

## Penambahan IAA dan BAP terhadap Pertumbuhan Kalus Eksplan Daun Anggrek *Coelogyne pandurata* Lindl

Johanes De Britto, Kamsinah, Lucky Prayoga

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman  
Jalan dr. Soeparno 63 Purwokerto 53122  
Email: [johanesdebritto19@gmail.com](mailto:johanesdebritto19@gmail.com)

### Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 27/05/2021  
Disetujui : 06/04/2022

### Abstract

Orchid *Coelogyne pandurata* Lindl or black orchid is one of the endemic orchid from borneo Island. This orchid flower who have an unique that is have a green cephal and black labellum. Naturally propagation have a small chance of success so it needs to be done culture in vitro. One of the culture ways is use explained leaf for making callus's growth. Callus growth can spurred on with auxin (IAA) and cytokinins (BAP). A balanced blend of auxin concentration and cytokinins are expected can touch callus growth up. The purpose of this research is to know addition effect of IAA and BAP for Orchid *C. pandurata* Lindl's growth and know interaction the best IAA and BAP for Orchid *C. pandurata* Lindl's growth. The method of research done by experiment with the completely randomized used factorial pattern. Factor 1 concentration IAA with 4 level : 0, 1, 2, 3 mg/L. and the next factor, concentration of BAP with 4 level : 0, 1, 2, 3 mg/L, so there are 48 experimental units. Observed parameter is: when the callus appears, the data obtained in the analysis with ANOVA and carried out DMRT test with believeable level 95%. The result of the research showed giving interaction of IAA and BAP can give a affect callus growth of Orchid *C. pandurata* Lindl. The interaction effect is on the callus appearance, callus thickness, and callus live percentage. As well as being able to spur the development of callus in a proliferative direction. While giving IAA personally could stimulate callus thickening. The best interaction in callus's growth explain the orchid flower is A2B2 (IAA 2 mg/L and BAP 2 mg/L) and A2B3 (IAA 2 mg/L and BAP 3 mg/L).

**Key words:** BAP, Callus Growth, *Coelogyne pandurata*, IAA

### Abstrak

Anggrek *Coelogyne pandurata* Lindl atau anggrek hitam merupakan anggrek endemik dari Kalimantan. Anggrek tersebut mempunyai keunikan yakni sepal berwarna hijau dan labelum yang berwarna hitam. Perbanyakannya secara alami tingkat keberhasilannya sangat kecil perlu dilakukan kultur *in vitro*. Kultur *in vitro* merupakan kultur yang menggunakan eksplan daun untuk memacu pertumbuhan kalus. Pertumbuhan kalus dapat dipacu dengan auksin (IAA) dan sitokinin (BAP). Perpaduan antara konsentrasi auksin dan sitokinin yang seimbang diharapkan bisa memacu pertumbuhan kalus. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan IAA dan BAP terhadap pertumbuhan kalus anggrek *C. pandurata* Lindl dan mengetahui interaksi IAA dan BAP yang terbaik terhadap pertumbuhan kalus anggrek *C. pandurata* Lindl. Metode penelitian dilakukan yang digunakan adalah eksperimental dengan rancangan acak lengkap menggunakan pola faktorial, faktor pertama adalah konsentrasi IAA dengan 4 taraf: 0, 1, 2, 3 mg/L. Dan faktor kedua adalah konsentrasi BAP dengan 4 taraf perlakuan: 0, 1, 2, 3 mg/L, sehingga ada 16 perlakuan, masing-masing perlakuan diulang 3 kali sehingga ada 48 unit percobaan. Parameter yang diamati adalah: waktu munculnya kalus, tebal kalus, jenis kalus, berat kalus dan presentasi terbentuknya kalus. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dan dilakukan uji lanjut DMRT dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan pemberian IAA dan BAP dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus eksplan daun anggrek *C. pandurata* Lindl. Pengaruh secara interaksi terdapat pada waktu munculnya kalus, tebal kalus dan prosentase hidup kalus. Serta mampu memacu perkembangan kalus ke arah proliferasi. Sedangkan pemberian IAA secara mandiri dapat memacu penebalan kalus. Interaksi yang terbaik dalam pertumbuhan kalus eksplan daun anggrek *Coelogyne pandurata* Lindl. adalah A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) dan A2B3 (IAA 2 mg/L dan BAP 3 mg/L).

**Kata kunci:** Anggrek *Coelogyne pandurata*, BAP, IAA, Pertumbuhan kalus

## PENDAHULUAN

Anggrek hitam atau *Coelogyne pandurata* Lindl merupakan anggrek yang tumbuh di daerah Kalimantan, Sumatera dan Semenanjung Malaya, hidup secara epifit dan merupakan anggrek sympodial, mempunyai lidah (labellum) berwarna hitam dengan sedikit garis-garis berwarna hijau dan berbulu, namun sepal dan petal berwarna hijau muda, kelopak bersegitiga, ujung runcing. Bunganya berada pada posisi basal, perbungaan menggantung, bunga 7-10 kuntum dan tangkai pendek dan dapat mekar 2x selama 1 tahun. *C. pandurata* Lindl memiliki umbi semu dan daun melonjong, lebar di bagian tengah ke ujung, dan kaku (Managanta, 2014). Keunikan inilah yang membuat anggrek ini mempunyai nilai ekonomi yang tinggi. Labelum berwarna hitam ini yang menjadi daya tarik bagi peneliti sebagai sumber silangan baik intergenerik maupun intragenerik. Namun, keberadaan anggrek ini sudah sedikit di alam, maka perlu di budidayakan secara *in vitro* yakni salah satunya dengan kalus (Hartati *et al.*, 2017).

Keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh zat pengatur tumbuh (ZPT), ZPT yang sering digunakan adalah auksin dan sitokinin. Fungsi IAA adalah mendorong pembentangan sel akibat dari meningkatkan potensial air jaringan yang menyebabkan sel akan mengalami pembentangan. IAA sebagai auksin dan BAP (Benzyl amino purine) sebagai sitokinin dapat mendorong sel untuk membelah secara terus menerus (Agustian *et al.*, 2010). BAP merupakan sitokinin sintetik dari turunan adenin yang aktif dalam pembelahan sel, yang merupakan senyawa relatif stabil. Fungsi BAP sendiri adalah merangsang pembelahan sel, perkembangan sel meristem samping dan pembentukan kalus (Pratomo *et al.*, 2016).

Kalus adalah sekumpulan sel amorphous yang berasal dari sel-sel jaringan awal yang membelah diri secara terus menerus secara *in vitro*. Kalus dapat diperoleh dari bagian tanaman seperti akar, batang dan daun (Sudarmadji, 2003). Pertumbuhan kalus di tandai dengan pembengkakan atau munculnya jaringan berwarna putih bening seperti titik-titik air/lendir pada bagian yang dilakukan perlakuan yang kemudian berkembang menjadi bulatan-bulatan. Jenis kalus di bagi menjadi dua yakni embriosomatik dan non embriosomatik. Inisiasi kalus dapat dilakukan dengan penambahan zat pengatur tumbuh seperti auksin dan sitokinin. Kalus dapat terbentuk jika konsentrasi antar auksin dan sitokinin seimbang (Ramdan & Hendra, 2015).

Perbanyakan anggrek dapat dilakukan secara konvensional namun dapat dilakukan perbanyakan menggunakan kultur *in vitro*. Kultur *in vitro* memiliki keuntungan yakni waktu yang relatif cepat dan hasil yang mirip dengan induknya (Mahadi, 2017). Kombinasi antara pemberian Auksin dan sitokinin yang tepat dapat memacu pertumbuhan kalus. Efek pemberian auksin (IAA)

dan sitokinin (BAP) dapat memacu perkembangan kalus. Efektifitas dalam pemberian zat pengatur tumbuh eksogen seperti IAA dan BAP akan bergantung pada zat pengatur tumbuh endogen atau fitohormon (Syahid *et al.*, 2010).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian IAA dan BAP terhadap pertumbuhan kalus eksplan daun anggrek *C. pandurata* Lindl dan mengetahui Interaksi IAA dan BAP yang terbaik terhadap pertumbuhan kalus eksplan daun anggrek *C. pandurata* Lindl, sedangkan manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efek penambahan IAA dan BAP terhadap pertumbuhan eksplan dan mengetahui konsentrasi yang terbaik dalam memacu pertumbuhan kalus. Kedepannya kalus yang didapatkan dapat dilakukan untuk penelitian lanjutan dari kalus menuju tunas.

## MATERI DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Media MS, Agar, ZPT IAA dan BAP, Akuades serta Alkohol. Sedangkan alat yang digunakan untuk penelitian ini meliputi mikroskop, kamera, pH meter, timbangan analitik, dan Laminar air flow. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman pada bulan Mei sampai dengan September 2020.

Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola perlakuan faktorial. Faktor pertama adalah penambahan IAA (A) dengan 4 taraf, yaitu: A1: 0 mg/L, A2: 1 mg/L, A3: 2 mg/L, dan A4: 3 mg/L. Faktor kedua adalah BAP (B) dengan 4 taraf, yaitu: B1: 0 mg/L, B2: 1 mg/L, B3: 2 mg/L, dan B4: 3 mg/L, sehingga terdapat 16 perlakuan, masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan, sehingga total percobaan terdapat 48 unit percobaan. Variabel dan Parameter yang diamati adalah variabel terikat yakni perkembangan kalus anggrek hitam *Coelogyne pandurata* Lindl dan variabel bebas yakni IAA dan BAP. Parameter yang di amati adalah: Waktu munculnya kalus, Tebal kalus, Jenis kalus, Berat kalus dan Prosentase terbentuknya kalus.

Media yang digunakan untuk tiap perlakuan adalah 10 mL pada setiap botol kultur dengan 16 kombinasi, sehingga total media yang dibutuhkan yaitu 800 mL. Setiap beaker glass yang sudah berisi media ditambah IAA dan BAP sesuai dengan perlakuan. Masing-masing dengan menambahkan IAA dari stok IAA 100 ppm yang sudah dihitung dengan rumus pengenceran masing-masing untuk perlakuan A1 sebanyak 0 mL, A2 0,9 mL, A3 1,8 mL, A4 2,7 mL dan ditambahkan BAP dari stok BAP 100 ppm yang sudah dihitung dengan rumus pengenceran masing-masing pada perlakuan B1 sebanyak 0 ppm, B2 0,9 mL, B3 1,8 mL, B4 2,7 mL. Larutan

media dihomogenkan dan pH media diukur hingga 5,2 menggunakan pH meter, jika  $pH \leq 5,2$  maka ditambahkan NaOH sebaliknya jika  $pH \geq 5,2$ . ditambahkan HCl. Media ditutup dan direkatkan dengan wrapper kemudian diberi label sesuai perlakuan. Parameter yang diamati meliputi: 1. Waktu munculnya kalus (hari). Waktu munculnya kalus di hitung dari hari mulai terbentuknya kalus. Pengambilan data dilakukan setiap hari. 2. Tebal kalus (mm). Tebal kalus diukur menggunakan mikroskop stereo. dengan mikrometer okuler yang sudah dikalibrasi terlebih dahulu. Pengambilan data dilakukan setiap minggu. 3. Jenis kalus. Jenis kalus di amati dan di bandingkan dengan referensi. Pengambilan data dilakukan setiap minggu. 4. Berat Kalus (g). Berat kalus dihitung dengan menimbang cawan yang sudah berisi media dan eksplan daun. Pengambilan data dilakukan setiap minggu. 5. Prosentase terbentuknya kalus (%). Prosentase terbentuknya kalus di hitung pada mulai dari munculnya kalus hingga akhir penelitian. Data yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Ragam dengan tingkat kepercayaan 95% dan 99%, yang dilanjutkan dengan uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada tingkat kepercayaan 95%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan IAA dan BAP terhadap pertumbuhan kalus eksplan daun anggrek *Coelogyne pandurata* memberikan dampak pada pertumbuhan kalus. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti eksplan daun anggrek *C. pandurata* yang tipis dan pemberian IAA dan BAP yang beragam konsentrasi sehingga memberikan dampak yang berbeda. Hal ini sesuai dengan pendapat Ambarwati (2001) bahwa kalus dapat tumbuh pada konsentrasi auksin dan sitokinin yang seimbang. Adapun pembahasan parameter yang diamati sebagai berikut:

### Pengaruh penambahan IAA dan BAP terhadap waktu munculnya kalus (hari) eksplan daun anggrek *C. pandurata*

Pertumbuhan kalus sangat dipengaruhi oleh kombinasi dan konsentrasi ZPT yang diberikan pada suatu media. Berdasarkan hasil Analisis ragam menunjukkan bahwa interaksi IAA dan BAP berpengaruh nyata, BAP dan IAA secara mandiri berpengaruh nyata. Hasil uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) interaksi IAA dan BAP terhadap waktu munculnya kalus (Tabel 1).

Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa perlakuan A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) dan A2B3 (IAA 2 mg/L dan 3 mg/L) paling berpengaruh nyata dibandingkan perlakuan lain. Namun kedua perlakuan A2B2 dan A2B3 tidak berbeda nyata. Pada perlakuan A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) cenderung lebih cepat pertumbuhannya 6,89 hst. (Gambar 1) dibanding

dengan perlakuan A2B3 (Konsentrasi IAA 2 mg/L dan 3 mg/L) pada 7,84 hst. Kalus yang tidak mampu tumbuh sama sekali (Gambar 2) disebabkan oleh kandungan nutrisi pada media yang sudah mulai berkurang (Rianawati, 2009). Untuk meningkatkan pertumbuhan eksplant maka perlu adanya penambahan ZPT dalam media tanam. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus daun *C. pandurata* masih membutuhkan penambahan auksin dan sitokinin secara eksogen. Hal ini di perkuat oleh Markal *et al.* (2015) Pemberian auksin dan sitokinin yang seimbang mampu memacu perkembangan kalus. Pemberian sitokinin yang kurang dapat menghambat perkembangan sel. Pemberian auksin serta sitokinin harus mencukupi agar kalus dapat terbentuk dengan baik. Kalus muncul pertama kali tumbuh di daerah yang mengalami perlukaan atau dekat irisan daun. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Lestari *et al.* (2013). Kalus muncul melalui pembengkakan yang dipengaruhi oleh interaksi antara hormon auksin dan sitokinin. Waktu muncul kalus yang terbaik adalah yang memiliki hari muncul tercepat. Kalus muncul pertama kali melalui irisan dari eksplan daun anggrek *C. pandurata* yang kemudian ditandai dengan pembengkakan sel disekitar irisan daun anggrek.

**Tabel 1.** Hasil uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) terhadap waktu munculnya kalus (hari) eksplan daun anggrek *C. pandurata*

No.	Perlakuan	Rata-rata munculnya kalus (hari)
1.	A0B0	0,7071 b
2.	A0B1	0,7071 b
3.	A0B2	0,7071 b
4.	A0B3	0,7071 b
5.	A1B0	0,7071 b
6.	A1B1	0,7071 b
7.	A1B2	0,7071 b
8.	A1B3	0,7071 b
9.	A2B0	0,7071 b
10.	A2B1	0,7071 b
11.	A2B2	6,8987 a
12.	A2B3	7,8442 a
13.	A3B0	0,7071 b
14.	A3B1	2,5397 b
15.	A3B2	3,1897 b
16.	A3B3	0,7071 b

DMRT 5% = 1.31

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama tidak berpengaruh nyata pada DMRT 95%.

Menurut Kuo *et al.* (2005) pembentukan kalus pada setiap anggrek akan berbeda tergantung pada hormon auksin dan sitokininnya. Pemberian TDZ 2 mg/L dan 2,4-D 2 mg/L sangat cocok dengan anggrek *Phalaenopsis 'Little Steve'* dalam perkembangan kalus. Kemunculan kalus anggrek *Phalaenopsis 'Little Steve'* dimulai pada 30 hst dan setelah 45 hst. kalus menghitam dan menuju

kearah kematian atau senence. Namun menurut penelitian Utami *et al.* (2007) Kalus anggrek *Phalaenopsis amabilis* tumbuh pada minggu ke 6 setelah tanam dengan pemberian NAA 0.5 mg/L dan BA 1 mg/L kombinasi antara NAA dan BA ternyata memberikan efek yang terbaik bagi pertumbuhan kalus anggrek *P. amabilis*. Kalus dapat tumbuh pada bekas luka irisan daun bagian pangkal. Pertumbuhan kalus anggrek oncidium paling baik menggunakan perlakuan TDZ dan 2,4-D seperti pada penelitian Chen & Chang (2006) menunjukkan pemberian TDZ 1 mg/L dan 2,4-D 1 mg/L dapat menumbuhkan kalus pada waktu 2 minggu atau 14 hst.

#### **Pengaruh penambahan IAA dan BAP terhadap berat kalus (mg) eksplan daun anggrek *C. pandurata***

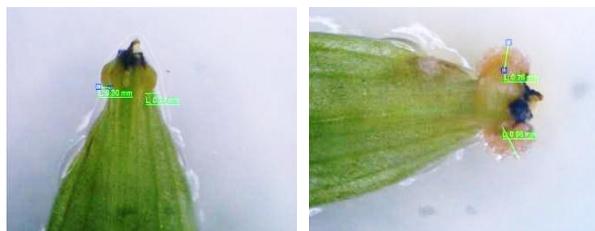
Berdasarkan hasil analisis ragam perlakuan interaksi IAA dan BAP maupun BAP secara mandiri tidak berpengaruh nyata terhadap berat eksplan, namun perlakuan IAA secara mandiri berpengaruh nyata. Berat basah kalus meningkat bergantung pada kecepatan membelahnya sel dan terjadi pembesaran sel. Auksin memiliki kemampuan untuk memperbesar sel lebih baik di bandingkan dengan sitokinin (Indah & Ermavitalini, 2013). Penelitian Utami *et al.* (2007) eksplan daun yang digunakan untuk menghasilkan embrio somatic adalah bagian pangkal daun yang lebih muda secara fisiologis. Pernyataan tersebut di perkuat oleh penelitian Tokuhara & Mii (2001) untuk melakukan kultur yang mengharapkan pertumbuhan kalus, bagian tanaman yang digunakan adalah bagian daun yang masih melakukan perkembangan vegetative termuda. Selain itu pengaruh media juga dapat mempengaruhi hasil pertumbuhan kalus.

Pemberian IAA atau auksin secara mandiri dapat memberikan efek pada berat kalus (Tabel 2), hal ini menunjukkan penambahan auksin eksogen

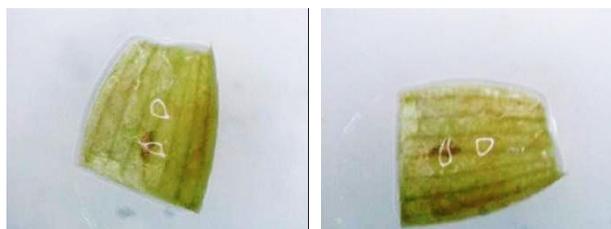
dapat memacu pembelahan sel dan memacu penambahan berat kalus. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rahayu & Anggarwulan (2003) auksin dapat menambah berat kalus karena dapat mempengaruhi kecepatan sel untuk membelah diri dan mengarah kepada pembesaran kalus. Menurut Astuti *et al.* (2019) pemberian 2,4-D sebagai sumber auksin eksogen dapat menginisiasi pembentukan kalus. Pemberian Auksin pada konsentrasi yang tepat dapat memberikan efek terbaik, namun konsentrasi auksin yang terlalu tinggi tidak akan memberikan efek bagi berat kalus. Perlakuan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L - 2,4-D 2 mg/L merupakan konsentrasi terbaik yang menghasilkan berat kalus lebih tinggi. Sebaliknya Khalida *et al.* (2019) yang melakukan penambahan 1 mg/L 2,4-D dan mampu memberi pengaruh yang signifikan terhadap berat basah kalus anggrek *Aerides odorata*. Pemberian auksin mandiri mampu memacu perkembangan berat basah kalus. Semakin tinggi pemberian auksin akan terus memacu penambahan berat basah kalus hingga titik optimalnya. Pemberian terlalu banyak hormon auksin maupun sitokinin mampu menghambat terbentuknya kalus karena akumulasi zat pengatur tumbuh yang terlalu tinggi pada eksplan.

#### **Pengaruh penambahan IAA dan BAP terhadap tebal kalus (mm) eksplan daun anggrek *C. pandurata*.**

Hasil analisis ragam tebal kalus menunjukkan bahwa interaksi IAA dan BAP maupun secara mandiri berpengaruh nyata terhadap tebal kalus. Hasil uji lanjut DMRT (Tabel 3) menunjukkan perlakuan A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) memberikan hasil ketebalan kalus paling tebal berkisar 1,56 mm sedangkan A2B3 (IAA 2 mg/L dan 3 mg/L) ketebalan kalu berkisar 1,36 mm (Gambar 3). Perlakuan A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) dan A2B3 (IAA 2 mg/L dan BAP 3 mg/L) tidak berbeda nyata.



**Gambar 1.** Pertumbuhan Kalus A2B2 pada umur 5 mst (I). dan pertumbuhan kalus A2B2 pada umur 8 mst (II)



**Gambar 2.** Pertumbuhan Kalus A0B2 pada umur 5 mst (I). dan pertumbuhan kalus A0B2 pada umur 8 mst (II)

**Tabel 2.** Berat kalus pada eksplan daun anggrek *C. pandurata* setelah 12 mst

No.	Perlakuan	Berat kalus
1.	A0	0 b
2.	A1	0 b
3.	A2	8,375 a
4.	A3	1,833 b

DMRT 5% = 1.31

Keterangan : angka yang diikuti huruf yang sama tidak berpengaruh nyata pada DMRT 95%

Ketebalan kalus sejalan dengan waktu munculnya kalus diperlukan perlakuan IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L. Perlakuan auksin dan sitokinin akan memberikan dampak yang berbeda pada jenis anggrek yang lain. Hasil penelitian Nilahayati (2011), perlakuan NAA 1 mg/L dan BAP 1 mg/L memberikan pengaruh nyata terhadap tebal kalus pada anggrek *dendrobium*. Pemberian BAP 3 mg/L memberikan pengaruh terbaik dalam pertumbuhan tinggi atau tebal kalus protocorm anggrek *dendrobium* dengan rata - rata sebesar 1,67 mm pada minggu ke 12 (Bakar *et al.*, 2016). Pemberian sitokinin dan auksin dalam konsentrasi kecil (NAA 0,1 mg/L dan TDZ 0,01 mg/L) ternyata dapat memberikan hasil tebal kalus yang baik pada anggrek *cymbidium* sebesar 0,2 cm (Takamura & Tanaka., 2004). Menurut Chen *et al.* (2000) pemberian TDZ 0,5 mg/L dan 2,4-D 0,5 mg/L memberikan hasil tebal kalus anggrek *phalaenopsis* sebesar 0,4 mm. Penelitian Melisa (2018) melakukan penelitian dengan penambahan 2,4-D dan kinetin ternyata mampu memacu panjang kalus anggrek *Grammatophyllum scriptum*, konsentrasi yang terbaik untuk memacu perkembangan protocorm adalah 4 mg/L Auksin (2,4-D) dan 2 mg/L Sitokinin (Kinetin). Berbeda dengan penelitian Fithriyandini *et al.* (2015) perlakuan BAP 2,5 mg/L mampu memberikan hasil berbeda pada tebal kalus pada anggrek *Phalaenopsis amabilis*. Lebih lanjut dikatakan bahwa penggunaan BAP yang lebih tinggi akan meningkatkan perkembangan kalus karena BAP mempunyai kemampuan untuk melakukan pembelahan sel.

**Tabel 3.** Hasil uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) terhadap tebal kalus (mm) eksplan daun anggrek *C. pandurata* setelah 12 mst.

No.	Perlakuan	Rata-rata tebal kalus (mm)
1.	A0B0	0,7071 c
2.	A0B1	0,7071 c
3.	A0B2	0,7071 c
4.	A0B3	0,7071 c
5.	A1B0	0,7071 c
6.	A1B1	0,7071 c
7.	A1B2	0,7071 c
8.	A1B3	0,7071 c
9.	A2B0	0,7071 c
10.	A2B1	0,7071 c
11.	A2B2	1,5681 a
12.	A2B3	1,3695 a
13.	A3B0	0,7071 c
14.	A3B1	1,0705 b
15.	A3B2	1,0089 b
16.	A3B3	0,7071 c

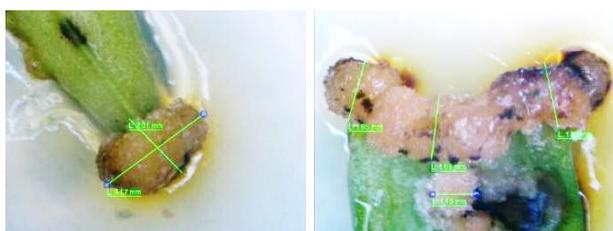
DMRT 5% = 1,31

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama tidak berpengaruh nyata pada DMRT 95%

**Pengaruh penambahan IAA dan BAP terhadap Persentase terbentuknya kalus (%)**

Hasil analisis ragam persentase terbentuknya kalus menunjukkan bahwa interaksi IAA dan BAP mapun perlakuan secara mandiri berpengaruh nyata. Selanjutnya pada uji DMRT interaksi IAA dan BAP terhadap terbentuknya kalus (Tabel 4.), menunjukkan hasil paling tinggi persentase terbentuknya kalus pada perlakuan A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) memiliki nilai tertinggi 60.19%, akan tetapi perlakuan ini tidak berbeda nyata dengan A2B3 (IAA 2 mg/L dan BAP 3 mg/L) yang memiliki nilai 45.2%.

Persentase terbentuknya kalus sejalan dengan waktu munculnya kalus dan tebal kalus di mana diperlukan auksin dan sitokinin untuk pertumbuhan kalus pada perlakuan A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) dan A2B3 (IAA 2 mg/L dan BAP 3 mg/L). Perlakuan A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) adalah perlakuan terbaik dalam mempercepat pertumbuhan kalus, tebal kalus dan persentase kalus. Hal ini menunjukkan bahwa



**Gambar 3.** Ketebalan kalus pada perlakuan A2B2 (I) dan ketebalan kalu pada perlakuan A2B3 (II)

konsentrasi perlakuan tersebut memberikan hasil yang terbaik karena memiliki nilai 60,19%. Meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan A2B3 (IAA 2 mg/L dan BAP 3 mg/L). Pemberian IAA secara eksogen dapat menambah auksin endogen untuk membentuk kalus embriogenik (Kusmianjani *et al.*, 2013). Pada penelitian Tokuhara & mii (2001) kalus anggrek *Phalaenopsis* sp. mengalami pertumbuhan maksimal kalus pada bulan ke 4 atau minggu 16 dengan pemberian NAA 0,5 mg/L dan BA 4,4 mg/L. setelah bulan ke 7 kalus mengalami senescence atau kematian. Sebaliknya pada penelitian Samala *et al* (2014) pada anggrek *Grammatophyllum speciosus* mendapatkan kalus pada waktu yang lebih singkat dengan pemberian 1 mg/L BA dan 0,5 mg/L NAA menghasilkan 63% kalus terbentuk pada 3 bulan setelah tanam. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) mempunyai konsentrasi yang seimbang dan A2B3 (IAA 2 mg/L dan BAP 3 mg/L) membentuk kalus sebanyak >50% selama 3 bulan pengamatan. Penelitian ini sesuai dengan penelitian menurut Hoesen *et al* (2008) pemberian TDZ 1 mg/L dan 2,4-D 1 mg/L pada anggrek *Dendrobium lineale Rolfe* dapat memberikan persentase pertumbuhan kalus terbaik yakni >70% dalam 12 minggu setelah tanam. Pemberian sitokinin dan auksin yang seimbang akan meningkatkan memberikan hasil pertumbuhan kalus yang baik. Berdasarkan penelitian Lestari *et al.* (2013) interaksi antara auksin dan sitokinin yang seimbang dapat menumbuhkan kalus dengan baik. Konsentrasi 2,4-D 1 mg/L dan BAP 2 mg/L dapat menumbuhkan kalus *Dendrobium laxiflorum* sebesar 36%. Hal serupa menurut Naing *et al* (2011) pada anggrek *Coelogyne cristata* yang diberikan 2,4 – D 2 mg/L dan BA 2 mg/L memberikan hasil yang sangat signifikan pada persentase terbentuknya kalus sebesar 40% dan pemberian 2,4-D 3 mg/L dan BA 1 mg/L juga memberikan hasil yang berbeda nyata yakni 36%. Rineksane (2019) melakukan percobaan dengan memberikan 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA dan 2 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA mampu menumbuhkan kalus pada eksplan daun anggrek *Vanda tricolor* sebanyak <50%. Persentase hidup kalus yang rendah disebabkan penghambat pertumbuhan eksplan. Hambatan ini berasal dari kandungan fenolik yang kuat pada daun anggrek yang menyebabkan kematian pada eksplan. Menurut Chen *et al.* (2000) Anggrek cukup sulit dilakukan pertumbuhan pada media karena anggrek mempunyai metabolit sekunder yang cukup besar dan sifat dasar anggrek yang sangat sulit melakukan pertumbuhan klonal.

**Tabel 4.** Hasil uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) terhadap Persentase terbentuknya kalus (%) eksplan daun anggrek *C. pandurata* setelah 12 mst

No.	Perlakuan	Rata-rata terbentuknya kalus (%)
1.	A0B0	4,055 b
2.	A0B1	4,055 b
3.	A0B2	4,055 b
4.	A0B3	4,055 b
5.	A1B0	4,055 b
6.	A1B1	4,055 b
7.	A1B2	4,055 b
8.	A1B3	4,055 b
9.	A2B0	4,055 b
10.	A2B1	4,055 b
11.	A2B2	60,191 a
12.	A2B3	45,286 a
13.	A3B0	4,055 b
14.	A3B1	17,799 b
15.	A3B2	17,799 b
16.	A3B3	4,055 b

DMRT 5% = 1,31

Keterangan : angka yang diikuti huruf yang sama tidak berpengaruh nyata pada DMRT 95%

**Pengaruh penambahan IAA dan BAP terhadap bentuk kalus eksplan daun anggrek *C. pandurata***

Indah & Ermavitalini (2013) mengatakan bahwa indikator dalam menentukan bentuk kalus salah satunya adalah warna kalus, yang akan menentukan apakah kalus tersebut masih berkembang atau kalus yang mati. Kalus embriogenik adalah kalus yang berwarna hijau dan berbentuk globular, mampu berkembang kearah organ maupun embriomatik (Riyadi *et al.*, 2019). Sedangkan kalus proliferaatif adalah kalus yang masih terus berkembang melakukan pembesaran namun bukan kearah organ maupun embrio. Kalus senescence adalah kalus yang tidak mengalami perkembangan lagi dan berwarna hitam (Nisa & Rodinah, 2018).

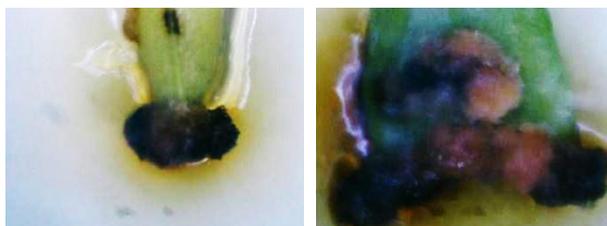
**Tabel 5.** Jenis kalus pada eksplan daun anggrek *C. pandurata* setelah 12 mst

No.	Perlakuan	Jenis Kalus
1.	A2B2	Proliferaatif
2.	A2B3	Proliferaatif
3.	A3B1	Proliferaatif
4.	A3B2	Proliferaatif

Hasil pengamatan pertumbuhan kalus pada penelitian ini menunjukkan bahwa kalus akan mengalami pertumbuhan dengan baik hingga minggu ke 7 setelah tanam (Gambar 4), pertumbuhan selanjutnya kalus mulai berwarna coklat, yang akan mengalami pertumbuhan senescence. Menurut Riyadi *et al.* (2019).



**Gambar 4.** Kalus pada minggu ke 7 atau 49 hst pada perlakuan A2B2 (I) dan pada perlakuan A2B3 (II)



**Gambar 5.** Kalus pada minggu ke 12 atau 84 hst pada perlakuan A2B2 (I) dan pada perlakuan A2B3 (II)

Perkembangan warna kalus dari krem kekuningan dapat menuju warna hijau yang baik. Pada awal pertumbuhan kalus yang muncul pada penelitian ini merupakan kalus berwarna putih dan bertekstur kompak, hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus pada awal pertumbuhan cukup baik, namun pada perkembangan selanjutnya akan mengalami senescen yang berwarna coklat. Hanya pada perlakuan tertentu yang dapat tumbuh kalus (Tabel 5).

Kalus yang berwarna hijau adalah kalus yang baik karena mengandung banyak klorofil dan kalus ini memiliki peluang yang cukup besar untuk terus berkembang menuju arah organ (Astuti *et al.*, 2019). Pemberian BAP 1 mg/L akan merangsang pembentukan kalus dan pemberian BAP 3 mg/L akan menghasilkan kalus berwarna hijau (Wirnasari & Isda, 2019). Namun pemberian auksin yang tinggi akan menyebabkan penurunan klorofil.

Kalus pada penelitian ini berwarna putih dan tidak menunjukkan ciri-ciri kalus embriosomatik. Setelah melewati minggu ke 7, kalus mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan dan menuju kearah kematian atau senence (Gambar 5). kecoklatan ini disebabkan oleh 2 hal yang pertama adalah senyawa metabolit sekunder pada daun yang terlalu kuat dan dapat membuat lapisan disekitar kalus sehingga berakibat terhambatnya pertumbuhan kalus (Nisa & Rodinah, 2018). Toksisitas fenol disebabkan oleh ikatan reversible antara protein dan hidrogen sehingga terjadi penghambatan dan pertumbuhan kalus tidak dapat terjadi (Hutami, 2008). Kalus yang sudah lama didalam cawan harus dilakukan subkultur ke media baru. Kalus yang terlalu lama didalam cawan akan mengalami kekurangan kebutuhan hara untuk melakukan perkembangan kalus. Serta kandungan CO<sub>2</sub> dalam cawan lebih tinggi dibandingkan dengan O<sub>2</sub> menyebabkan kalus tidak dapat berkembang (Yudiawan, 2015).

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian penambahan IAA dan BAP terhadap pertumbuhan eksplant daun angrek C. pandurata Lindl. dapat disimpulkan bahwa : pemberian IAA dan BAP dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus eksplan daun angrek C. pandurata Lindl. pada waktu munculnya kalus, tebal kalus dan prosentase hidup kalus. Serta mampu memacu perkembangan kalus ke arah proliferaatif. Interaksi IAA dan BAP yang terbaik dalam pertumbuhan kalus eksplan daun angrek C. pandurata Lindl. adalah A2B2 (IAA 2 mg/L dan BAP 2 mg/L) dan A2B3 (IAA 2 mg/L dan BAP 3 mg/L).

## DAFTAR REFERENSI

- Agustian, A., Nuriyani, N., Maira, L. & Emalinda, O., 2010. Rhizobakteria penghasil fitohormon IAA pada rhizosfir tumbuhan semak karamunting, titonia, dan tanaman pangan. *Jurnal Solum*, 7(1), pp. 49-60.
- Ambarwati, A.D. 2001. *Induksi kalus dan diferensiasi pada kultur jaringan Gnetum gnemon L.* Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Astuti, A.T., Noli, Z.A. & Suwirmen, S., 2019. Induksi Embriogenesis Somatik Pada Anggrek Vanda Sumatrana Schltr. dengan Penambahan Beberapa Konsentrasi Asam 2, 4-Diklorofenoksiasetat (2, 4-D). *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 7(1), pp. 6-13.
- Bakar, M., Mandang, J., Kojoh, D. & Demasabu, S., 2016, June. Penggunaan BAP dan Kineti Pada Induksi Tunas Dari Protocorm Anggrek Dendrobium (*Dendrobium Sp*) Pada Kultur In Vitro. *In Cocos*, 7 (4).
- Chen, J.T. and Chang, W.C., 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, 50(2), pp. 169-173.

- Chen, Y.C., Chang, C. & Chang, W.C., 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(5), pp. 420-423.
- Fithriyandini, A., Maghfoer, M.D. & Wardiyati, T., 2015. Pengaruh media dasar dan 6-benzylaminopurine (BAP) terhadap pertumbuhan dan perkembangan nodus tangkai bunga Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis*) dalam perbanyakan secara in vitro. *Jurnal Produksi Tanaman*, 3(1).
- Hartati, S., Nandariyah, N., Yunus, A. & Djoar, D.W., 2017. Cytological studies on black orchid hybrid (*Coelogyne pandurata* Lindley). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 18(2), pp.555-559.
- Hoesen, D.S.H., Witjaksono, W. & Sukamto, L.A., 2008. Induksi kalus dan organogenesis kultur in vitro *Dendrobium lineale* Rolfe. *Berita Biologi*, 9(3), pp.333-341.
- Hutami, S., 2008. Ulasan Masalah Pencolatan Pada Kultur Jaringan. *AgroBiogen* 4(2), pp. 83-88.
- Indah, P.N. and Ermavitalini, D., 2013. Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2, 4-D). *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 2(1), pp. E1-E6.
- Kasi, P.D. and Semiarti, E., 2017. Pengaruh Thidiazuron Dan Naphtalene Acetic Acid Untuk Induksi Embriogenesis Somatik Dari Daun Anggrek *Phalaenopsis* "Sogo Vivien". *Dinamika*, 7(1), pp.31-40.
- Khalida, A., Suwirman, S. dan Noli, Z.A., 2019. Callus Induction of *Aerides odorata* Lour. by Adding 2, 4 Dichlorophenoxyacetic Acid (2, 4-D). *Jurnal Biologi UNAND*, 7(2), pp. 109-117.
- Kusmianjani, E., Revandy, I. D., Luthfi, A., 2015. Pengaruh Pemberian 2,4-D Terhadap Pertumbuhan dan Metabolisme Kalus Kedelai Pada Kondisi Hipoksida Secara In vitro. *Jurnal Agroteknologi*, 4(1), pp.1673-1680.
- Kuo, H.L., Chen, J.T. and Chang, W.C., 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(4), pp.453.
- Mahadi, I., 2017. Multifikasi Tunas Anggrek Larat (*Dendrobium phalaenopsis* Fitzg) Dengan Pemberian Hormon IAA Dan BAP Terhadap Pertumbuhan Secara In vitro. *EKSAKTA*, 2, pp.1-6.
- Managanta, A.A., 2014. Studi Habitat Dan Inventarisasi Anggrek Hitam (*Black Orchid*) Di Kawasan Hutan Cagar Alam Bancea Kecamatan Pamona Selatan, Kabupaten Poso. *Jurnal Ilmiah AgroPet*, 11(1).
- Markal, A., Isda, M.N. & Fatonah, S., 2015. Perbanyakan anggrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) BL. melalui induksi tunas secara in vitro dengan penambahan BAP dan NAA. *Doctoral dissertation*, Riau University.
- Melisa, A.O., 2018. Pemberian Kombinasi 2, 4-D Dan Kinetin Terhadap Induksi Protocorm Like Bodies (PLB) Anggrek *Grammatophyllum scriptum* Secara In vitro. *Journal Of Biology Education*, 1, pp. 34.
- Naing, A.H., J.D Chung dan K.B. Lim. 2011. Plant Regeneration through Indirect Somatic Embryogenesis in *Coelogyne cristata* Orchids. *American Journal of Plant Science*, 2, pp. 262-267.
- Nilahayati, N., 2011. Regenerasi Kalus Anggrek (*Dendrobium* sp) dengan Menggunakan NAA dan BAP dalam Media MS Secara In vitro. *Jurnal Agrium*, 8(1), pp.18-23.
- Nisa, C. and Rodinah, R., 2018. Kultur Jaringan beberapa Kultivar Buah Pisang (*Musa paradisiaca* L.) dengan Pemberian Campuran NAA dan Kinetin. *BIOSCIENTIAE*, 2(2).
- Pratomo, B., C. Hanum., dan L. A. P. Putri., 2016. Pertumbuhan okulasi tanaman karet (*Hevea brassiliensis* Muell arg.) dengan tinggi penyerongan batang bawah dan benzilaminopurin (BAP) pada pembibitan polibag. *Jurnal Pertanian Tropik*. 2 (13): 119-123.
- Rahayu, B.E.K.T.I. and Anggarwulan, E., 2003. Pengaruh asam 2, 4-diklorofenoksiasetat (2, 4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*, 1(1), pp.1-6.
- Ramdan, R. R dan H. Hendra., 2015. Induksi Kalus *Chrysanthemum indicum* untuk Meningkatkan Keragaman Genetik dari Sel Somatik. *Pros sem nas masy biodiv indon*. 1 (1). pp: 167-170.
- Rianawati, S. Purwito, A. Marwoto, B. Kurniati, R dan Suryanah. 2009. Embriogenesis somatik dari eksplan daun *Phalaenopsis* L. *J. Argon Indonesia*. 37(3), pp. 240-248.
- Rineksane, I.A., 2019. Regenerasi Anggrek *Vanda tricolor* Pasca Erupsi Merapi Melalui Kultur In vitro. *Prosiding Seminar Nasional Universitas PGRI. Yogyakarta*.
- Riyadi, I., Efendi, D., Purwoko, B.S. and Santoso, D., 2019. Embriogenesis somatik tidak

- langsung pada tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) menggunakan sistem kultur suspensi, perendaman sesaat, dan media padat. *Jurnal AgroBiogen* 12(1), pp. 37-44
- Samala, Sainiya., Te-chato, Sompong., Yenchon, Sureerat., Thammasiri, Kanchit., 2014. Protocorm-like body Proliferation of *Grammatophyllum speciosum* Through Asymbiotic Seed Germination. *Science Asia*, 40, pp. 379-383.
- Santoso, U., dan Fatimah, N., 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. UMM press: Malang.
- Serliana, M. and Linda, R., 2017. Pertumbuhan Anggrek Hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) secara In vitro Dengan Penambahan Ekstrak Tomat (*Solanum lycopersicum* L) Dan Benzyl Amino Purine (BAP). *Protobiont*, 6(3).
- Sudarmadji. 2003. Penggunaan Benzil Amino Purine pada Pertumbuhan Kalus Kapas Secara In vitro. *Buletin Teknik Pertanian*. 8 (1).
- Syahid SF, Kristina NN, & Seswita D. 2010. Pengaruh komposisi media terhadap pertumbuhan kalus dan kadar tannin dari daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) secara in vitro. *Jurnal LITTRI* 16 (1), pp. 1-5.
- Takamura, T. and Tanaka, M., 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid*. *Plant Science*, 166(6), pp. 1443-1449.
- Tokuhara, K. and Mii, M., 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(4), pp. 457-461.
- Utami, E.S.W., Soemardi, I., Taryono dan Semiarti, E. 2007. Embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.: Struktur dan pola perkembangan, *Berkala Penelitian Hayati* 13: 33-38.
- Wirnasari, R. and Isda, M.N., 2019. Response of Protocorm *Grammatophyllum stapeliiflorum* (Teijsm. & Binn.) JJ Sm. Orchid in Growth on Several Media Composition. *Jurnal Biologi UNAND*, 7(2), pp.118-125.
- Yudiawan, K. F., 2015. Pengaruh 2,4-D & Kinetin pada Pembentukan Kalus dalam Kultur Anthera Kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L). *Skripsi*. Universitas Jenderal Soedirman.