

## Induksi Kalus *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce Menggunakan NAA dan TDZ

Nina Nurussakinah, Murni Dwiati\*, Iman Budisantoso

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

Jalan dr. Suparno 63 Purwokerto 53122

\*Email : [murni.dwiati@unsoed.ac.id](mailto:murni.dwiati@unsoed.ac.id)

### Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 23/05/2021

Disetujui : 22/06/2022

### Abstract

*Nepenthes* sp. has a characteristic in the form of a modified leaf tip into a pitcher. *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce in its original habitat is widely hunted for sale. Propagation of *N. mirabilis* in nature has very little success rate, to overcome this it is necessary to propagate it by means of in vitro culture and use young leaf explants to form callus. Growth regulators such as Auxins (NAA) and Cytokinins (TDZ) can stimulate callus growth. Auxins can stimulate callus formation by stimulating cell expansion and cytokinins can stimulate the cell division process. The purpose of this study was to determine the effect of NAA and TDZ in inducing *N. mirabilis* callus and to determine the interaction between NAA and TDZ in inducing *N. mirabilis* callus. The experimental design used was a factorial CRD pattern, with two factors, namely NAA and TDZ. NAA consists of four levels, namely, 0 mg / L (N0); 0.5 mg / L (N1), 1 mg / L (N2) and 1.5 mg / L (N3). TDZ also consists of four levels, namely 0 mg / L (T0); 1 mg / L (T1); 2 mg / L (T2) and 3 mg / L (T3). Each treatment was repeated three times. The results showed that the addition of NAA and TDZ had an effect on callus induction of *N. mirabilis*. The TDZ concentration of 1 mg / L (T1) stimulated callus induction, especially the percentage of callus formation and callus diameter. Meanwhile, NAA 1 mg / L (N2) boosted the percentage of *N. mirabilis* callus formation.

**Key Words:** Callus, NAA, *Nepenthes mirabilis*, and TDZ

### Abstrak

*Nepenthes* sp. memiliki ciri khas berupa ujung daun mengalami modifikasi menjadi kantong. *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce di habitat aslinya banyak diburu untuk diperjualbelikan. Perbanyakan *N. mirabilis* di alam sangat kecil tingkat keberhasilannya, untuk mengatasi hal tersebut perlu dilakukan perbanyakan dengan cara kultur *in vitro* dan menggunakan eksplan daun muda untuk membentuk kalus. Zat pengatur tumbuh seperti Auksin (NAA). Sitokinin (TDZ) dapat memacu pertumbuhan kalus. Auksin dapat merangsang pembentukan kalus dengan memacu pembentangan sel dan sitokinin dapat memacu proses pembelahan sel. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh NAA dan TDZ dalam menginduksi kalus *N. mirabilis* dan mengetahui Interaksi antara NAA dan TDZ dalam menginduksi kalus *N. mirabilis*. Rancangan percobaan yang digunakan adalah RAL pola Faktorial, dengan dua faktor, yaitu NAA dan TDZ. NAA terdiri atas empat taraf yakni, 0 mg/L (N0); 0,5 mg/L (N1), 1 mg/L (N2) dan 1,5 mg/L (N3). TDZ juga terdiri atas empat taraf yakni 0 mg/L (T0); 1 mg/L (T1); 2 mg/L (T2) dan 3 mg/L (T3). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan NAA dan TDZ berpengaruh terhadap induksi kalus *N. mirabilis*. Tidak terdapat interaksi antara NAA dan TDZ dalam menginduksi kalus. Konsentrasi TDZ 1 mg/L (T1) memacu induksi kalus khususnya persentase pembentukan kalus dan diameter kalus. Sementara itu, NAA 1 mg/L (N2) memacu persentase pembentukan kalus *N. mirabilis*.

**Kata kunci:** Kalus, NAA, *Nepenthes mirabilis*, dan TDZ

## PENDAHULUAN

Populasi *Nepenthes* sp. di habitat aslinya diperkirakan semakin sedikit yang disebabkan oleh kebakaran hutan, alih fungsi lahan hutan dan semak belukar menjadi kawasan pemukiman, perladangan, perkebunan, pertanian, ataupun pertambangan. Oleh karena itu, Pemerintah menetapkan *Nepenthes*

sebagai salah satu spesies yang harus dilindungi (Mardhiana *et al.*, 2012).

*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce adalah tanaman *dioecious* yang bernilai ekonomi tinggi karena keunikannya. *Nepenthes mirabilis* dihambat aslinya banyak diburu untuk diperjualbelikan (Chaveerach *et al.*, 2006). Perbanyakan *N. mirabilis* lebih banyak dilakukan dengan stek batang karena memiliki pertumbuhan tunas daun yang lebih cepat

dibandingkan *Nepenthes* yang lain (Mansur, 2013). Namun perbanyakannya dengan metode ini mengalami kendala pada lamanya waktu, adanya keragaman individu akibat segregasi dan terbatasnya jumlah buku (Dinarti *et al.*, 2014). Salah satu alternatif yang dapat digunakan adalah perbanyakannya dengan kultur *in vitro*.

Kultur *in vitro* adalah metode mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian tanaman tersebut bisa memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap (Rosmaina & Aryani, 2015).

Kultur kalus adalah salah satu teknik kultur *in vitro* yang banyak digunakan untuk menghasilkan bibit tanaman bebas penyakit. Kultur kalus merupakan tahap awal dalam proses perkembangan embriogenesis somatik. Salah satu kunci keberhasilan menggunakan teknik kultur *in vitro* *N. mirabilis* adalah penggunaan zat pengatur tumbuh.

Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan yaitu auksin (NAA) dan sitokinin (TDZ). NAA adalah ZPT yang dapat merangsang pembentukan kalus dan memacu pembentangan sel. TDZ adalah zat pengatur tumbuh yang dapat memacu proses pembelahan sel, pembentukan organ dan memacu faktor multiplikasi tunas dengan bantuan auksin (Munggaran *et al.*, 2018). Penggunaan konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan TDZ yang tepat yang diberikan di dalam media pertumbuhan dapat menstimulasi eksplan dalam membentuk kalus (Ariani *et al.*, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Pengaruh dan interaksi NAA dan TDZ dalam menginduksi kalus *N. Mirabilis*.

## MATERI DAN METODE

Objek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun planlet *N. mirabilis* yang berumur 1,5 tahun yang ditanam pada media ½ MS padat. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman pada bulan November 2020 hingga Januari 2021. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola Faktorial, dengan dua faktor yaitu NAA dan TDZ. NAA terdiri atas empat taraf yakni, 0 mg/L (N0); 0,5 mg/L (N1), 1 mg/L (N2) dan 1,5 mg/L (N3). Sementara itu, TDZ yang digunakan terdiri atas empat taraf yakni 0 mg/L (T0); 1 mg/L (T1); 2 mg/L (T2) dan 3 mg/L (T3). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali.

Setiap perlakuan dibutuhkan 90 mL untuk 3 cawan petri sehingga total media yang dibuat adalah 1440 mL. Komposisi Media ½ MS (Murashige and Skoog 1962), dibuat dengan cara mencampur 72 mL larutan stok A (hara makro); 1,44 mL larutan stok B (hara mikro); 1,44 mL larutan stok C (iodin); 0,72 mL larutan stok D (vitamin); 1,44 mL larutan stok E

(bufer), dan 28,8 g sukrosa dicampur dan dihomogenkan. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga mencapai volume 800 mL dihomogenkan dan dituangkan ke dalam 16 *Beaker glass* masing-masing sebesar 50 mL. Setelah itu, ditambahkan NAA dan TDZ sesuai perlakuan dan ditambahkan akuades hingga mencapai volume 85 mL. Setelah homogen pH larutan diukur, pH media yang digunakan adalah 5,2 (ditambahkan NaOH untuk menaikkan pH dan HCl untuk menurunkan pH). Larutan media ditambahkan akuades hingga 90 mL dan 0,72 g agar. Larutan media dipindahkan ke tabung erlenmeyer dan ditutup dengan aluminium foil dan diberi label sesuai dengan perlakuan. Selanjutnya, media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit. Setelah media suam-suam kuku, media dituang ke dalam cawan petri steril yang telah dipersiapkan sebelumnya. Cawan petri ditutup menggunakan wrap

## Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF yang telah disterilkan dengan sinar UV selama 2 jam. Daun planlet *N. mirabilis* dipotong dengan ukuran 0,5 cm X 0,5 cm menggunakan skalpel di dalam cawan petri steril yang dialasi dengan kertas saring. Eksplan ditanam pada cawan petri steril yang telah berisi media ½ MS padat sesuai dengan perlakuan. Eksplan diinkubasi di dalam rak gelap yaitu rak yang tidak terkena cahaya pada suhu 20-25°C.

## Pengamatan Eksplan.

Pengamatan eksplan dilakukan setiap hari setelah penanaman eksplan. Parameter yang diamati adalah waktu inisiasi kalus (hari), persentase eksplan yang tumbuh menjadi kalus (%), diameter (mm) dan ketebalan kalus (mm).

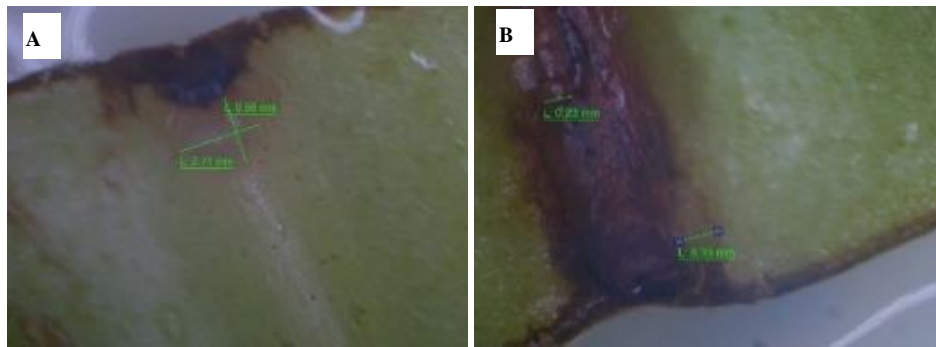
## Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam (Uji F) dengan taraf uji 0,05 dan 0,01. Uji lanjut menggunakan BNT pada taraf uji 0,05 dilakukan untuk parameter persentase kalus yang terbentuk dan diameter kalus.

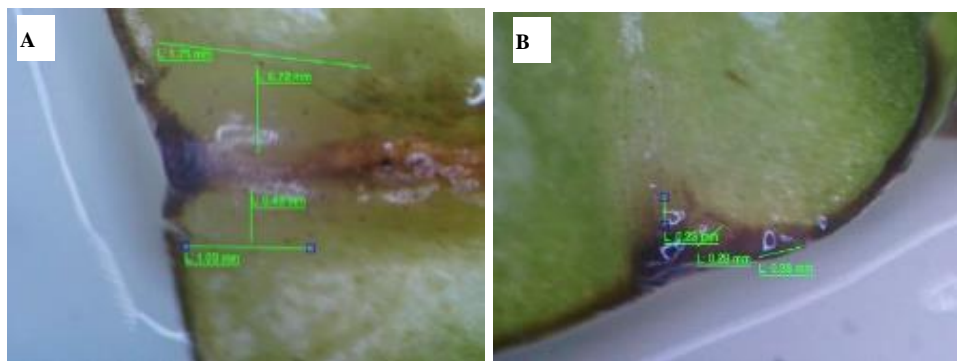
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis ragam pengaruh NAA dan TDZ terhadap waktu inisiasi pembentukan kalus *N. mirabilis* menunjukkan bahwa interaksi antara NAA dan TDZ tidak berpengaruh nyata, demikian pula untuk perlakuan NAA dan TDZ secara mandiri tidak berpengaruh nyata. Berdasarkan pengamatan, waktu tercepat inisiasi kalus eksplan *N. mirabilis* adalah 14 hari setelah tanam (hst). Kombinasi auksin dan sitokinin yang terdapat di dalam media dan tipe jaringan yang digunakan dapat mempengaruhi kecepatan pembentukan kalus (Mastuti *et al.*, 2020).

Kalus yang terbentuk dari eksplan daun planlet *N. mirabilis* adalah kalus proliferaatif yaitu kalus yang



**Gambar 1.** Kalus Daun *N. mirabilis* berumur 35 hari A. Kalus prolifertif pada perlakuan N0T3, B. Kalus senesen pada perlakuan N0T1.



**Gambar 2.** Letak Kemunculan Kalus pada Daun *N. mirabilis* berumur 35 hari.: A. Kalus yang muncul diujung tulang daun pada perlakuan N2T1, B. Kalus yang muncul ditepi daun pada perlakuan N2T2

aktif membelah (proliferasi) namun tidak dapat tumbuh menjadi embrio (Gambar 1a). Kalus prolifertif dicirikan oleh morfologi kalus terlihat bening, berding tipis dan berbutir-butir. Kalus yang terbentuk tidak berkembang ke tahap selanjutnya, bahkan dalam perkembangannya kalus ini mengalami senesens (Gambar 1b).

Kalus *N. mirabilis* terbentuk pada dua tempat yaitu daerah tepi daun dan ujung tulang daun yang mengalami bekas potong. Kalus yang terbentuk pada ujung tulang daun memiliki diameter dan tebal kalus yang lebih besar dibandingkan dengan kalus yang terbentuk di daerah tepi daun (Gambar 2). Kecepatan tumbuh kalus pada eksplan yang beragam diduga karena kemampuan eksplan dalam menyerap hara dan kemampuan sel melakukan pembelahan yang berbeda pada setiap eksplan. Setiap sel memiliki kepekaan yang berbeda terhadap ZPT sehingga kecepatan waktu pembelahan sel menjadi tidak sama karena siklus sel yang berbeda-beda (Saptiani *et al.*, 2020).

Hasil analisis ragam pengaruh penambahan NAA dan TDZ pada media tanam terhadap persentase kalus yang terbentuk menunjukkan tidak ada interaksi antara NAA dan TDZ. Sementara itu, pengaruh NAA dan TDZ secara mandiri berpengaruh nyata terhadap persentase kalus yang terbentuk.

Berdasarkan hasil uji BNT pengaruh NAA terhadap, persentase kalus yang terbentuk (Tabel 1). Perlakuan terbaik terjadi pada perlakuan N3 yaitu media yang diperkaya dengan NAA 1,5 mg/L. Persentase pembentukan kalus pada perlakuan N3 mengalami kenaikan sebesar 42,7% jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol (N0). Antara Perlakuan NAA 1 mg/L (N2) dan 1,5 mg/L (N3) tidak signifikan. Artinya, perlakuan N2 adalah perlakuan yang efektif dan efisien. Sementara itu, berdasarkan uji BNT pengaruh TDZ terhadap persentase kalus yang terbentuk ternyata persentase kalus terbaik terjadi pada perlakuan T2 (2 mg/L) dan T1 (TDZ 1 mg/L). Konsentrasi TDZ efisien dicapai pada perlakuan T1 (Tabel 2). Persentase kalus yang terbentuk pada perlakuan T1 mengalami kenaikan

**Tabel 1.** Pengaruh Penambahan NAA terhadap Persentase Kalus yang Terbentuk pada Eksplan *N. mirabilis*

Perlakuan	Persentase pembentukan kalus
N0	2,158 <sup>ab</sup>
N1	1,994 <sup>a</sup>
N2	2,799 <sup>bc</sup>
N3	3,079 <sup>c</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 0,05

**Tabel 2.** Pengaruh Penambahan TDZ terhadap Persentase Kalus yang Terbentuk pada Eksplan *N. mirabilis*

Perlakuan	Persentase pembentukan kalus
T0	1,799 <sup>a</sup>
T1	2,868 <sup>bc</sup>
T2	2,980 <sup>bc</sup>
T3	2,383 <sup>ab</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji. 0,05

sebesar 59,4% jika dibandingkan dengan persentase kalus yang terbentuk pada perlakuan kontrol (T0). Pemberian TDZ dengan konsentrasi rendah terbukti lebih efisien dalam menginduksi pembentukan kalus. Tariq *et al* (2014), menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara NAA dan TDZ terhadap persentase kalus yang terbentuk pada *Artemisia absinthium*

Hasil analisis ragam pengaruh aplikasi NAA dan TDZ menunjukkan bahwa interaksi antara NAA dan TDZ serta NAA secara mandiri tidak berpengaruh nyata. Namun, pemberian TDZ secara mandiri berpengaruh terhadap diameter kalus. Hasil uji BNT pengaruh perlakuan TDZ terhadap diameter kalus (Tabel 3) menunjukkan bahwa perlakuan T2 (2 mg/L) dan T1 (TDZ 1 mg/L) adalah konsentrasi yang paling efektif menghasilkan diameter kalus terbesar. Sementara itu, T1 adalah perlakuan yang efektif dan efisien dalam memacu diameter kalus. Diameter kalus perlakuan T1 mengalami kenaikan sebesar 20,8 % jika dibandingkan dengan diameter kalus pada tanaman kontrol (T0). Hoesen *et al* (2008), menyatakan bahwa konsentrasi TDZ dalam konsentrasi rendah dapat meningkatkan ukuran diameter kalus pada kultur *Dendrobium lineale* Rolfe. Soonthornkalump *et al.* (2019) mengungkapkan bahwa TDZ dapat berperan sebagai penghambat enzim sitokinin oksidase, yang merangsang akumulasi sitokinin berbasis purin endogen di dalam jaringan.

**Tabel 3.** Pengaruh Penambahan TDZ terhadap Diameter Kalus yang Terbentuk pada Eksplan *N. mirabilis*

Perlakuan	Diameter Kalus
T0	0,809 <sup>a</sup>
T1	0,977 <sup>bc</sup>
T2	0,997 <sup>bc</sup>
T3	0,965 <sup>b</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji. 0,05

Hasil analisis ragam pengaruh aplikasi NAA dan TDZ terhadap tebal kalus *N.mirabilis* menunjukkan bahwa interaksi antara NAA dan TDZ serta NAA dan TDZ secara mandiri tidak

berpengaruh terhadap rata-rata tebal kalus *N.mirabilis*.

Restanto *et al* (2018) menyatakan bahwa lebih baik mengkombinasikan TDZ dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibanding konsentrasi NAA. Pengaruh konsentrasi ZPT terhadap pertumbuhan akan meningkat sampai pertumbuhan mencapai optimal kemudian akan mengalami penurunan pertumbuhan ketika konsentrasi yang digunakan lebih tinggi dari konsentrasi optimal.

## SIMPULAN

Penambahan NAA dan TDZ terhadap induksi kalus *N. mirabilis* tidak terdapat interaksi antara NAA dan TDZ. Konsentrasi TDZ 1 mg/L (T1) memacu induksi kalus khususnya persentase pembentukan kalus dan diameter kalus. NAA 1 mg/L (N2) memacu persentase pembentukan kalus *N. mirabilis*.

## Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada proyek penelitian Terapan Unggulan Unsoed tahun 2019 atas dukungan dana yang telah diberikan.

## DAFTAR REFERENSI

- Ariani, R., Anggraito, Y.U. & Rahayu, E.S., 2016. Respon Pembentukan Kalus Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.) Pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP. *Jurnal MIPA*, 39(1), pp. 20-28.
- Chaveerach, A., Tanomtong, A., Sudmoon, R. & Tanee, T., 2006. Genetic Diversity Among Geographically Separated Populations of *Nepenthes mirabilis*. *Biologia*, 61(3), pp. 295–298.
- Dinarti, D., Sayekti, U. & Alitalia, Y., 2014. Kultur Jaringan Kantong Semar (*Nepenthes mirabilis*). *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 1(2), pp. 59-65.
- Hayati, S.K. & Nurchayati, Y., 2010. Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (*Medicago sativa*) secara in vitro dengan Penambahan Benzyl Amino Purine (BAP) dan Naphtalene Acetic Acid (NAA) Abstrak eksplan. *Bioma*, 12(1), pp. 6–12.
- Hoesen, D.S.H., Witjaksono & Sukamto, L.A., 2008. Callus Induction and Organogenesis of in vitro Culture *Dendrobium lineale* Rolfe. *Berita Biologi*, 9(3), pp. 333–341.
- Mansur, M., 2013. Tinjauan tentang *Nepenthes* (Nepenthaceae) di Indonesia. *Berita Biologi*, 12(1), pp. 1–7.
- Mardhiana, Parto, Y., Hayati, R. & Priadi, D.P., 2012. Karakteristik dan Kemelimpahan *Nepenthes*

- di Habitat Miskin Unsur Hara. *Jurnal Lahan Suboptimal*, 1(1), pp. 50–56.
- Mastuti, R., Widoretno, W. & Harijati, N., 2020. Kultur Kalus Tanaman Obat Ciplukan (*Physalis angulata* L.). *Journal of Tropical Biology*, 8(1), pp. 26-35.
- Munggarani, M., Suminar, E., Nuraini, A. & Mubarak, S., 2018. Multiplikasi Tunas Meriklon Kentang pada Berbagai Jenis dan Konsentrasi Sitokinin. *Agrologia*, 7(2). pp. 80-89.
- Restanto, D.P., Kriswanto, B., Khizim, M.N. & Soeparjono, S., 2018. Kajian Thidiazuron (TDZ) dalam Induksi PLB Anggrek *Phalaenopsis* sp secara In Vitro. *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 16(1), pp. 176-185.
- Rosmaina, R. & Aryani, D., 2015. Optimasi NAA dan BAP Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Tunas Mikro Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes mirabilis*) Secara In Vitro. *Jurnal Agroteknologi*, 5(2), pp. 29-36.
- Saptiani, E., Rahmi, H. & Muharam, (2020). Induksi Kalus Dari Eksplan Daun Tanaman Kawista (*Limonia acidissima* L.) Secara In Vitro pada Media MS dengan Penambahan Beberapa Konsentrasi Air Kelapa (*Cocos nucifera* L.). *Jurnal Agrotek Indonesia*, 2(5), pp. 1–45.
- Soonthornkalump, S., Nakkanong, K. & Meesawat, U., 2019. In Vitro Cloning Via Direct Somatic Embryogenesis And Genetic Stability Assessment Of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.F.) Stein: The Endangered Venus's Slipper Orchid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 55(3), pp. 265–276.
- Tariq, U., Ali, M. & Abbasi, B.H., 2014. Morphogenic and Biochemical Variations Under Different Spectral Lights in Callus Cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 130, pp. 264–271.