

**MULTIPLIKASI *IN VITRO* ANGGREK HITAM (*Coelogyne pandurata* Lindl.)  
PADA PERLAKUAN KOMBINASI NAA DAN BAP*****In Vitro* Multiplication of Black Orchid (*Coelogyne pandurata* Lindl.)  
Using the Combination of NAA and BAP****Roni Kartiman<sup>1</sup>, Dewi Sukma<sup>2</sup>, Syarifah Iis Aisyah<sup>2</sup>, Agus Purwito<sup>2\*</sup>,**<sup>1</sup>Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, IPB.  
Jl. Raya Dramaga, Bogor 16680<sup>2</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor 16680\*Email: [apurwito@yahoo.com](mailto:apurwito@yahoo.com)**ABSTRACT**

*Black orchid is an indigenous plant from Kalimantan, Indonesia. It becomes endangered because of forest over-exploitation and its low natural reproduction rate. Tissue culture is considered to offer a solution to conserve and propagate this species. The aim of this research was to evaluate the effect of Naphtalene Acetic Acid (NAA) and 6-Benzile Amino Purine (BAP) on shoots multiplication of black orchid. The basic medium used was a half of Murashige & Skoog (MS) composition supplemented with 150 mL<sup>-1</sup> coconut water. Initial explants used were 6-month-old shoots of germinating seeds. The shoot cultures were incubated for 23 weeks. Results showed that the best combination for shoot multiplication was NAA 0.0 mgL<sup>-1</sup> with BAP 0.2 mgL<sup>-1</sup>. Shoot grew better on medium with BAP and without NAA while roots growth was better on medium without the two plant growth regulators. The addition of BAP up to 0.3 mgL<sup>-1</sup> increased the leaf number, which however decreased at higher BAP concentration.*

**Keywords:** BAP, black orchid, *Coelogyne pandurata*, multiplication, NAA**ABSTRAK**

Anggrek hitam merupakan flora langka asli Kalimantan, Indonesia. Keberadaa anggrek ini di alam semakin langka akibat eksploitasi berlebihan dan sulitnya perbanyak secara alami. Kultur jaringan merupakan metode untuk mengatasi kelangkaan anggrek ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi NAA dan BAP terhadap multiplikasi anggrek hitam. Media dasar yang digunakan adalah ½ MS dengan penambahan air kelapa 150 mL<sup>-1</sup>. Eksplan yang digunakan adalah tunas hasil semai biji umur 6 bulan. Kultur tunas diinkubasi selama 23 minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi terbaik untuk multiplikasi tunas adalah NAA 0 mgL<sup>-1</sup> dengan BAP 0,2 mgL<sup>-1</sup>. Tunas tumbuh lebih baik dalam media dengan penambahan BAP tanpa NAA, sedangkan akar pada media tanpa NAA dan BAP. Penambahan BAP sampai 0.3 mgL<sup>-1</sup> mampu meningkatkan jumlah daun, namun menurun dengan penambahan di atas konsentrasi tersebut.

**Kata Kunci:** anggrek hitam, BAP, *Coelogyne pandurata*, multiplikasi, NAA

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki hutan tropis terbesar dan memiliki kekayaan spesies anggrek yang sangat beragam. Tanaman anggrek termasuk ke dalam anggota famili *Orchidaceae*. Famili ini terdiri atas 800 genus dan tidak kurang dari 25.000 spesies. Dari jumlah tersebut diperkirakan 5.000 spesies diantaranya berasal dari Indonesia (Adi et al. 2014). Salah satu anggrek alam yang dianggap sebagai ciri khas Indonesia adalah anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.).

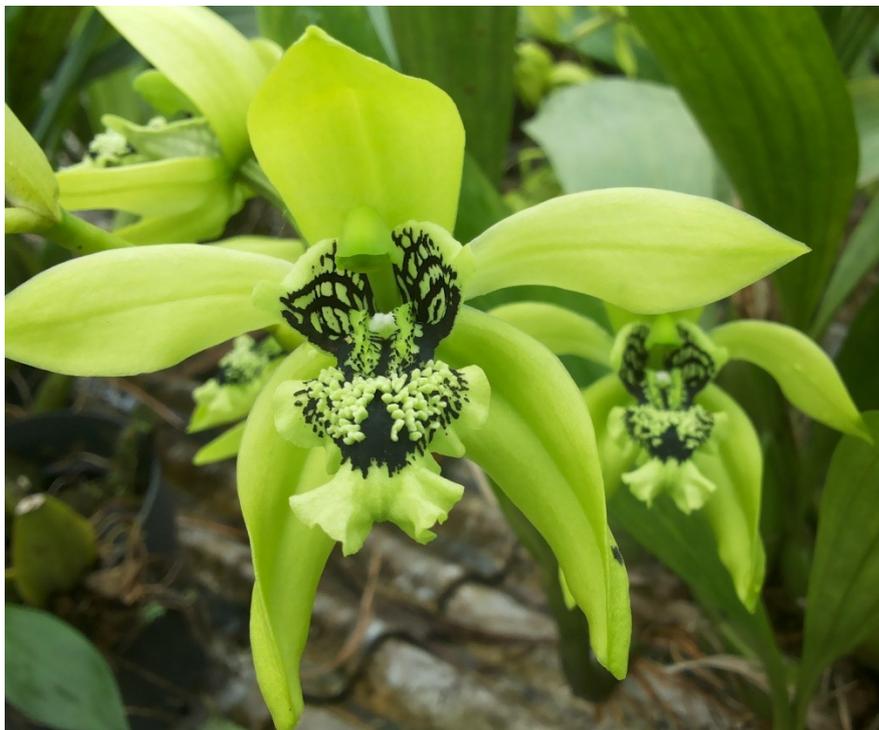
Anggrek hitam (Gambar 1) merupakan anggrek spesies asli Kalimantan. Nama anggrek hitam diberikan karena bunga anggrek ini memiliki tanda hitam pada bibirnya yang membentang sampai bagian dalam bunga, sedangkan mahkota bunga dan kelopak bunga anggrek hitam berwarna hijau cerah (Gravendeel 2000). Di habitat aslinya, anggrek ini berbunga pada bulan Mei-Juni, dengan bunganya yang berbau harum lembut dan lama mekar bunga sekitar 5-7 hari (Untari 2003).

Populasi anggrek hitam di habitat aslinya hampir punah akibat pengambilan yang berlebihan, kerusakan hutan dan konversi lahan. Selain itu juga periode

berbunga anggrek ini sangat pendek dan sulit untuk disilangkan (Untari 2003).

Perbanyakan anggrek hitam secara konvensional melalui stek batang, pembelahan rumpun, penggunaan *pseudobulb* atau pemisahan anakan sulit dilakukan karena keterbatasan tanaman induk di alam (Adi et al. 2014). Demikian juga perkembangbiakan alami anggrek hitam dengan biji di habitat aslinya sangat sulit karena lambatnya pertumbuhan biji yang harus bersimbiosis dengan mikoriza yang ada dan cocok, sehingga laju pertumbuhan dari fase biji sampai tanaman dewasa yang siap berbunga sangat lama (Untari 2003). Perbanyakan konvensional yang sulit dilakukan ini dapat diatasi dengan teknik kultur jaringan (*in vitro*) sebagai salah satu usaha konservasi mencegah untuk kepunahan anggrek hitam.

Dalam kultur jaringan anggrek ada beberapa tahapan yang dilalui yaitu sterilisasi bahan tanam (eksplan berupa biji maupun bagian vegetatif tanaman), pengecambahan benih (dalam media hingga membentuk protocorm atau PLBs (*Protocorm Like Bodies*), multiplikasi dan regenerasi planlet, pengakaran dan aklimatisasi. Multiplikasi tunas merupakan tahapan yang sangat penting dalam



**Gambar 1.** Bunga anggrek hitam (*C. pandurata* Lindl.)

perbanyak anggrek secara kultur jaringan. Media Murashige dan Skoog (MS) merupakan media yang banyak digunakan dalam kultur *in vitro*. Teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman-tanaman baru anggrek hitam yang secara genetik identik dengan induknya, dalam jumlah banyak dan tidak tergantung musim. Penelitian kultur jaringan anggrek telah banyak dilakukan. Putri (2015) menyatakan bahwa media  $\frac{1}{2}$  MS dengan penambahan air kelapa 15% sudah efektif dalam pertumbuhan dan multiplikasi *clumps* PLBs *Phalaenopsis* hibrida. Media  $\frac{1}{2}$  MS dengan penambahan 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa sangat efektif menginduksi kalus dari PLBs anggrek *Phalaenopsis* var. Hawaiian Clouds x Carmela's Dream (Ling et al. 2007). Penelitian Untari (2003) menunjukkan bahwa media dasar VW (Vacint dan Went) dengan penambahan ekstrak pisang ambon 150 g L<sup>-1</sup> dan NAA 20 ppm mampu memacu dan menghasilkan rata-rata jumlah tunas tertinggi pada kultur jaringan *Coelogyne pandurata* Lindl.

Zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin dan sitokinin dapat digunakan untuk memacu pertumbuhan. Zat pengatur tumbuh 1-*Naphtalene Acetic Acid* (NAA) merupakan salah satu ZPT golongan auksin, 6-*Benzile Amino Purine* (BAP) merupakan golongan sitokinin. Zat pengatur tumbuh ini memiliki kisaran luas dalam memacu suatu pertumbuhan sehingga kisaran konsentrasi NAA dan BAP yang digunakan tidak menyebabkan terhambatnya pertumbuhan tanaman. NAA pada konsentrasi tertentu berfungsi sebagai inisiasi akar dan batang tanaman, sedangkan BAP berfungsi untuk memacu inisiasi tunas (Restiani et al. 2016). Zat pengatur tumbuh jenis NAA dan BAP mudah di dapat di pasaran dan relatif murah dibandingkan jenis auksin dan sitoninin

lainnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kombinasi NAA dan BAP pada berbagai konsentrasi terhadap kemampuan multiplikasi tunas dari eksplan *C. pandurata* Lindl., sehingga diharapkan diperoleh konsentrasi optimum yang dapat digunakan secara luas untuk perbanyak anggrek *C. pandurata* Lindl.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian telah dilaksanakan selama 10 bulan (Juli 2016 - April 2017) di Laboratorium Kultur Jaringan 1, Laboratorium Mikroteknik dan Laboratorium Pasca Panen, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor, Propinsi Jawa Barat.

### Bahan dan alat

Bahan tanaman yang digunakan adalah tunas *in vitro* anggrek *C. pandurata* Lindl. yang berumur 6 bulan setelah semai biji, media  $\frac{1}{2}$  MS, zat pengatur tumbuh NAA dan BAP, air kelapa muda umur simpan 1 hari di dalam lemari pendingin, alkohol, aquades, spirtus, agar dan gula pasir.

Alat yang digunakan berupa alat-alat laboratorium dan alat-alat tanam yaitu *laminar air flow cabinet* (L AFC), autoklaf, timbangan analitik, labu *Erlenmeyer*, gelas ukur, gelas piala, pH meter, cawan Petri, pipet, pengaduk, jarum injeksi, pinset, *scalpel*, lampu spirtus, *hand sprayer*, kompor gas, oven, korek api, *aluminium foil*, rak kultur dan botol media.

### Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) 2 faktor. Faktor pertama adalah NAA yang terdiri dari

**Tabel 1.** Kombinasi perlakuan konsentrasi NAA dan BAP

ZPT	NAA			
	Konsentrasi	0,0 mgL <sup>-1</sup>	0,2 mgL <sup>-1</sup>	0,5 mgL <sup>-1</sup>
BAP	0,0 mgL <sup>-1</sup>	N0B0	N1B0	N2B0
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	N0B1	N1B1	N2B1
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	N0B2	N1B2	N2B2
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	N0B3	N1B3	N2B3
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	N0B4	N1B4	N2B4
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	N0B5	N1B5	N2B5

3 taraf konsentrasi, yaitu 0,0 (N0); 0,2 (N1) dan 0,5 (N2)  $\text{mgL}^{-1}$ . Sedangkan faktor kedua adalah BAP yang terdiri dari 5 taraf konsentrasi, yaitu 0,0 (B0); 0,1 (B1); 0,2 (B2); 0,3 (B3); 0,4 (B4) dan 0,5 (B5)  $\text{mgL}^{-1}$  sehingga diperoleh 18 kombinasi perlakuan (Tabel 1). Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali, setiap ulangan terdiri atas 3 botol kultur yang di dalamnya ada 3 tanaman.

### Sterilisasi

Alat-alat yang digunakan ketika penanaman, harus dalam keadaan steril. Alat-alat logam dan gelas disterilkan dalam oven. Alat-alat tersebut dibungkus dengan kertas tebal (kertas merang atau kertas kopi) kemudian dimasukkan ke dalam oven selama 24 jam dengan suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Sterilisasi botol kultur dilakukan dengan pencucian terlebih dahulu menggunakan deterjen kemudian dibilas dengan air bersih. Botol-botol yang sudah bersih dikeringanginkan dulu beberapa saat sampai airnya kering, kemudian dimasukan ke dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Alat-alat seperti pinset dan scalpel dapat disterilisasi kembali dengan pemanasan di atas api spiritus, setelah dicelupkan ke dalam alkohol 96% sebelum dilakukan penanaman.

Media dan aquades disterilisasi dalam autoklaf sebelum digunakan. Air aquades disterilisasi dalam botol selai sebanyak 75 mL ditutup dengan tutup botol plastik anti panas, kemudian dimasukan ke dalam autoklaf selama 30 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ . Media kultur disterilisasi dengan cara yang sama seperti sterilisasi air aquades.

Kebersihan lingkungan khusus berupa LAFC dilakukan dengan menyemprot permukaan tempat kerja dengan alkohol 70%, kemudian dilap dengan tissue. *Blower* (peniup udara) dan lampu *ultra violet* dalam LAFC dinyalakan selama 15-60 menit sebelum digunakan dengan tujuan untuk membersihkan kontaminan di permukaan tempat kerja. Sehabis kerja, permukaan tempat kerja dibersihkan kembali dengan alkohol 70% atau dengan lampu *ultra violet* selama 30-60 menit.

### Pembuatan media

Langkah awal yang dilakukan dalam

pembuatan media adalah membuat larutan stok yang terdiri atas larutan stok makro  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; larutan stok mikro  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; larutan stok FE-EDTA yang berasal dari campuran  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  serta larutan stok vitamin dan larutan stok NAA dan BAP. Untuk media MS penuh masing-masing stok diambil 10  $\text{mLL}^{-1}$ .

Pembuatan media  $\frac{1}{2}$  MS dilakukan dengan memasukkan seluruh larutan stok baik makro, mikro, vitamin dan FE-EDTA masing-masing 5  $\text{mLL}^{-1}$ . Selanjutnya media  $\frac{1}{2}$  MS ini ditambah gula pasir 30  $\text{g L}^{-1}$ , agar-agar 8  $\text{g L}^{-1}$  dan air kelapa 150  $\text{mLL}^{-1}$ , serta ZPT sesuai dengan kombinasi perlakuan yang telah ditentukan (Tabel 1), media kemudian ditera menjadi satu liter dengan penambahan aquades.

Tingkat kemasaman (pH) larutan diukur dengan menggunakan pH meter. pH diatur hingga mencapai 5,6-5,8 dengan penambahan KOH bila  $\text{pH} < 5,6$  dan HCl bila  $\text{pH} > 5,8$ . Larutan media selanjutnya dipanaskan sampai larut dan mendidih. Media yang telah mendidih dituangkan ke dalam botol kira-kira sebanyak 30 mL, dan ditutup dengan tutup plastik tahan panas. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.

### Penanaman

Rumpun-rumpun eksplan anggrek hitam dipisah masing-masing menjadi 1 tanaman, kemudian ditanam pada botol media yang telah disiapkan sesuai dengan perlakuan. Setiap botol kultur yang digunakan ditanami tiga eksplan tanaman yang ukurannya seragam (8-20 mm). Proses penanaman dilakukan dalam LAFC.

### Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 23 minggu. Parameter/peubah yang diamati terdiri dari: tinggi tanaman (mm) (diukur dari permukaan media sampai ujung tertinggi tanaman), panjang daun maksimum (mm) (diukur dari pangkal hingga ujung daun), lebar daun maksimum (mm) (diukur pada daun terlebar), jumlah daun (buah) (dengan menghitung jumlah daun pada saat pengamatan), jumlah akar (buah)

(dengan menghitung jumlah akar pada saat pengamatan), panjang akar terpanjang (mm) (diukur dari pangkal hingga ujung akar), jumlah PLBs (buah) yang terbentuk (dengan menghitung jumlah PLBs pada saat pengamatan), jumlah tunas baru yang terbentuk (buah) (dengan menghitung jumlah tunas pada saat pengamatan). Parameter-parameter diatas diukur dari luar botol dengan menggunakan penggaris, sedangkan eksplan yang diamati tetap berada di dalam botol.

Selain pengamatan parameter-parameter di atas, diamati juga saat pembentukan PLBs, akar dan tunas pertama serta anatomi stomata yang mengacu metode Gantait et al. (2011) dan kandungan kloroplas dengan metode Sims dan Gamon (2003). Uji anatomi stomata meliputi pengamatan jumlah stomata yang dilakukan pada dua bidang pandang, panjang dan lebar stomata diamati pada tiga bidang pandang yang dipilih secara acak, masing-masing seluas 0,19625 mm<sup>2</sup>. Pengamatan stomata dilakukan menggunakan mikroskop Olympus tipe BX 51, kamera tipe DP 25 dengan perangkat lunak program Olympus DP2-BSW.

#### Analisis data

Data dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA), jika hasil yang didapat berbeda nyata, dilanjutkan dengan Uji Duncan pada selang kepercayaan 95% (Pramesti 2011).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis ragam (ANOVA) terhadap respon pertumbuhan *in vitro* pada 23 minggu setelah tanam (MST) disajikan

pada Tabel 2. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa NAA berpengaruh nyata terhadap semua peubah yang diamati, sedangkan BAP hanya berpengaruh nyata terhadap tinggi tanaman dan panjang daun. Interaksi NAA dan BAP berpengaruh nyata terhadap peubah tinggi tanaman, panjang daun, jumlah daun, panjang akar dan jumlah tunas. Pada semua perlakuan dalam percobaan ini, PLBs sama sekali tidak terbentuk sehingga tidak dapat dianalisis.

#### Tinggi tanaman

Tinggi tanaman pada kombinasi perlakuan NAA dan BAP disajikan pada Tabel 3. Tanaman tertinggi dihasilkan pada media ½ MS tanpa penambahan ZPT sebesar 39,335 mm namun tidak berbeda nyata dengan media tanpa NAA yang ditambahkan BAP 0,1 hingga 0,4 mgL<sup>-1</sup>. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semua perlakuan tanpa NAA memacu tinggi tanaman. Konsentrasi auksin alami dalam tanaman (endogen) diduga sudah mencukupi untuk mendorong pertumbuhan tinggi tanaman. Pertambahan tinggi eksplan disebabkan oleh dua proses yaitu pembelahan dan pemanjangan sel, kedua proses ini terjadi pada jaringan meristem, yaitu pada titik tumbuh batang sehingga tanaman tumbuh semakin besar dan berkorelasi positif dalam menentukan hasil tanaman (Untari 2003). Menurut Untari (2003) pada anggrek hitam yang mendapat perlakuan media dasar VW tanpa penambahan bahan organik dan NAA memberikan rata-rata tinggi planlet terbaik.

Peningkatan konsentrasi NAA dan BAP cenderung menekan tinggi tanaman (Tabel 3). Menurut Untari (2003) bahwa batang dan akar yang sedang memanjang

**Tabel 2.** Rekapitulasi analisis ragam respon pertumbuhan vegetatif anggrek hitam pada 23 MST

No	Peubah	NAA	BAP	NAA * BAP
1	Tinggi tanaman	**	**	*
2	Panjang daun	**	**	**
3	Jumlah daun	**	tn	*
4	Lebar daun	**	tn	tn
5	Panjang akar	**	tn	**
6	Jumlah akar	**	tn	tn
7	Jumlah tunas	**	tn	*

Keterangan: tn : tidak berbeda nyata, \*: berbeda nyata pada  $\alpha=5\%$ , \*\*: sangat berbeda nyata pada  $\alpha=1\%$

tidak memerlukan penambahan sitokinin, walaupun kedua organ tersebut dalam pertumbuhannya memerlukan hormon tersebut untuk proses pemanjangan sel, tetapi kandungan alami sitokinin dalam jaringan tanaman kemungkinan sudah mencukupi. Terkait dengan hal tersebut, kandungan auksin endogen dalam tanaman tunas-tunas *in vitro* anggrek hitam diduga sudah cukup tinggi, sehingga penambahan auksin eksogen akan meningkatkan perimbangan total auksin dan sitokinin

dalam kultur dan menekan pertumbuhan tinggi tanaman.

**Jumlah, panjang dan lebar daun**

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan adanya pengaruh interaksi NAA dan BAP terhadap jumlah daun dan panjang daun, sedangkan lebar daun hanya dipengaruhi secara nyata oleh NAA (Tabel 3). Rataan jumlah dan panjang daun tanaman anggrek hitam *in vitro* disajikan pada Tabel 4 dan 5.

**Tabel 3.** Rataan tinggi tanaman (mm) *in vitro* anggrek hitam pada perlakuan NAA dan BAP pada 23 MST.

ZPT	NAA			
	Konsentrasi	0,0 mgL <sup>-1</sup>	0,2 mgL <sup>-1</sup>	0,5 mgL <sup>-1</sup>
BAP	0,0 mgL <sup>-1</sup>	39,335 <sup>a</sup>	24,918 <sup>bc</sup>	26,835 <sup>bc</sup>
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	38,113 <sup>a</sup>	21,330 <sup>cd</sup>	23,918 <sup>bc</sup>
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	35,058 <sup>a</sup>	17,113 <sup>d</sup>	21,083 <sup>cd</sup>
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	38,113 <sup>a</sup>	23,500 <sup>bc</sup>	21,585 <sup>cd</sup>
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	33,750 <sup>a</sup>	23,085 <sup>bcd</sup>	26,948 <sup>bc</sup>
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	28,250 <sup>b</sup>	22,750 <sup>bcd</sup>	25,470 <sup>bc</sup>

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji DMRT pada α = 5%.

**Tabel 4.** Rataan jumlah daun (buah) anggrek hitam *in vitro* pada perlakuan NAA dan BAP pada 23 MST.

ZPT	NAA			
	Konsentrasi	0,0 mgL <sup>-1</sup>	0,2 mgL <sup>-1</sup>	0,5 mgL <sup>-1</sup>
BAP	0,0 mgL <sup>-1</sup>	27,14 <sup>bc</sup>	29,22 <sup>abc</sup>	13,81 <sup>f</sup>
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	23,86 <sup>cde</sup>	24,22 <sup>cd</sup>	15,72 <sup>def</sup>
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	36,75 <sup>a</sup>	16,69 <sup>def</sup>	15,86 <sup>def</sup>
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	37,11 <sup>a</sup>	22,03 <sup>cf</sup>	14,19 <sup>ef</sup>
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	35,81 <sup>ab</sup>	25,48 <sup>cd</sup>	13,78 <sup>f</sup>
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	31,36 <sup>ab</sup>	24,97 <sup>cd</sup>	17,19 <sup>def</sup>

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji DMRT pada α = 5%.

**Tabel 5.** Rataan panjang daun (mm) anggrek hitam *in vitro* pada perlakuan NAA dan BAP pada 23 MST

ZPT	NAA			
	Konsentrasi	0 mgL <sup>-1</sup>	0,2 mgL <sup>-1</sup>	0,5 mgL <sup>-1</sup>
BAP	0 mgL <sup>-1</sup>	25,81 <sup>a</sup>	13,61 <sup>de</sup>	12,09 <sup>def</sup>
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	24,09 <sup>ab</sup>	9,67 <sup>ef</sup>	11,61 <sup>def</sup>
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	19,81 <sup>bc</sup>	7,49 <sup>f</sup>	9,67 <sup>ef</sup>
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	24,59 <sup>ab</sup>	12,39 <sup>def</sup>	13,19 <sup>de</sup>
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	20,33 <sup>bc</sup>	10,08 <sup>ef</sup>	16,64 <sup>cd</sup>
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	15,42 <sup>cd</sup>	11,78 <sup>def</sup>	14,83 <sup>de</sup>

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji DMRT pada α = 5%.

Rata-rata jumlah daun tertinggi yaitu pada media dengan penambahan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,3 mgL<sup>-1</sup> yaitu sebesar 37,11 mm, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,2 mgL<sup>-1</sup> sebesar 36,75 mm (Tabel 4), sedangkan rata-rata panjang daun tertinggi terdapat pada media tanpa penambahan ZPT yaitu 25,81 mm (Tabel 5). Auksin dan sitokinin merupakan dua jenis ZPT tanaman yang seringkali digunakan untuk menginduksi morfogenesis tanaman. NAA dan BAP merupakan jenis ZPT yang memiliki kisaran luas dalam memacu dan menghambat suatu pertumbuhan. NAA pada konsentrasi tertentu berfungsi untuk inisiasi akar dan batang tanaman, sedangkan BAP berfungsi untuk memacu inisiasi tunas. Menurut Suhentaka (2010) interaksi auksin dan sitokinin yang sangat nyata menunjukkan bahwa perlakuan sitokinin tidak dapat dilepaskan dari pengaruh auksin, sehingga dalam penggunaan sitokinin, baik efek mendorong maupun efek menghambat proses pembelahan sel tergantung dari adanya fitohormon lainnya. Dalam perlakuan ini sitokinin cenderung meningkatkan jumlah

daun namun menekan panjang daun. Diduga konsentrasi sitokinin (BAP) yang ditambahkan dan auksin endogen sudah memberikan perimbangan yang sesuai untuk memacu pembelahan sel dalam pembentukan organ daun. Terlihat bahwa penambahan BAP sampai konsentrasi 0,3 mgL<sup>-1</sup> mampu meningkatkan jumlah daun, kemudian menurun seiring dengan penambahan BAP diatas konsentrasi tersebut (Tabel 4), berbeda pada NAA semakin tinggi konsentrasi NAA yang diberikan (N1 dan N2) maka jumlah daun lebih sedikit dibandingkan N0.

### Panjang akar

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan jumlah akar hanya dipengaruhi oleh perlakuan NAA sedangkan panjang akar dipengaruhi oleh interaksi NAA dan BAP (Tabel 2). Akar mulai tumbuh pada minggu ke-4 setelah tanam yaitu pada media tanpa ZPT eksogen (kontrol), diikuti minggu ke-6 pada perlakuan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,2 mgL<sup>-1</sup> dan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,3 mgL<sup>-1</sup> sedangkan pada perlakuan-perlakuan

**Tabel 6.** Rataan panjang akar (mm) anggrek hitam *in vitro* pada perlakuan NAA dan BAP pada 23 MST.

ZPT	NAA			
	Konsentrasi	0,0 mgL <sup>-1</sup>	0,2 mgL <sup>-1</sup>	0,5 mgL <sup>-1</sup>
BAP	0,0 mgL <sup>-1</sup>	<b>23,583<sup>a</sup></b>	4,028 <sup>de</sup>	7,503 <sup>cde</sup>
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	21,638 <sup>ab</sup>	1,055 <sup>e</sup>	8,638 <sup>cde</sup>
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	14,503 <sup>bc</sup>	0,890 <sup>e</sup>	7,110 <sup>cde</sup>
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	23,503 <sup>a</sup>	2,610 <sup>de</sup>	6,388 <sup>cde</sup>
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	11,168 <sup>cd</sup>	2,138 <sup>de</sup>	15,333 <sup>abc</sup>
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	11,055 <sup>cd</sup>	7,250 <sup>cde</sup>	11,168 <sup>cd</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji DMRT pada  $\alpha = 5\%$ .

**Tabel 7.** Rataan jumlah tunas (buah) anggrek hitam *in vitro* pada perlakuan NAA dan BAP pada 23 MST.

ZPT	NAA			
	Konsentrasi	0,0 mgL <sup>-1</sup>	0,2 mgL <sup>-1</sup>	0,5 mgL <sup>-1</sup>
BAP	0,0 mgL <sup>-1</sup>	5,805 <sup>bcd</sup>	6,055 <sup>a,d</sup>	<b>1,723<sup>e</sup></b>
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	3,613 <sup>cde</sup>	5,583 <sup>bcd</sup>	2,500 <sup>e</sup>
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	<b>8,945<sup>a</sup></b>	3,528 <sup>cde</sup>	2,250 <sup>e</sup>
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	7,778 <sup>ab</sup>	4,475 <sup>cde</sup>	2,195 <sup>e</sup>
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	7,778 <sup>ab</sup>	6,475 <sup>abc</sup>	2,028 <sup>e</sup>
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	6,418 <sup>abc</sup>	5,643 <sup>bcd</sup>	3,248 <sup>de</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji DMRT pada  $\alpha = 5\%$ .

lainnya akar baru tumbuh pada 7 MST (minggu setelah tanam).

Pada Tabel 6 secara umum terlihat bahwa peningkatan konsentrasi NAA dan BAP menekan panjang akar. Rata-rata panjang akar tertinggi terlihat pada perlakuan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,0 mgL<sup>-1</sup> (23,583 mm), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> (21,638 mm) dan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,3 mgL<sup>-1</sup> (23,503 mm) (Tabel 6). Hatta et al. (2008) menyatakan bahwa penambahan sitokinin mempengaruhi pembelahan sel dan morfogenesis, sedangkan auksin berperan mengatur pertumbuhan dan pemanjangan sel. Rata-rata panjang akar tertinggi pada perlakuan tanpa penambahan ZPT diduga karena kandungan auksin endogen yang sudah cukup tinggi sehingga mampu menginduksi pertumbuhan akar, akibatnya penambahan auksin eksogen akan menekan pemanjangan akar. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kurnianingsih et al. (2009) yang menyatakan bahwa eksplan tunas samping *Anthurium* yang ditanam pada media kultur menghasilkan auksin endogen dengan konsentrasi cukup tinggi sehingga pertumbuhan eksplan lebih diarahkan pada pemanjangan sel dan pembentukan akar.

### Jumlah tunas

Jumlah tunas merupakan parameter penting dalam kultur jaringan, karena semakin banyak tunas yang terbentuk akan memberikan peluang didapatkan bibit dalam jumlah banyak pula. Kultur anggrek hitam (*C. pandurata* Lind.) memperlihatkan proliferasi pada medium perlakuan (Tabel 7). Penelitian ini memperlihatkan bahwa rata-rata jumlah tunas tertinggi pada perlakuan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,2 mgL<sup>-1</sup> sebesar 8,945 buah (Tabel 7, Gambar 2c) lebih tinggi dibanding kontrol yang hanya mencapai

5,805 buah (Gambar 2a). Laju multiplikasi sebesar 8,945 yang artinya setiap satu tunas anggrek hitam yang ditanam pada media ½ MS dengan penambahan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,2 mgL<sup>-1</sup> akan mampu menghasilkan tunas baru sebanyak 8,945 buah. Pertumbuhan dan perkembangan suatu kultur dipengaruhi oleh perimbangan antara hormon yang ditambahkan ke dalam media (hormon eksogen) dan hormon yang dihasilkan oleh tanaman itu sendiri (hormon endogen). Perbandingan antara sitokinin dan auksin yang tinggi maka akan mendorong terbentuknya tunas, sedangkan perbandingan sitokinin dan auksin rendah akan mendorong terbentuknya akar. Menurut Paramartha et al. (2012) meningkatnya auksin di dalam sel merupakan stimulus untuk aktivasi sitokinin. Aktifnya sitokinin diikuti dengan aktifnya enzim yang menaikkan sintesis protein yang merupakan protein pembangun sel sehingga menyebabkan terbentuknya sel-sel baru yang pada akhirnya terdiferensiasi menjadi organ tertentu.

Pengaruh BAP terhadap multiplikasi tunas terlihat juga pada penelitian Fithriyandini et al. (2015) yang melaporkan bahwa penambahan BAP 2,5 ppm pada media ½ MS terhadap anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis*) memberikan hasil jumlah PLBs, waktu muncul tunas, jumlah tunas dan jumlah daun terbaik. Penelitian pada tanaman anggrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) yang dilakukan Markal et al. (2015) menunjukkan bahwa waktu terbentuknya tunas tercepat, jumlah tunas terbanyak dan jumlah daun terbanyak terjadi pada media yang ditambahkan BAP 1 mgL<sup>-1</sup> dan NAA 0,5 mgL<sup>-1</sup>. Penelitian Karyanti dan Kartini (2017) pada tanaman Satoimo (*Colocasia esculenta* (L) Schoot var *antiquorum*) memperlihatkan hasil bahwa pemberian sitokinin (TDZ) dan kasein



**Gambar 2.** Keragaan tunas *in vitro* pada berbagai media perlakuan pada 23 MST: (a). media kontrol (tanpa zpt), (b). media perlakuan NAA 0 mgL<sup>-1</sup> + BAP 0,2 mgL<sup>-1</sup>, (c). media perlakuan NAA 0,5 mgL<sup>-1</sup> + BAP 0 mgL<sup>-1</sup>.

hidrolisat memberikan pengaruh sangat nyata terhadap jumlah tunas tanaman Satoimo. Menurut Arti dan Mukarlina (2017) sitokinin memacu pembelahan sel tunas, dimana rasio auksin endogen dan sitokinin eksogen yang berimbang menyebabkan pertumbuhan sel-sel meristem yang akan membelah dan berkembang menjadi tunas. Harjadi (2009) menyatakan bahwa pemberian BAP memacu sintesis protein sehingga mendorong terjadinya pembelahan sel yang menginduksi terbentuknya tunas.

Rata-rata jumlah tunas terendah terdapat pada perlakuan NAA 0,5 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,0 mgL<sup>-1</sup> sebesar 1,723 buah (Gambar 2b) , diduga akibat tingginya kandungan auksin endogen dan auksin eksogen (NAA) yang diberikan sehingga rasio auksin dan sitokinin menjadi tinggi yang berakibat terhambatnya pembentukan tunas.

Waktu muncul tunas merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang menunjukkan bahwa tanaman responsif terhadap perlakuan. Waktu muncul tunas

diamati setiap minggu. Tunas pertama muncul pada minggu ke-5 pada perlakuan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,0 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0,2 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,3 mgL<sup>-1</sup> dan NAA 0,2 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup>. Selanjutnya perlakuan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,2 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,3 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0,2 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,2 mgL<sup>-1</sup> dan NAA 0,2 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup> pada minggu ke-6, sedangkan perlakuan lainnya baru menunjukkan keluarnya tunas baru pada minggu ke-7.

### Klorofil

Klorofil merupakan pigmen berwarna hijau yang berfungsi sebagai penyerap cahaya dalam kegiatan fotosintesis (Bakti 2009). Hasil uji klorofil pada daun anggrek hitam dengan metode Sims dan Gamon (2003) terlihat pada Tabel 8 yang memperlihatkan bahwa jumlah klorofil total menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata antara beberapa perlakuan.

**Tabel 8.** Rataan jumlah klorofil (mgg<sup>-1</sup>) anggrek hitam *in vitro* pada perlakuan NAA an BAP pada 23 MST.

ZPT	Konsentrasi	NAA								
		0,0 mgL <sup>-1</sup>			0,2 mgL <sup>-1</sup>			0,5 mgL <sup>-1</sup>		
		a	b	Total	a	b	Total	a	b	Total
BAP	0,0 mgL <sup>-1</sup>	0,95 <sup>a</sup>	0,41 <sup>ab</sup>	1,35 <sup>a</sup>	0,44 <sup>cf</sup>	0,21 <sup>cde</sup>	0,64 <sup>cde</sup>	0,43 <sup>cf</sup>	0,21 <sup>cde</sup>	0,64 <sup>cde</sup>
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	0,37 <sup>def</sup>	0,19 <sup>de</sup>	0,55 <sup>de</sup>	0,42 <sup>cf</sup>	0,22 <sup>be</sup>	0,64 <sup>cde</sup>	0,35 <sup>ef</sup>	0,15 <sup>de</sup>	0,49 <sup>de</sup>
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	0,32 <sup>f</sup>	0,17 <sup>de</sup>	0,53 <sup>de</sup>	0,62 <sup>af</sup>	0,29 <sup>ae</sup>	0,90 <sup>ae</sup>	0,66 <sup>af</sup>	0,31 <sup>ae</sup>	0,97 <sup>ae</sup>
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	0,71 <sup>ae</sup>	0,34 <sup>ad</sup>	1,05 <sup>ad</sup>	0,31 <sup>f</sup>	0,15 <sup>e</sup>	0,45 <sup>e</sup>	0,48 <sup>bf</sup>	0,25 <sup>ae</sup>	0,73 <sup>be</sup>
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	0,52 <sup>bf</sup>	0,26 <sup>ae</sup>	0,78 <sup>be</sup>	0,73 <sup>ad</sup>	0,43 <sup>a</sup>	1,16 <sup>abc</sup>	0,82 <sup>ab</sup>	0,39 <sup>abc</sup>	1,21 <sup>ab</sup>
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	0,47 <sup>bf</sup>	0,21 <sup>cde</sup>	0,68 <sup>be</sup>	0,56 <sup>bf</sup>	0,28 <sup>ae</sup>	0,84 <sup>ae</sup>	0,78 <sup>abc</sup>	0,39 <sup>abc</sup>	1,18 <sup>abc</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji DMRT pada α = 5%

**Tabel 9.** Rataan panjang dan lebar stomata (µm) anggrek hitam *in vitro* pada pengaruh NAA dan BAP pada 23 MST

ZPT	Konsentrasi	NAA					
		0,0 mgL <sup>-1</sup>		0,2 mgL <sup>-1</sup>		0,5 mgL <sup>-1</sup>	
		P. Stomata	L. Stomata	P. Stomata	L. Stomata	P. Stomata	L. Stomata
BAP	0,0 mgL <sup>-1</sup>	38,99 <sup>a</sup>	35,05 <sup>ab</sup>	39,49 <sup>a</sup>	35,88 <sup>a</sup>	36,94 <sup>abc</sup>	26,66 <sup>cd</sup>
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	38,82 <sup>a</sup>	29,67 <sup>abcd</sup>	33,89 <sup>abcd</sup>	28,89 <sup>abcd</sup>	38,38 <sup>ab</sup>	32,21 <sup>abc</sup>
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	29,03 <sup>cd</sup>	26,6 <sup>cd</sup>	31,15 <sup>abcd</sup>	28,77 <sup>abcd</sup>	31,82 <sup>abcd</sup>	26,76 <sup>cd</sup>
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	35,8 <sup>abc</sup>	27,34 <sup>bcd</sup>	32,77 <sup>abcd</sup>	23,95 <sup>d</sup>	30,27 <sup>bcd</sup>	23,41 <sup>d</sup>
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	32,09 <sup>abcd</sup>	27,34 <sup>bcd</sup>	30,42 <sup>bcd</sup>	23,41 <sup>d</sup>	32,04 <sup>abcd</sup>	27,07 <sup>bcd</sup>
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	29,95 <sup>cd</sup>	25,57 <sup>cd</sup>	33,09 <sup>abcd</sup>	28,92 <sup>abcd</sup>	26,33 <sup>d</sup>	23,25 <sup>d</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Uji DMRT pada α = 5%

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kandungan total klorofil tertinggi terdapat pada perlakuan tanpa penambahan ZPT NAA dan BAP sebesar 1,35 mgg<sup>-1</sup>, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,3 mgL<sup>-1</sup> (1,05 mgg<sup>-1</sup>), NAA 0,2 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup> (1,16 mgg<sup>-1</sup>), NAA 0,5 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup> (1,21 mgg<sup>-1</sup>) dan NAA 0,5 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,5 mgL<sup>-1</sup> (1,18 mgg<sup>-1</sup>). Peningkatan konsentrasi BAP pada setiap level NAA cenderung meningkatkan jumlah klorofil total, kecuali pada NAA 0,0 mgL<sup>-1</sup>. Pada konsentrasi NAA 0,2 dan 0,5 mgL<sup>-1</sup>, klorofil total tertinggi diperoleh pada kombinasi dengan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup>, yaitu NAA 0,2 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup> sebesar 1,156 mgg<sup>-1</sup> dan NAA 0,5 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup> sebesar 1,179 mgg<sup>-1</sup>.

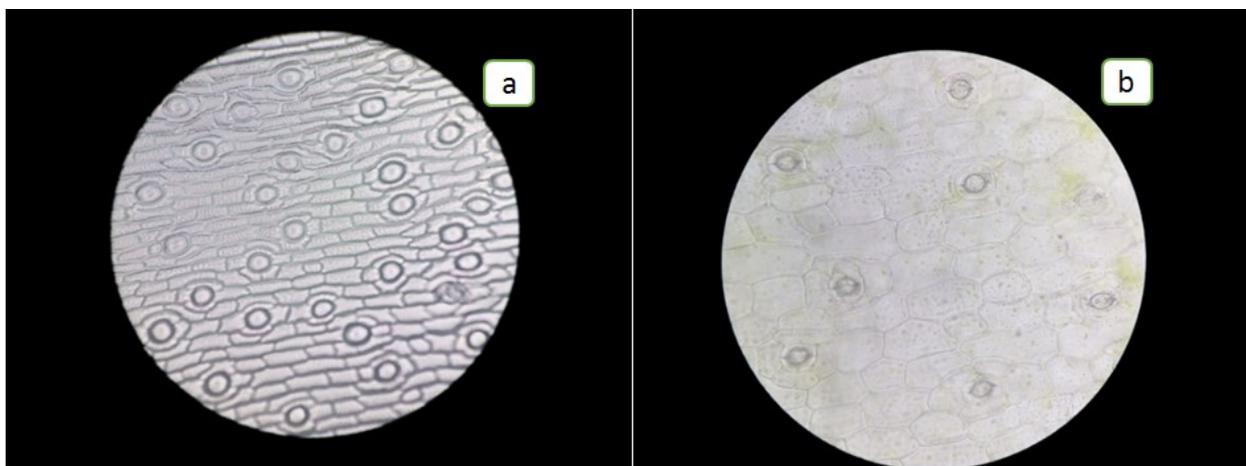
Klorofil sangat berperan penting dalam fotosintesis, jumlah klorofil berkaitan erat dengan hasil yang diperoleh dari proses

yang melibatkan cahaya tersebut. Total klorofil yang tinggi menunjukkan energi yang dihasilkan dari proses fotosintesis tersebut juga tinggi. Energi ini akan digunakan tanaman untuk pertumbuhannya. Pada percobaan ini tanaman dengan perlakuan tanpa penambahan ZPT menunjukkan pertumbuhan yang terbaik terlihat dari tinggi tanaman (39,335 mm) (Tabel 3) dan panjang daun tertinggi (25,81 mm) (Tabel 5) dibandingkan dengan perlakuan lainnya sesuai dengan klorofil total (1,35 mgg<sup>-1</sup>) yang dimiliki oleh tanaman tersebut. Menurut Thamrin (2008) menyatakan bahwa tinggi rendahnya kandungan klorofil di daun berhubungan dengan kecukupan hara yang diperlukan tanaman, dimana kandungan klorofil yang tinggi mampu mendorong proses fotosintesis tanaman sehingga fotosintat yang dihasilkan akan banyak dan pertumbuhan vegetatif tanaman lebih pesat (dalam hal ini tinggi tanaman paling tinggi

**Tabel 10.** Rataan jumlah stomata (buah) anggrek hitam *in vitro* pada pengaruh NAA dan BAP pada 23 MST

ZPT	Konsentrasi	NAA		
		0,0 mgL <sup>-1</sup>	0,2 mgL <sup>-1</sup>	0,5 mgL <sup>-1</sup>
BAP	0,0 mgL <sup>-1</sup>	11,50 <sup>cd</sup>	12,50 <sup>bcd</sup>	15,00 <sup>bcd</sup>
	0,1 mgL <sup>-1</sup>	9,50 <sup>cd</sup>	15,25 <sup>bcd</sup>	11,50 <sup>cd</sup>
	0,2 mgL <sup>-1</sup>	16,00 <sup>abcd</sup>	18,25 <sup>abc</sup>	18,75 <sup>abc</sup>
	0,3 mgL <sup>-1</sup>	14,75 <sup>bcd</sup>	20,00 <sup>ab</sup>	13,50 <sup>bcd</sup>
	0,4 mgL <sup>-1</sup>	16,00 <sup>abcd</sup>	<b>23,25<sup>a</sup></b>	13,25 <sup>bcd</sup>
	0,5 mgL <sup>-1</sup>	13,25 <sup>bcd</sup>	12,00 <sup>bcd</sup>	18,50 <sup>abc</sup>

Keterangan: Angka pada kolom yang sama diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji DMRT pada  $\alpha = 5\%$



**Gambar 3.** Representasi stomata anggrek hitam pada perlakuan kombinasi NAA dan BAP. a) N2B4 (NAA 0,2 dan BAP 0,4 mgL<sup>-1</sup>) b) N0B1 (NAA 0,0 dan BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>)

(39,335 mm)). Jumlah klorofil yang banyak sangat menguntungkan untuk tanaman *in vitro* karena menurut Zulkarnain (2009) sistem perakaran pada planlet yang berasal dari kultur jaringan mudah rusak dan tidak berfungsi sempurna, disamping itu lapisan lilin tipis dan belum berkembang dengan baik akibatnya tanaman akan mati saat aklimatisasi. Pada percobaan ini panjang akar tertinggi 23,583 mm (Tabel 6) dan jumlah klorofil paling banyak (1,35  $\text{mg g}^{-1}$ ) (Tabel 8) diharapkan dapat membantu persentase tumbuh tanaman anggrek hitam ketika diaklimatisasi (Andarini 2013). Menurut Prasetyo (2017) semakin banyak jumlah klorofil maka daun akan semakin hijau dan laju fotosintesis meningkat.

### Stomata

Stomata merupakan lubang atau celah yang terdapat pada epidermis organ tumbuhan yang dibatasi oleh sel khusus yang disebut sel penutup (Samosir 2014). Stomata berperan dalam pertukaran  $\text{CO}_2$  saat fotosintesis dan penguapan air dari tanaman ke lingkungan melalui transpirasi (Arif 2016). Tabel 9 menunjukkan bahwa perlakuan NAA dan BAP mempengaruhi panjang dan lebar stomata. Secara umum terlihat bahwa panjang dan lebar stomata cenderung menurun dengan meningkatkan konsentrasi NAA dan BAP.

Panjang dan lebar stomata terpanjang pada perlakuan NAA 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  dan BAP 0,0  $\text{mg L}^{-1}$  sebesar 39,49 dan 35,88  $\mu\text{m}$ . Ukuran stomata berhubungan dengan jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata. Peningkatan jumlah kloroplas mengakibatkan perubahan ukuran stomata (panjang dan lebar) menjadi lebih besar. Semakin besar ukuran stomata maka semakin baik menyerap  $\text{CO}_2$  untuk fotosintesis. Kerapatan stomata yang baik dapat membantu proses metabolisme tanaman. Menurut Megia et al. (2015) ukuran stomata terbagi menjadi tiga bagian, yaitu kurang panjang (< 20  $\mu\text{m}$ ), panjang (20-25  $\mu\text{m}$ ) dan sangat panjang (> 25  $\mu\text{m}$ ) pada penelitian ini semua perlakuan menunjukkan panjang stomata lebih dari 25  $\mu\text{m}$ . Panjang dan lebar stomata sangat penting untuk tanaman *in vitro* karena tanaman hasil *in vitro* umumnya memiliki lapisan lilin yang tipis dan belum berkembang dengan baik, sel-sel palisade

belum berkembang maksimal, jaringan pembuluh dari akar ke pucuk kurang berkembang dan stomata seringkali tidak berfungsi (tidak dapat menutup saat penguapan tinggi) (Andarini 2013).

Perlakuan NAA 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  dan BAP 0,4  $\text{mg L}^{-1}$  menunjukkan jumlah stomata paling banyak (Tabel 10, Gambar 3a). Hal ini memperlihatkan kecenderungan bahwa konsentrasi BAP berperan terhadap karakter stomata. Pada NAA 0,0 (N0) dan 0,2 (N1)  $\text{mg L}^{-1}$  semakin tinggi konsentrasi BAP yang ditambahkan sampai 0,4  $\text{mg L}^{-1}$  terlihat jumlah stomata makin meningkat, tetapi ketika ditambahkan dengan konsentrasi BAP lebih tinggi jumlah stomata cenderung menurun. Jumlah stomata yang banyak dan perlakuan *hardening off* (proses penguatan) tanaman *in vitro* akan membantu kesuksesan tanaman saat aklimatisasi nanti.

### KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa respon pertumbuhan tunas *in vitro* anggrek hitam terhadap berbagai kombinasi NAA dan BAP. Media terbaik untuk multiplikasi tunas adalah media tanpa NAA dengan penambahan BAP 0,2  $\text{mg L}^{-1}$ . Morfogenesis tunas yang baik dengan jumlah dan panjang daun serta akar terbaik adalah pada media tanpa NAA dan BAP. Dengan demikian tahapan multiplikasi tunas dapat dilakukan pada media tanpa NAA ditambah BAP 0,2  $\text{mg L}^{-1}$ , kemudian tunas dipindah ke media tanpa NAA dan BAP untuk penyiapan planlet yang siap untuk diaklimatisasi.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adi NKAP, Astarini IA, Astiti NPA (2014) Aklimatisasi anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) hasil perbanyakan *in vitro* pada media berbeda. J Simbiosis 2: 203-214
- Andarini YN (2013) Respon planlet anggrek *Dendrobium spectabile* pada pemberian beberapa taraf paclobutrazol selama tahap aklimatisasi. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Arif A (2016) Keragaan planlet *Dendrobium lasianthera* (JJ Smith) hasil iradiasi sinar gamma generasi Mv1. Skripsi, Institut Pertanian Bogor

- Arti LT, Mukarlina (2017) Multiplikasi anggrek bulan (*Dendrobium sp*) dengan penambahan ekstrak taoge dan benzyl amino purine (BAP) secara *in vitro*. J Protobiont 6: 278-282
- Bakti PLW (2009) Analisis kandungan klorofil dan laju fotosintesis tebu transgenik PS-IPB 1 yang ditanam di kebun percobaan PG Djatiroto, Jawa Timur. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Fithriyandini A, Maghfoer MD, 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*. J Produksi Tanaman 3: 43-49
- Gantait S, Mandal N, Bhattacharyya S, Das PK (2011) Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell Tiss Organ Cult 106:485-493. doi:10.1007/s11240-011-9947-1
- Gravendeel B (2000) Reorganising the orchid genus *Coelogyne*: A phylogenetic classification based on morphology and molecules. National Herbarium Nederland, Universiteit Leiden, Netherland
- Harjadi SS (2009) Zat Pengatur Tumbuh. Penebar Swadaya, Jakarta
- Hatta M, Hayati M, Irayani U (2008) Pengaruh IAA dan BAP terhadap pertumbuhan tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth) *in vitro*. J Floratek 3: 56-60
- Karyanti, Kartini M (2017) Pengaruh thidiazuron dan hidrolisat kasein terhadap multiplikasi tunas Satoimo (*Colocasia esculenta* (L) Schott var *antiquarum*). J Bioteknol Biosains Indones 4: 70-77. doi: 10.29122/jbbi.v4i2.2535
- Kurnianingsih R, Marfuah, Matondang I (2009) Pengaruh pemberian BAP (6-Benzyl Amino Purine) pada media multiplikasi tunas *Anthurium hookerii* Kunth. Enum. secara *in vitro*. Vis Vitalis 02: 23-30
- Ling ACK, Yap CP, Shaib JM, Vilasini P (2007) Induction and morphogenesis of *Phalaenopsis* callus. J Trop Agric and Fd Sc 35: 147-152
- Markal A, Isda MN, Fatonah S (2015) Perbanyakan anggrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) BL. melalui induksi tunas secara *in vitro* dengan penambahan BAP dan NAA. JOM FMIPA 2: 108-114
- Paramartha AI, Ermavitalini D, Nurfadilah S (2012) Pengaruh penambahan kombinasi konsentrasi ZPT NAA dan BAP terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji *Dendrobium taurulinum* J.J Smith secara *in vitro*. J Sains dan Seni ITS 1: 40-43
- Pramesti G (2011) SPSS 18.0 dalam Rancangan Percobaan. PT. Elek Media Komputindo, Jakarta
- Prasetyo AN (2017) Kajian pemberian gibberelin pada fisiologi tanaman iles-iles (*Amorphophallus muelleri* Blume.) berbeda umur. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Putri HA (2015) Pengaruh komposisi media dasar dan kitosan terhadap pertumbuhan *protocorm like bodies* (PLBs) dan planlet Anggrek *Phalaenopsis* hibrida. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Megia R, Ratnasari, Hadisunarso (2015) Karakteristik morfologi dan anatomi, serta kandungan klorofil lima kultivar tanaman penyerap polusi udara *Sansevieria trifasciata*. J Sumberdaya Hayati 1: 34-40
- Restiani R, Semiarti E, Indrianto A (2016) Konservasi anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) melalui mikropropagasi pada berbagai medium kultur. Pp 393-404. Prosiding Simposium Nasional Pendidikan Biologi (Symbion 2016) 27 Agustus 2016, UAD Yogyakarta
- Samosir IA (2014) Karakter morfologi dan anatomi daun beberapa spesies *Sansevieria*. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Sims DA, Gamon JA (2003) Estimation of vegetative water content and photosynthetic tissue area from spectral reflectance: A comparison of indices based on liquid water and chlorophyll absorption features. Remote Sens Environ 84: 526-537. doi: 10.1016/S0034-4257(02)00151-7
- Suhentaka EB (2010) Pengaruh konsentrasi BA dan NAA pada tahap multiplikasi

- secara *in vitro* terhadap keberhasilan aklimatisasi nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) kultivar Smooth Cayenne. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Thamrin M (2008) Peningkatan pembungaan jeruk Pamelon (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) “Cikoneng” melalui strangulasi. Tesis, Institut Pertanian Bogor
- Untari R (2003) Pengaruh jenis media organik dan NAA terhadap pertumbuhan anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) di dalam kultur *in vitro*. Skripsi, Institut Pertanian Bogor
- Zulkarnain (2009) Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya. Bumi Aksara, Jakarta