada anggrek *G. stapeliiflorum* dapat dilihat pada Gambar 2.



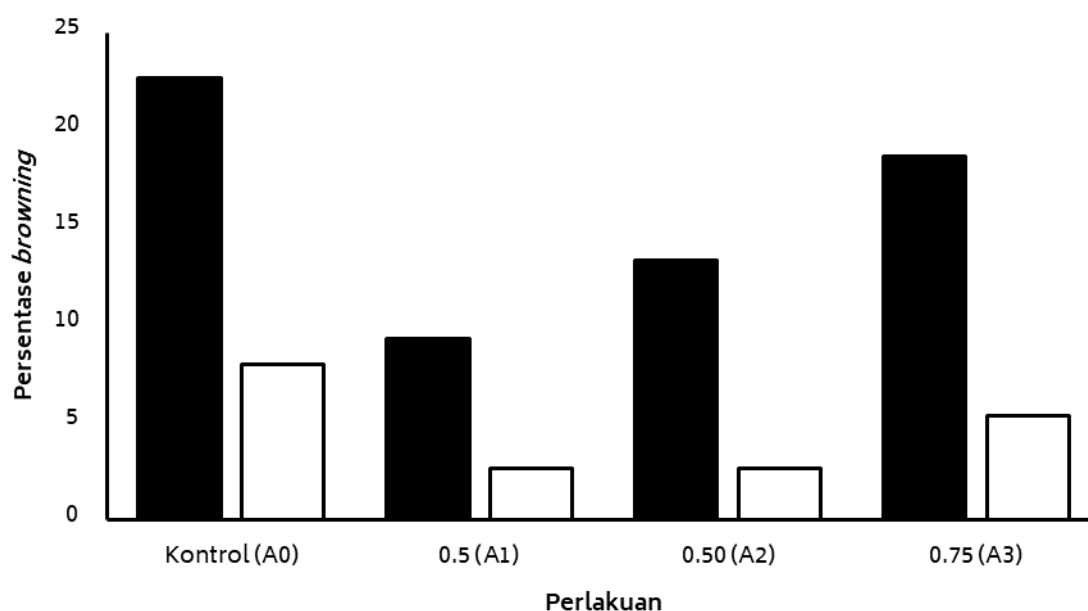
Gambar 2. Diagram dari pengaruh konsentrasi TDZ dan jenis media terhadap persentase warna eksplan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* pada 8 MTS, □: Putih, ▒: Kuning Kehijauan, ▨: Hijau

Berdasarkan Gambar 2 dapat diamati pada parameter warna eksplan menunjukkan bahwa interaksi pemberian konsentrasi TDZ dengan jenis media berbeda akan menghasilkan warna eksplan yang berbeda-beda. Warna eksplan pada penelitian ini bervariasi yaitu putih, kuning kehijauan dan hijau. Warna eksplan yang dominan pada penelitian ini adalah eksplan berwarna hijau. Persentase eksplan yang memiliki warna hijau tertinggi terdapat pada perlakuan interaksi 0.75 mg/l TDZ dengan media 1/2 VW. Warna pada eksplan menunjukkan adanya klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna eksplan maka semakin banyak kandungan klorofil. Menurut Syammiah (2006) perbedaan warna yang dihasilkan pada protokorm berhubungan dengan aktivitas penyerapan nutrisi pada media tanam. Media yang digunakan seperti MS, VW dan zat pengatur tumbuh merupakan sumber nutrisi bagi protokorm dalam pembentukan klorofil. Ningrum & Isda (2022), menambahkan bahwa protokorm warna hijau mempunyai ukuran yang lebih besar dibandingkan perlakuan kontrol, yang berarti protokorm kaya akan nutrisi.

Pada Gambar 2 diamati perlakuan kontrol pada media $\frac{1}{2}$ MS memiliki persentase paling rendah pada warna hijau sebesar 44.00% dan diikuti pada perlakuan kontrol pada media $\frac{1}{2}$ VW sebesar 56.00%. Hal ini diduga kandungan unsur hara pada media MS dan VW tidak dapat meningkatkan kandungan klorofil pada eksplan. Kandungan media MS memiliki potasium yang tinggi, tingginya potasium dapat menyebabkan unsur Mg defisiensi sedangkan media VW memiliki kadar Mg yang sedikit. Menurut Wirawan et al. (2016) magnesium merupakan salah satu unsur logam yang memiliki peran dalam menyusun molekul klorofil. Kegagalan sintesis klorofil salah satu penyebabnya kekurangan unsur Mg.

Pada perlakuan interaksi 0.75 mg/L TDZ dengan media $\frac{1}{2}$ VW menghasilkan eksplan berwarna putih, hijau kekuningan dan hijau dengan persentase 81.33% hijau, 9.33% hijau kekuningan dan 2.67% berwarna putih. Pada penelitian ini Semakin tinggi konsentrasi TDZ cenderung meningkatkan klorofil. *Thidiazuron* merupakan salah satu hormon sitokinin. Pemberian TDZ pada media akan meningkatkan kandungan klorofil pada tanaman. Warna hijau pada eksplan terbentuk karena adanya klorofil akibat penambahan sitokinin. Menurut Wicaksono et al. (2017), sitokinin berperan dalam menunda penuaan pada tanaman. Peningkatan kandungan klorofil dapat terjadi karena peran sitokinin dalam menghambat penuaan. Penuaan yang ditunda tersebut mempertahankan jumlah klorofil tanaman dan pada akhirnya akan meningkatkan hasil fotosintesis.

Warna eksplan berwarna kuning kehijauan terdapat pada semua perlakuan dengan kisaran persentase 4.00-21.33%. Menurut Pratama & Nilahayati (2018), warna hijau pada eksplan dihasilkan dari kombinasi pigmen klorofil a dan klorofil b warna yang dihasilkan warna hijau pada eksplan, warna hijau kekuningan cenderung lebih banyak karotenoid sehingga eksplan berwarna hijau kekuningan. Warna eksplan berwarna putih terdapat pada setiap perlakuan, tetapi persentase tertinggi pada perlakuan kontrol dan 0.50 mg/L pada media $\frac{1}{2}$ MS yaitu 13.33%. Eksplan berwarna putih banyak terdapat pada fase globular yang menandakan eksplan lambat berkembang atau tidak berkembang. Terdapat beberapa eksplan mengalami vitrifikasi eksplan tampak berwarna putih transparan. Menurut Basri (2016) terjadinya vitrifikasi akibat tingginya kelembaban pada botol kultur membuat tanaman rapuh dan mudah patah. Hal ini didukung oleh Fitriani (2008) menyatakan bahwa salah satu penyebab terjadinya vitrifikasi yaitu tingginya kandungan ion amonium. Hal ini diduga tingginya kandungan amonium pada media MS menyebabkan tingginya vitrifikasi pada eksplan.



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi TDZ dan jenis media terhadap persentase eksplan *browning* protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* pada 8 MST untuk $\frac{1}{2}$ MS (B1) (■) dan $\frac{1}{2}$ VW (B2) (□)

Persentase eksplan *browning*

Browning pada eksplan dilihat dari pencoklatan yang terjadi pada protokorm *G. stapeliiflorum*. *Browning* dihitung untuk memperkirakan banyaknya dari protokorm yang dapat tumbuh dan berkembang ke tahapan selanjutnya. Eksplan yang

mengalami *browning* akan mengakibatkan pertumbuhan protokorm terhambat dan hanya dapat bertahan pada tahap globular. Pengaruh pemberian perlakuan pada eksplan protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* terhadap persentase protokorm *browning* (pencoklatan) setelah 8 MST. Hasil ANOVA perlakuan jenis media berpengaruh nyata, sedangkan konsentrasi TDZ dan interaksi konsentrasi dengan jenis media tidak berpengaruh nyata terhadap persentase *browning*. Perlakuan konsentrasi TDZ dengan jenis media dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3 persentase eksplan *browning* pada protokorm anggrek *G. stapeliiflorum* pada berbagai taraf konsentrasi TDZ dan jenis media baik perlakuan tunggal maupun interaksi didapatkan hasil bahwa penambahan TDZ pada media berbeda memberikan pengaruh terhadap persentase *browning*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase *browning* pada eksplan berkisar 2.67-22.67%. Pada hasil penelitian dapat diamati bahwa perlakuan kontrol pada media 1/2 MS menghasilkan persentase *browning* paling tinggi yaitu 22.67%. Hal ini diduga unsur hara yang kompleks pada media 1/2 MS dan terjadinya pelukaan pada eksplan sehingga menyebabkan eksplan menjadi *browning*. Menurut Lestari et al. (2018) salah satu penyebab *browning* pada eksplan adalah luka, luka memicu stres dan menyebabkan peningkatan aktivitas enzim *fenilalanin amonia liase* (PAL), diikuti dengan produksi *fenilpropanoid* dan menyebabkan terjadinya pencoklatan.

Eksplan yang mengalami *browning* berpengaruh nyata terhadap kedua media namun pada media 1/2 MS mengalami *browning* paling tinggi dibanding 1/2 VW. Perlakuan tunggal jenis media menunjukkan media 1/2 VW memiliki persentase *browning* lebih rendah yaitu 4.67% daripada media 1/2 MS yaitu 16.00%. Hal ini diduga kadar unsur hara pada media VW lebih optimal pada anggrek *G. stapeliiflorum* salah satunya magnesium. Magnesium merupakan salah satu antioksidan menurut Kurniasari et al., (2018) adanya kandungan antioksidan mampu menangkap radikal bebas ketika terjadi pelukaan pada eksplan sehingga mencegah terjadinya oksidasi maka dapat mengurangi dan menghambat *browning*.

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini, kami menginvestigasi pengaruh kombinasi antara konsentrasi thidiazuron (TDZ) dan jenis media dasar terhadap pertumbuhan *in vitro* pada anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada interaksi signifikan antara konsentrasi TDZ dan jenis media pada parameter eksperimental yang diamati. Namun demikian, kami menemukan bahwa penerapan konsentrasi TDZ tertentu pada media basal 1/2 VW dapat meningkatkan persentase eksplan hidup, mengurangi tingkat *browning*, dan memfasilitasi pertumbuhan tunas. Temuan ini memiliki implikasi penting dalam meningkatkan efisiensi produksi dan konservasi anggrek langka ini melalui teknologi kultur jaringan. Meskipun demikian, perlu diakui bahwa penelitian ini memiliki keterbatasan, seperti batasan dalam penggunaan faktor-faktor lain yang mungkin memengaruhi pertumbuhan anggrek. Sebagai arah untuk penelitian mendatang, disarankan untuk mempertimbangkan faktor-faktor tambahan yang dapat memperkaya pemahaman tentang mekanisme pertumbuhan anggrek dan mengeksplorasi lebih lanjut strategi untuk meningkatkan efisiensi produksi dan konservasi anggrek *Grammatophyllum stapeliiflorum*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih terhadap pihak *Advanced Knowledge and Skills For Sustainable Growth In Indonesia* (AKSI) *Project Asian Development Bank* (ADB) Universitas Riau yang membantu dalam memberikan anggaran melalui Program Riset Penelitian Mahasiswa Tahun Anggaran 2022.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, D., Widowati H. (2015). Inventarisasi kenanekaragaman anggrek (Orchidaceae) di hutan resort way kanan balai aman nasional way kambas sebagai sumber informasi dalam melastarkan plasma nutfah. *Bioedukasi*, 6(1), 38-46. <https://doi.org/10.24127/bioedukasi.v6i1.156>
- Basri, A. H. H. (2016). Kajian pemanfaatan kultur jaringan dalam perbanyakan tanaman bebas virus. *Agrica Ekstensi*, 10(1), 64-73. <https://www.polbangtanmedan.ac.id/pdf/jurnal%202016/Vol%2010%20No%201%2008%20Arie.pdf>

- Dwiyani, R. (2015). *Kultur jaringan tanaman*. Pelawa Sari. Denpasar. https://simdos.unud.ac.id/uploads/file_penelitian_1_dir/127d33b953fcbc98107a8b381e77d5b9.pdf
- Fitriani H. (2008). Kajian konsentrasi BAP dan NAA terhadap multiplikasi tanaman *Artemisia annua* L. secara In vitro. [skripsi]. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. <https://digilib.uns.ac.id/dokumen/download/7705/MjAyMDQ=/Kajian-konsentrasi-BAP-dan-NAA-terhadap-multiplikasi-tanaman-artemisia-annua-L-secara-in-vitro-abstrak.pdf>
- Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L., & Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 8984-9000. <https://doi.org/10.5897/AJB11.636>
- Karyanti, K. (2017). Pengaruh beberapa jenis sitokinin pada multiplikasi tunas anggrek Vanda douglas secara in vitro. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 4(1), 36-43. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v4i1.2200>
- Kurniasari, D., Mercuriani, I. S. (2018). Peningkatan pembentukan kalus *Rhynchosytilis retusa* melalui perendaman eksplan daun dalam vitamin c dan penambahan arang aktif pada media kultur In Vitro. *Jurnal Prodi Biologi*, 4(4), 255-261. <https://doi.org/10.21831/kingdom.v7i4.12760>
- Lestari, N. K. D., Deswiniyanti, N. W., Astarini, I. A., & Arpiwi, L. M. (2018). Pencegahan browning pada eksplan in vitro untuk perbanyak tanaman lilium longiflorum. *Prosiding Seminar Ilmiah Nasional Teknologi, Sains, dan Sosial Humaniora (SINTESA), Bali*, 1(1), 353-365. <https://jurnal.undhirabali.ac.id/index.php/sintesa/article/view/503>
- Lestari, E. G. (2011). Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyak tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 1(1), 63-68. <https://doi.org/10.21082/jbio.v7n1.2011.p63-68>
- Markal, A., Isda, M. N., & Fatonah, S. (2015). Perbanyak anggrek *grammatophyllum scriptum* (Lindl.) BL. melalui induksi tunas secara in vitro dengan penambahan BAP dan NAA. *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 1(1), 108-114. <https://jom.unri.ac.id/index.php/JOMFMIPA/article/view/4479>
- Maulidina, R. N. (2020). Pengaruh pemberian thidiazuron (tdz) dan hidrolisat kasein terhadap multiplikasi subkultur tunas porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) [skripsi]. Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Islam Negro Maulana Malik Ibrahim. Malang. <http://etheses.uin-malang.ac.id/24071/>
- Ningrum, F. E., & Isda, M. N. (2022). Pemberian air rebusan kentang pada media Murashige-Skoog terhadap pertumbuhan protokorm anggrek sendu (*Grammatophyllum stapeliiflorum*) secara in vitro. *Jurnal Ilmiah Pertanian*, 19(1), 19-28. <https://doi.org/10.31849/jip.v19i1.8514>
- Nurmaningrum, D., Nurchayati, Y., & Setiari, N. (2017). Mikropropagasi tunas alfalfa (*Medicago sativa* L.) pada kombinasi benzil amino purin (BAP) dan thidiazuron (TDZ). *Buletin Anatomi dan Fisiologi (Bulletin Anatomy and Physiology)*, 2(2), 211-217. <https://doi.org/10.14710/baf.2.2.2017.211-217>
- Pranata, M. G., Yunus, A., & Pujiasmanto, B. (2015). Pengaruh konsentrasi naa dan air kelapa terhadap multiplikasi temulawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb.*) secara in vitro. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*, 30(2), 62-68. <https://doi.org/10.20961/carakatani.v30i2.11890>
- Pratama, J., & Nilahayati, N. (2018). Modifikasi media ms dengan penambahan air kelapa untuk subkultur I anggrek *Cymbidium*. *Jurnal Agrium*, 15(2), 96-109. <https://doi.org/10.29103/agrium.v15i2.1071>
- Prasiwi, I. D., & Wardiyati, T. (2018). Pengaruh pemberian thidiazuron (TDZ) terhadap pertumbuhan tunas nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv.'Smooth Cayyene' asal mahkota buah. *Jurnal Produksi Tanaman*, 6(1), 9-15. <http://protan.studentjournal.ub.ac.id/index.php/protan/article/view/609>
- Restanto, D. P., Kriswanto, B., Khozim, M. N., & Soeparjono, S. (2018). Kajian thidiazuron (TDZ) dalam induksi Plb anggrek *Phalaenopsis* Sp Secara In Vitro. *Agrotrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*, 16(1), 176-185. <https://doi.org/10.32528/agr.v16i1.1561>
- Restiani, R., Semiarti, E., & Indrianto, A. (2016). Konservasi anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) melalui mikropropagasi pada berbagai medium kultur. *Prosiding Simposium Nasional Pendidikan Biologi (Symbion 2016)*, 27, 393-404. http://symbion.pbio.uad.ac.id/prosiding/prosiding/ID_320-Ratih%20Restiani-Revisi_Hal%20393-404.pdf

- Rodinah, R., Hardarani, H., Ariani, H. D. (2018). Modifikasi media dan periode subkultur pada kultur jaringan pisang talas (*Musa paradisiaca* VAR. SAPIENTUM L.). *Jurnal Hexagro*, 2(2), 1–6. <https://doi.org/10.36423/hexagro.v2i2.129>
- Rupawan, I. M., Basri, Z., & Bustami, M. (2014). Pertumbuhan anggrek vanda (*Vanda* sp) pada berbagai komposisi media secara in vitro. *Agrotekbis*, 2(5), 488–494.
- Silalahi & Marina. (2015). *Bahan Ajar Kultur Jaringan*. Univesitas Kristen Indonesia Press. <http://repository.uki.ac.id/194/>
- Sulong, N. A., Khalil, N. I. M., Dahari, M. I., & Zakaria, A. A. (2016). Effect of different sound genres on in vitro seed germination of *Grammatophyllum* hybrid and *Grammatophyllum stapeliiflorum* orchids. *The Open Conference Proceedings Journal*, 7(1), 94–103. <https://doi.org/10.2174/2210289201607010094>
- Syamiah. (2006). Jenis senyawa organik suplemen pada medium Knudson C untuk pertumbuhan protokorm like bodies *Dendrobium bertacong* Blue x *Dendrobium undulatum*. *J. Floratek*, 2, 86-92. <https://jurnal.usk.ac.id/floratek/article/view/97>
- Tuhuteru, S., Hehanussa, M. L., & Raharjo, S. H. (2018). Pertumbuhan dan perkembangan anggrek *Dendrobium anosmum* pada media kultur in vitro dengan beberapa konsentrasi air kelapa. *Agrologia*, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.30598/a.v1i1.293>
- Wicaksono, F. Y., Putri, A. F., Yuwariah, Y., Maxiselly, Y., & Nurmala, T. (2017). Respons tanaman gandum akibat pemberian sitokinin berbagai konsentrasi dan waktu aplikasi di dataran medium Jatiningor. *Kultivasi*, 16(2), 349-355. <https://doi.org/10.24198/kultivasi.v16i2.13805>
- Wirawan, B. D. S., Putra, E. T. S., & Yudono, P. (2016). Pengaruh pemberian magnesium, boron dan silikon terhadap aktivitas fisiologis, kekuatan struktural jaringan buah dan hasil pisang (*Musa acuminata*) raja bulu. *Vegetalika*, 5(4), 1-14. <https://doi.org/10.22146/veg.25675>
- Yan, R., Wang, C., Wang, J., Nie, R & Sun, H. (2020). High-efficiency somatic embryogenesis techniques for different hybrids of cut lilies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(1), 145-157. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-020-01904-4>
- Yuniati, F., Haryanti, S., & Prihastanti, E. (2018). Pengaruh hormon dan ukuran eksplan terhadap pertumbuhan mata tunas tanaman pisang (*Musa paradisiaca* var. Raja Bulu) secara in vitro. *Buletin Anatomi dan Fisiologi (Bulletin Anatomy and Physiology)*, 3(1), 20-28. <https://doi.org/10.14710/baf.3.1.2018.20-28>