

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) termasuk spesies anggrek liar yang bersifat endemik dan tumbuh alami di wilayah Kalimantan, khususnya Kalimantan Barat, Kabupaten Kapuas Hulu yang hidupnya menempel pada tumbuhan berkayu di daerah-daerah tropis. Anggrek hitam memiliki penciri khusus dimana pada labelumnya yang menyerupai biola dengan warna ungu hingga kehitaman, serta bagian lainnya berwarna hijau (Elmansyah *et al.*, 2025). Anggrek hitam menjadi salah satu anggrek langka yang diakibatkan dari penebangan hutan secara masif di pulau Kalimantan. Anggrek hitam banyak diburu oleh masyarakat terutama oleh para kolektor anggrek sehingga populasi anggrek hitam semakin langka. Hal tersebut diikuti dengan terjadinya eksploitasi secara berlebihan dan diperparah dengan penyusutan luas hutan habitat anggrek yang menyebabkan anggrek hitam menjadi langka (Wraith *et al.*, 2020).

Anggrek hitam telah mendapatkan status perlindungan karena termasuk kelompok sangat terancam punah di bawah lampiran I *Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES) yang menolak perizinan perdagangan internasional pada spesies terancam punah, selain itu mengacu pada Peraturan Pemerintah nomor 7 tahun 1999, anggrek hitam dikategorikan tumbuhan yang mendapat perlindungan di Indonesia. Untuk melestarikan spesies anggrek hitam tersebut, dibutuhkan upaya konservasi untuk menjaga eksistensi spesies anggrek

hitam. Terdapat kendala dalam usaha konservasi anggrek hitam, yaitu perkembangbiakan atau perbanyak anggrek hitam sulit untuk dilakukan. Benih anggrek berukuran kecil dan tidak ada endosperma untuk persediaan nutrisi, sehingga produksi anggrek tidak memungkinkan untuk diperbanyak secara massal melalui metode konvensional (Pant *et al.*, 2017). Kultur jaringan tanaman menjadi solusi untuk mengatasi masalah tersebut, karena metode ini memungkinkan perbanyak anggrek secara efisien dengan menyediakan bibit unggul dalam kuantitas besar. Kelebihan dari kultur jaringan yaitu kemampuannya memproduksi bibit unggul dalam jumlah banyak dan waktu yang relatif cepat (Twaij *et al.*, 2020).

Teknik *in vitro* atau kultur jaringan adalah salah satu bentuk bioteknologi untuk memperbanyak tanaman dengan cara mengisolasi organ tanaman yang ditumbuhkan di media buatan dalam kondisi aseptik. Kultur jaringan dilakukan dengan mengambil sel dari tanaman, kemudian sel tersebut akan ditumbuhkan di media kultur yang diberi zat pengatur tumbuh secara aseptik dalam ruangan terkendali (Morgan, 2021). Kultur *in vitro* dapat memaksimalkan hasil bibit dan menghasilkan bibit yang bebas penyakit dibandingkan secara konvensional, hal ini karena dilakukannya perawatan tanaman dalam lingkungan yang terkontrol dan aseptik. Lingkungan aseptik dapat mencegah eksplan dan media terkontaminasi bakteri atau jamur sedangkan lingkungan terkontrol dapat memasok kebutuhan faktor pertumbuhan tanaman, seperti nutrisi tanaman, air, suhu, dan cahaya (Apriliyani dan Wahidah, 2021).

Perkembangan tanaman anggrek dipacu dengan pengaplikasian zat pengatur tumbuh pada media kultur, berupa sitokinin dan auksin. Sitokinin berupa *Benzyl*

Amino Purine (BAP) dan auksin berupa *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) terbukti cukup efektif dalam merangsang proses pembentukan organ tanaman. *Benzyl Amino Purine* adalah sitokinin sintetik untuk menginduksi tunas, pembentukan daun (Sofhya, 2023). BAP dapat berperan dalam meningkatkan jumlah dan panjang tunas. Pemberian BAP 0,90 mg/L dapat mengoptimalkan jumlah dan panjang tunas anggrek *Dendrobium* secara *in vitro* (Noli, 2024). Penambahan 1,5 ppm BAP efektif memperbanyak pertumbuhan tunas anggrek *Dendrobium spectabile* dengan rerata hasil 4,25 tunas (Ario dan Setiawan, 2020). *Naphtalene Acetic Acid* merupakan auksin sintetik untuk pembentukan akar serta merangsang pemanjangan sel, berperan dalam dominansi apikal, serta menekan tunas aksilar maupun adventif (Elmongy *et al.*, 2018). NAA dalam kultur jaringan berperan dalam memicu pertumbuhan akar. Pemberian NAA 1,5 mg/L dalam kultur jaringan dapat mempercepat pertumbuhan akar, meningkatkan jumlah akar dan pemanjangan akar anggrek *Dendrobium* (Arli dan Noli, 2023). Penambahan 3 ppm NAA efektif mempercepat waktu kemunculan akar anggrek hitam (Hartati *et al.*, 2017). Media kultur yang umum digunakan dalam kultur jaringan adalah media *Murashige* dan *Skoog* (MS). Media MS adalah medium kultur yang mempunyai unsur hara makro dan mikro secara lengkap untuk memenuhi kebutuhan banyak jenis sel tanaman, sehingga sering digunakan secara luas untuk berbagai jenis spesies tanaman dibandingkan dengan media lainnya (Ramadhani, 2025).

Penelitian yang dilakukan Kartiman *et al.* (2018) membuktikan bahwa pemberian ZPT 0,2 mg/L BAP tanpa NAA menghasilkan lebih banyak jumlah tunas anggrek *Coelogyne pandurata* Lindl. dalam teknik *in vitro* dibandingkan

kombinasi konsentrasi lainnya yaitu NAA (0,0; 0,2; 0,5) mg/L dan BAP (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5) mg/L. Berdasarkan penelitian Kaladharan *et al.* (2024) menyatakan bahwa diantara BAP (0,1; 0,5; 1,0; 2,0) mg/L dan NAA (0,1; 0,5; 1,0; 2,0) mg/L, pemberian 0,5 mg/L NAA dan 1,0 mg/L BAP pada teknik *in vitro* anggrek *Coelogyne mossiae* dihasilkan pertumbuhan paling baik dalam menginduksi dan memperpanjang tunas. Penelitian Sakina *et al.* (2019) menunjukkan bahwa anggrek *Dendrobium* sp. dapat diperbanyak secara *in vitro* dengan penambahan BAP 1,00 ppm dan NAA 0,25 ppm yang ditunjukkan dengan banyaknya jumlah tunas planlet dibandingkan dengan kombinasi antara BAP (0,00; 1,00; 2,00 ppm) dan NAA (0,00; 0,25; 0,50 ppm). Penelitian Janah *et al.* (2025) menunjukkan bahwa induksi tunas anggrek secara *in vitro* dengan kombinasi NAA 0,5 ppm dan BAP 0,5 ppm diantara taraf BAP (0; 0,5; 1) ppm dengan taraf NAA (0; 0,5; 1) ppm, dapat mengoptimalkan jumlah tunas anggrek *Dendrobium* dibandingkan kombinasi taraf lainnya. Penelitian Goswami *et al.* (2015) mengatakan bahwa pemberian BAP 0,5 mg/L dan NAA 0,5 mg/L pada media MS efektif dalam menghasilkan dan meningkatkan perkembangan tunas dan akar anggrek *Dendrobium* sp. dibandingkan dengan kombinasi BAP dan NAA pada masing-masing konsentrasi (0,0; 0,5; 2,5; 5,0) mg/L. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, diberikan kebaruan yaitu multiplikasi ke-4 anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) secara *in vitro* dengan berbagai konsentrasi BAP (0,00; 0,50; 1,00; 1,50) mg/L dan NAA (0,00; 0,50; 1,00) mg/L yang paling optimal dalam memicu pertumbuhan tunas planlet anggrek hitam.

1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Mengkaji pengaruh berbagai konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.
2. Mengkaji pengaruh berbagai konsentrasi NAA terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.
3. Mengkaji interaksi antara BAP dan NAA terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Mendapatkan informasi tentang pengaruh berbagai konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.
2. Mendapatkan informasi tentang pengaruh berbagai konsentrasi NAA terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.
3. Mendapatkan informasi tentang pengaruh interaksi antara BAP dan NAA terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.

1.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian yang diuji adalah sebagai berikut:

1. Konsentrasi BAP 1,00 mg/L meningkatkan pertumbuhan planlet pada multiplikasi ke-4 anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.
2. Konsentrasi NAA 0,50 mg/L meningkatkan pertumbuhan planlet pada multiplikasi ke-4 anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.
3. Terdapat interaksi antara konsentrasi BAP dan NAA terhadap pertumbuhan planlet pada multiplikasi ke-4 anggrek *Coelogyne pandurata* dengan teknik kultur *in vitro*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. **Tanaman Anggrek Hitam** (*Coelogyne pandurata* Lindl.)

Tanaman hias anggrek merupakan tanaman hias berbunga yang mendapat perhatian besar oleh khalayak karena mempunyai ciri khas tersendiri akan keunikan warna, corak, ukuran, dan bentuk bunganya yang menarik minat pecinta tanaman hias bunga. Faktor yang menyebabkan anggrek banyak digemari masyarakat yaitu karena anggrek menjadi tanaman hias yang mempunyai daya tarik visual yang kuat, serta faktor seperti selera, harga, lokasi, dan pendapatan masyarakat juga mempengaruhi permintaan terhadap anggrek (Rangkuti, 2018). Anggrek menjadi salah satu tanaman hias dari keluarga Orchidaceae yang umum disenangi oleh masyarakat, baik hanya untuk hobi maupun diperjual belikan. Produksi tanaman hias bunga anggrek pot pada tahun 2023 telah mencapai 3.785.454 dan anggrek potong telah mencapai 2.522.933 (BPS, 2023).

Anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) tergolong spesies anggrek langka yang secara alami hidup di pohon – pohon hutan hujan tropis dan pusat keragaman utamanya berada di Kalimantan. Anggrek hitam ini dikenal karena keindahan dan karakteristik bunganya, terutama pada bagian labelum yang menyerupai bentuk violin dengan warna ungu kehitaman sampai hitam, disertai warna hijau di sejumlah area (Hartati *et al.*, 2019). Anggrek dengan genus *Coelogyne* diperkirakan terdapat 125 spesies di dunia. Spesies-spesies tersebut terdistribusi mulai dari India dan China hingga Asia Tenggara (Indonesia, Filipina,

Kepulauan Pasifik dan Fiji) (Wahyudiningsih *et al.*, 2018). Anggrek *Coelogyne pandurata* tumbuh secara epifit dan simpodial yang sering dijumpai di Kalimantan Tengah seperti di Tewah dan Muara Teweh, serta Kalimantan Barat di Kabupaten Kapuas Hulu. Anggrek epifit biasanya tumbuh dengan menempelkan akarnya pada batang atau cabang pohon yang teduh, tanpa mengganggu pertumbuhan tanaman inangnya (Yuwono *et al.*, 2017). Berikut klasifikasi Anggrek *Coelogyne pandurata* Lindl.:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Asparagales
Famili	: Orchidaceae
Genus	: <i>Coelogyne</i> Lindl.
Spesies	: <i>Coelogyne pandurata</i> Lindl. (Lindley, 1821)

Anggrek *Coelogyne pandurata* memiliki jenis perakaran serabut dengan bentuk silindris dan ujung akar meruncing. *Coelogyne pandurata* memiliki perakaran jenis serabut berbentuk silindris, berdaging dan lunak yang menumpang pada inangnya (Nafisah *et al.*, 2023). *Coelogyne pandurata* memiliki tipe pertumbuhan batang simpodial, yaitu pertumbuhan terjadi dari cabang-cabang lateral atau samping yang tumbuh mendatar dengan lebih dari satu sumbu batang. *Coelogyne pandurata* memiliki umbi semu (pseudobulb) sebagai penyimpanan cadangan makanan yang bentuknya seperti bawang, berwarna hijau, pipih, berkerut, tersusun sejajar, serta pertumbuhannya terbatas (Purwanti *et al.*, 2021) (Ilustrasi 1).

Daun anggrek hitam (*Coelogyne pandurata*) memiliki bentuk lonjong dengan warna hijau kehitaman, bertekstur tipis, permukaannya rata, tidak memiliki tangkai, melekat langsung pada batang, serta tersusun secara berselang-seling dan saling berhadapan. Batang anggrek hitam membentuk umbi semu (*pseudobulbs*), bulat memanjang dan pipih (Agus *et al.*, 2021). Penciri utama bunga anggrek *Coelogyne pandurata* yaitu pada *labellum* (bentuk lidah) yang berwarna hitam dan *corolla* memiliki bentuk lanset, lancip dan berwarna hijau muda. Ciri khas *Coelogyne pandurata* yaitu mempunyai (*labellum*) hitam pada bunganya dengan garis-garis hijau dan permukaan berbulu, serta warna sepal dan petalnya berwarna hijau berbentuk segitiga dengan ujung runcing (De Britto *et al.*, 2021) (Ilustrasi 1).



Ilustrasi 1. Morfologi Anggrek Hitam

Tanaman anggrek *Coelogyne pandurata* dapat hidup di dataran rendah maupun kawasan pegunungan (*dipertocarpt*) dengan curah hujan sekitar 60 - 85% serta suhu sekitar 21 - 32°C dan kelembaban sekitar 80 - 85% serta pH tanah sekitar 6,4 – 6,6. Anggrek *Coelogyne pandurata* dapat tumbuh optimum pada daerah dengan ketinggian 1000 - 1.500 mdpl serta kebutuhan intensitas cahayanya berkisar antara 40% – 50% (Hasan *et al.*, 2021). Penyiraman anggrek *Coelogyne pandurata*

dapat dilakukan dengan memperhatikan kondisi lingkungan dan kelembaban pada media tanam. Penyiraman tanaman anggrek *Coelogyne pandurata* dapat dilakukan dengan cara disemprot, bila musim hujan bisa dilakukan satu kali sehari penyemprotan, bila musim kemarau dapat disiram dua kali dalam satu hari yaitu pada waktu pagi dan menjelang sore (Haniya *et al.*, 2024). Perbanyakan anggrek hitam dapat dilakukan secara generatif dan vegetatif. Secara generatif (benih) dapat dilakukan secara konvensional dengan bantuan jamur mikoriza, maupun menggunakan teknik kultur jaringan melalui inisiasi benih anggrek hitam. Secara vegetatif dapat dilakukan secara konvensional dengan penggunaan bahan tanam berupa keiki, stek batang, dan pemisahan anakan, serta dapat juga dilakukan teknik kultur jaringan dengan bahan tanam berupa tunas, protokorm, daun, serta akar (Herliana *et al.*, 2019). Deskripsi anggrek hitam disajikan pada (Lampiran 2).

Anggrek hitam banyak diburu oleh masyarakat terutama oleh para kolektor anggrek yang menyebabkan populasi anggrek hitam semakin langka. Keunikan anggrek hitam menarik minat para penggemar anggrek untuk mengoleksinya sehingga terjadinya eksploitasi secara berlebihan dan diperparah dengan menyusutnya luas hutan habitat anggrek yang menyebabkan anggrek hitam menjadi langka (Wraith *et al.*, 2020). Berbisnis anggrek hitam menjadi peluang bagi para pelaku usaha tanaman hias untuk dapat meraih keuntungan karena memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi. Anggrek hitam bernilai ekonomi tinggi karena keberadaannya yang langka dan keunikannya menjadikannya banyak dicari oleh para pecinta anggrek (Wahyudiningsih *et al.*, 2018).

2.2. Teknik Kultur Jaringan

Teknik kultur jaringan merupakan suatu teknik memperbanyak tanaman yang dilakukan dengan cara mengisolasi tanaman atau bagian organ tanaman secara aseptik dengan media buatan dan lingkungan terkontrol. Perbanyak tanaman dengan kultur jaringan dilakukan dengan menanam biji (generatif) atau mengisolasi bagian tanaman seperti sel, jaringan, atau organ (vegetatif), yang ditumbuhkan di media agar yang mengandung zat pengatur tumbuh (ZPT), mineral, gula, dan vitamin (Heriansyah, 2019). Teknik kultur jaringan lebih efektif dalam menghasilkan bibit unggul dibandingkan dengan teknik perbanyakan konvensional. Salah satu keunggulan kultur jaringan yaitu kemampuannya untuk menghasilkan bibit dalam jumlah besar dalam periode yang relatif pendek (Restanto *et al.*, 2022).

Dalam teknik kultur jaringan, beberapa hal penting yang perlu diperhatikan meliputi isolasi eksplan dari tanaman induk yang sehat, proses sterilisasi eksplan, penanaman eksplan pada media dalam kondisi aseptik, penerapan teknik multiplikasi, proses aklimatisasi, hingga pemindahan tanaman ke lapangan yang harus dilakukan dengan hati-hati. Proses kultur jaringan terdiri dari tahap pemilihan tanaman induk, sterilisasi (ruang, alat, media), pembuatan media dan larutan stok, inisiasi eksplan, tahap multiplikasi, serta aklimatisasi (Kardika *et al.*, 2023). Faktor kegagalan dalam kegiatan kultur jaringan yang sering terjadi adalah karena kontaminasi jamur dan bakteri. Eksplan mampu berhasil dikembangkan dalam kultur jaringan karena minimnya tingkat kontaminasi yang terjadi pada saat masa kultur (Andriani dan Heriansyah, 2021). Pertumbuhan pada tanaman kultur jaringan didukung oleh jenis media kultur, zpt yang digunakan, eksplan, dan lingkungan

yang steril. Pertumbuhan dan perkembangan sel dalam kultur jaringan dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti tipe media, hormon, sumber eksplan, serta kondisi lingkungan (Nurfajri dan Nasmia, 2023).

Perbanyakan tanaman secara kultur jaringan harus memperhatikan kondisi lingkungan serta peralatan yang steril sehingga tidak adanya kontaminasi pada eksplan yang memicu terjadinya resiko kegagalan. Keberhasilan kultur jaringan dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti kebersihan ruang kerja, sterilisasi alat dan bahan, pemilihan eksplan yang tepat, jenis media yang digunakan, serta kondisi lingkungan sekitar (Apriliyani dan Wahidah, 2021). Selain pada tingkat sterilisasi, kondisi tanaman, penggunaan media dan hormon serta keahlian juga akan mempengaruhi keberhasilan proses kultur jaringan. Kesuksesan dari teknik kultur jaringan dapat dipengaruhi oleh varietas tanaman, kandungan hormon endogen pada tanaman itu sendiri, serta jenis media kultur dan ZPT yang diaplikasikan (Zahara dan Suryady, 2022).

2.3. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa organik, baik yang berasal dari alami maupun sintetis yang berperan dalam mengatur kecepatan, memperlambat atau memodifikasi pertumbuhan secara kualitatif dan perkembangan tanaman. ZPT berfungsi dalam memacu berbagai proses pertumbuhan tanaman, seperti pembentukan akar, tunas, perkecambahan, dan proses fisiologis lainnya (Riono, 2019). Dalam kultur jaringan, ZPT yang sangat penting bagi pertumbuhan eksplan adalah sitokinin dan auksin. Tanaman

memerlukan ZPT untuk mendukung proses pertumbuhannya, di antaranya yaitu zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin sebagai zat pengatur tumbuh utama (Sulichantini, 2016).

Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh turunan adenine yang fungsinya untuk merangsang pembelahan sel, inisiasi atau pembentukan tunas. Sitokinin adalah jenis zat pengatur tumbuh yang berfungsi utama dalam merangsang proses pembelahan sel (sitokinesis) dan morfogenesis, serta umumnya dimanfaatkan untuk merangsang pertumbuhan tunas (Nitasari *et al.*, 2023). Sitokinin berperan dalam merangsang pembelahan sel serta mendorong pertumbuhan jaringan baru pada bagian pucuk tanaman. Fungsi senyawa sitokinin yaitu mengatur perkembangan sel pada tumbuhan, memperlambat penuaan daun, memacu pertumbuhan tunas lateral dan pelebaran daun, serta mendukung pertumbuhan akar (Ardiana *et al.*, 2022).

Salah satu jenis ZPT dari kelompok sitokinin yang umum digunakan dalam kultur jaringan adalah 6-Benzylamino Purin (BAP). Jenis – jenis ZPT yang termasuk golongan sitokinin diantaranya yaitu adalah 2-*Ip (Isopentenyl Adenin)*, BA (*Benzil Adenin*) atau BAP (*Benzyl Amino Purin*), zeatin dan kinetin, namun yang umum digunakan yaitu BAP, karena BAP mudah diperoleh, lebih efektif dan mempunyai sifat yang stabil (Lailani dan Kuswandi, 2023). 6-Benzylamino Purin (BAP) merupakan salah satu zat pengatur tumbuh golongan sitokinin sintetik yang dimanfaatkan untuk merangsang aktivitas pembelahan sel dalam jaringan eksplan dan pertumbuhan tunas. *Benzyl Amino Purine* (BAP) berfungsi untuk menginduksi tunas, pembentukan daun dalam kultur jaringan dan BAP lebih mudah didapat karena harganya relatif murah (Lisnawati, 2022). BAP dalam kultur jaringan dapat

berperan dalam memaksimalkan jumlah dan panjang tunas. Pemberian BAP dengan dosis 0,9 mg/L dapat meningkatkan jumlah dan memperpanjang tunas anggrek *Dendrobium mussauense* secara *in vitro* (Noli, 2024). Diantara sitokinin sintetik berupa KN, BAP, ZN dan 2-IP dengan taraf konsentrasi (0,1 dan 1,0 mg/L) penggunaan sitokinin BAP (0,1 dan 1,0 mg/L) lebih baik dalam mempercepat perkecambahan dan induksi tunas secara kultur jaringan pada anggrek *Coelogyne nervosa* dibandingkan sitokinin lainnya (Sibin dan Gangaprasad, 2016).

Auksin adalah hormon tanaman yang terdapat di ujung batang, akar, serta area pembentukan bunga, dan berperan dalam proses pembesaran serta perpanjangan sel di sekitar meristem apikal. Auksin merupakan hormon yang berfungsi dalam mempercepat pertumbuhan pada area meristematik dan organ-organ muda yang sedang berkembang, seperti daun muda, tunas apikal, ujung akar, serta struktur perbungaan (Rahmi *et al.*, 2021). Pada metode kultur jaringan, hormon auksin lebih berperan dalam menunjang pertumbuhan akar tanaman. Pada kultur jaringan peran auksin yang paling sering di perhatikan yaitu pada fungsi auksin dalam pembentukan akar (Fauzan *et al.*, 2021).

Hormon *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) merupakan salah satu jenis hormon auksin yang biasa digunakan dalam media kultur jaringan karena stabilitasnya tinggi. Beberapa zat pengatur tumbuh dari kelompok auksin yang umum diaplikasikan dalam kultur *in vitro* meliputi *indole-3-acetic acid* (IAA), *indole-3-butyric acid* (IBA), *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), dan *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) (Fatana *et al.*, 2024). *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) adalah ZPT golongan auksin buatan yang dapat merangsang pembelahan sel, pembesaran

sel, perpanjangan sel dan inisiasi pengakaran. *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) ditambahkan untuk pembentukan akar serta menginduksi pemanjangan sel, mempengaruhi dominansi apikal, penghambatan pucuk aksilar dan adventif (Aprinda *et al.*, 2022). ZPT NAA dalam kultur jaringan lebih dimanfaatkan untuk memicu pertumbuhan akar. Pemberian NAA dengan dosis 1,5 mg/L dalam kultur jaringan dapat mempercepat waktu muncul akar, meningkatkan jumlah akar dan pemanjangan akar anggrek *Dendrobium lasianthera* (Arlis dan Noli, 2023). Dalam tahapan multiplikasi, zpt auksin tidak begitu diperlukan dalam kultur jaringan karena fokus utama pada tahapan multiplikasi adalah dalam menginduksi tunas planlet. Auksin NAA lebih besar pengaruhnya pada saat pembentukan akar dibandingkan dalam pembentukan tunas planlet. Diantara auksin sintetik berupa NAA dan IBA, penggunaan zpt NAA dalam kultur *in vitro* anggrek *Coelogyne cristata* Lindl. tidak berperan besar dalam pembentukan protocorm dan waktu muncul tunas daripada IBA (Kaur *et al.*, 2017). Pemberian 0,2 ppm NAA mampu meningkatkan jumlah akar dibandingkan konsentrasi NAA lainnya (0, 0,2, 0,4, dan 0,6) ppm pada anggrek hasil persilangan antara *Coelogyne pandurata* dengan *Coelogyne rumphii* secara *in vitro* (Hartati *et al.*, 2024).

2.4. Multiplikasi Anggrek

Multiplikasi adalah proses dalam kultur jaringan dimana tanaman dapat memperbanyak calon tanaman dengan memisahkan atau memotong bagian eksplan yang telah tumbuh menjadi banyak tanaman dan ditanam pada media kultur yang baru. Multiplikasi dalam kegiatan kultur jaringan tanaman merupakan proses yang

sering beriringan dengan tahapan subkultur dimana tujuannya untuk mendapatkan lebih banyak tunas dari satu eksplan yang telah tumbuh (Luthfia *et al.*, 2019). Subkultur merupakan tahapan dari kultur jaringan dimana prosesnya yaitu memotong atau mengambil hasil inisiasi atau subkultur sebelumnya dan memindahkan bahan tanam ke botol yang berisi media baru. Subkultur adalah langkah mentransplantasikan eksplan dari satu botol kultur ke dalam beberapa botol kultur (Malonga dan Sandra, 2024).

Pada kegiatan multiplikasi terdapat dua tujuan yang diprioritaskan diantaranya yaitu pertumbuhan tanaman ke arah tunas dan perakaran sehingga media yang digunakan merupakan media yang memiliki kandungan sitokinin dan auksin. Zat pengatur tumbuh berfungsi merangsang pertumbuhan tanaman, misalnya pertumbuhan akar, tunas, perkecambahan dan sebagainya dan zpt yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah golongan auksin dan sitokinin (Heriansyah, 2019). Pada multiplikasi anggrek hitam dapat dilakukan sebanyak 6 kali multiplikasi, dimana multiplikasi ke-1 hingga ke-4 dilakukan untuk tujuan menumbuhkan tunas, sedangkan multiplikasi ke-5 dan ke-6 dilakukan untuk tujuan perakaran. Dalam multiplikasi dengan tujuan untuk memaksimalkan tunas biasanya konsentrasi zpt sitokinin lebih tinggi dibandingkan auksin, sedangkan multiplikasi dengan tujuan memaksimalkan perakaran maka konsentrasi zpt auksin lebih tinggi dibandingkan sitokinin (Alqamari *et al.*, 2020). Pada kultur jaringan anggrek hitam dibutuhkan rentang waktu 2-4 bulan untuk dilakukan multiplikasi selanjutnya, hal ini karena laju pertumbuhan vegetatif anggrek hitam secara alami memang lambat.

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan November 2024 s.d Februari 2025 di Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Sudarto No. 13, Tembalang, Kecamatan Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu planlet anggrek hitam (*Coelogyne pandurata*) pada tahap multiplikasi ke-3 yang berasal dari CV. Esha Flora yang didapatkan dari inisiasi benih di LIPI, Bogor (Ilustrasi 2) yang ditanam secara *in vitro*, media MS (*Murashige and Skoog*) instan (Lampiran 3), zat pengatur tumbuh BAP dan NAA pro analis dengan konsentrasi BAP (0,00; 0,50; 1,00; 1,50) mg/L dan NAA (0,00; 0,50; 1,00) mg/L, alkohol 70%, HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N, aquades steril, agar-agar, gula putih, dan *Natrium hipoklorit* 5%. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu botol kultur, gelas ukur (10 mL) diameter 1,55 cm, gelas ukur (1 L) diameter 8,2 cm, *laminar air flow* (LAF), rak kultur, autoklaf, ruangan inkubasi, cawan petri, pinset (16 cm), pembakar spirtus, *hand sprayer*, sarung tangan *latex*, *scalpel* no. 4 dan mata pisau no. 23, neraca digital (0,001 g), *oven*, gunting, gelas ukur (100 mL), mikropipet (100 – 1000 µl) kertas lakmus pH meter universal, plastik, karet gelang, *plastic wrap*, tisu, label nama, penggaris (0,10 cm), kamera dan alat tulis (Lampiran 24).

3.2. Metode Penelitian

3.2.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini disusun dengan pendekatan metode percobaan faktorial dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas 2 faktor perlakuan. Faktor pertama adalah konsentrasi BAP yang terdiri dari 4 taraf yaitu:

B0 : 0,00 mg/L

B1 : 0,50 mg/L

B2 : 1,00 mg/L

B3 : 1,50 mg/L

Faktor kedua adalah konsentrasi NAA yang terdiri dari 3 taraf yaitu:

N0 : 0,00 mg/L

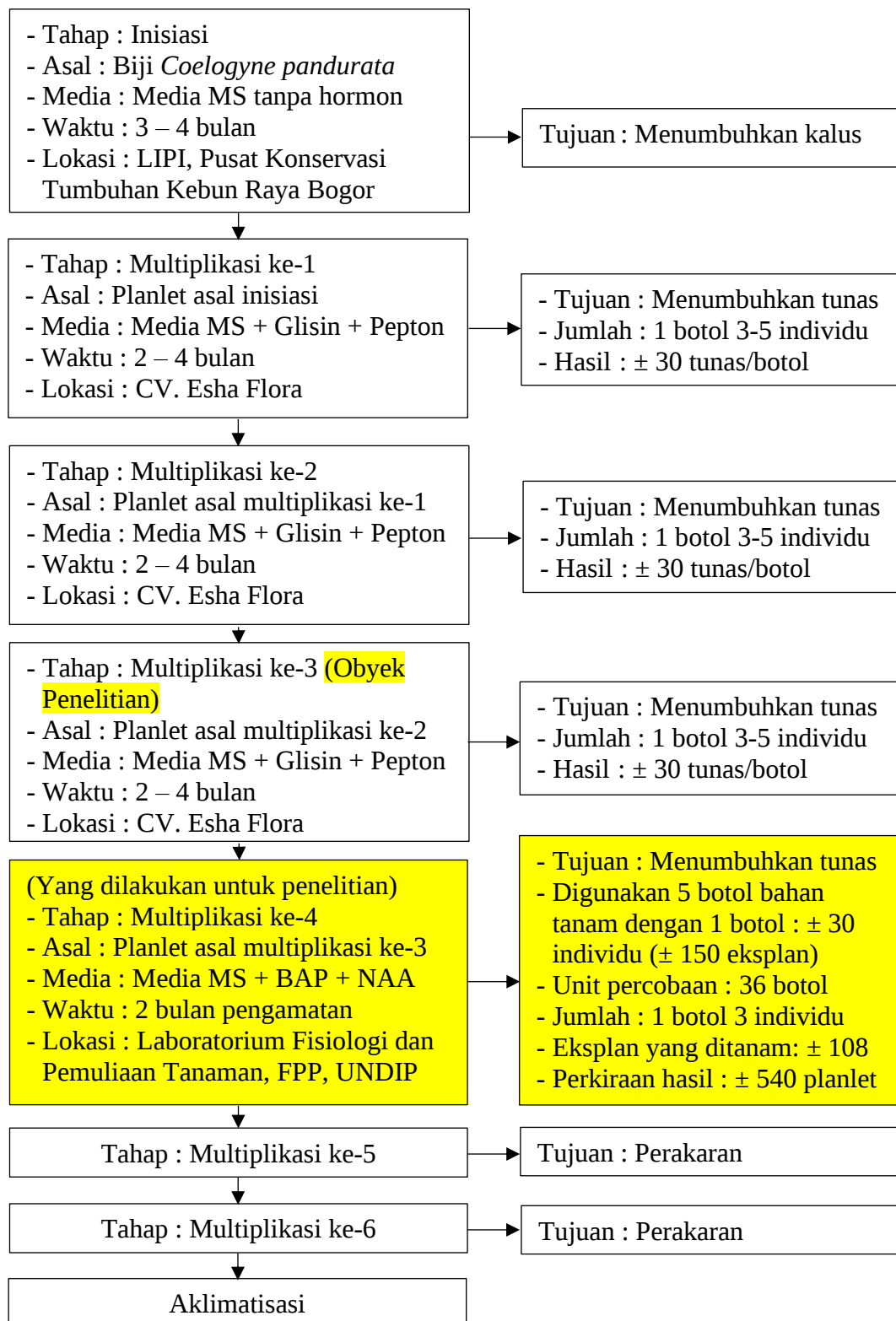
N1 : 0,50 mg/L

N2 : 1,00 mg/L.

Jumlah kombinasi perlakuan sebanyak 12, dan tiap-tiap perlakuan diulang tiga kali, sehingga menghasilkan total 36 unit percobaan. Setiap 1 unit percobaan berisi 3 tanaman yang diteliti. Layout percobaan penelitian disajikan dalam (Lampiran 1).

3.2.2. Prosedur Penelitian

Tahapan kultur jaringan anggrek hitam terdiri dari tahap inisiasi, multiplikasi ke-1 hingga ke-6, dan aklimatisasi (Ilustrasi 2). Penelitian yang dilakukan yaitu multiplikasi ke-4 anggrek hitam secara *in vitro* dengan kombinasi BAP dan NAA.



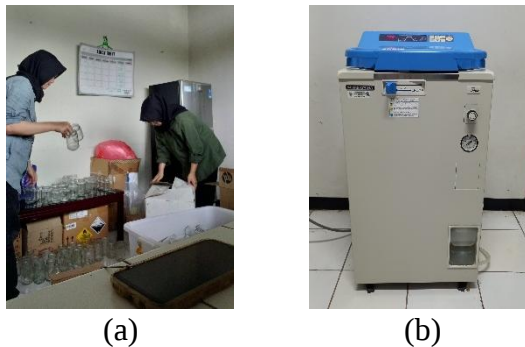
Ilustrasi 2. Riwayat Kultur Jaringan Anggrek Hitam

Riwayat bahan tanam anggrek hitam (Ilustrasi 2) berasal dari hasil perbanyakan secara generatif dengan kultur jaringan yaitu dengan inisiasi benih anggrek hitam yang dilakukan selama 3-4 bulan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, berlokasi di pusat kota Bogor. Tahap inisiasi dilakukan untuk tujuan menumbuhkan kalus dengan penggunaan media MS tanpa hormon. Kemudian dilakukan multiplikasi ke-1 hingga ke-3 dengan menggunakan bahan tanam bagian dari vegetatifnya yaitu tunas baru yang dilakukan di CV. Esha flora, kota Bogor. Selang waktu dilakukannya multiplikasi ke-1 hingga ke-2 dilakukan setelah 2-4 bulan, ini berlaku untuk multiplikasi selanjutnya. Tahapan multiplikasi ke-1 hingga ke-3 dilakukan untuk tujuan menumbuhkan tunas yang menggunakan media MS dengan penambahan glisin dan pepton. Penelitian ini dilakukan pada multiplikasi ke-4 dengan bahan tanam yang digunakan merupakan hasil dari multiplikasi ke-3 yaitu bagian vegetatif tanaman berupa tunas anggrek hitam. Tujuan dari multiplikasi ke-4 ini adalah untuk menumbuhkan tunas dengan media yang digunakan adalah media MS instan dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA. Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan di Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Tahapan setelahnya bisa dilakukan multiplikasi ke-5 dan ke-6 dengan menggunakan media khusus pengakaran. Tahapan terakhir dilakukan aklimatisasi dengan penggunaan media tanam seperti akar kadaka, moss, sabut kelapa atau media lainnya (Ilustrasi 2).

Penelitian ini terdiri atas tahapan sterilisasi ruang dan alat, pembuatan larutan stok BAP dan NAA, pembuatan media dan sterilisasi media kultur, persiapan bahan

tanam dan multiplikasi, dan pengamatan. Berikut rincian prosedur tahapan kultur jaringan anggrek hitam yang dilakukan pada penelitian ini, diantaranya:

1. Sterilisasi ruang dan alat



Ilustrasi 3. Sterilisasi Ruang dan Alat, (a) Fumigasi dan pencucian botol serta alat, (b) Sterilisasi botol dan alat dengan autoklaf

Sterilisasi ruang dan alat dilakukan dengan cara sebagai berikut (Ilustrasi 3):

1. Sterilisasi ruang dilakukan fumigasi ruangan yang dilakukan setiap tiga kali dalam seminggu dan selalu dilakukan sebelum dilakukannya kegiatan kultur jaringan. Fumigasi dilakukan dengan cara semua meja laboratorium dibersihkan dengan kain bersih yang sudah direndam satu malam dengan *Natrium hipoklorit* 5%. Lantai ruangan disapu dan dipel sebanyak dua kali, pertama dipel dengan cairan pembersih lantai dengan bahan aktif *Benzalkonium Chloride* 1,5%, kemudian dipel dengan cairan *Natrium hipoklorit* 5%. Setiap sisi ruangan disemprot dengan alkohol 70% dan formalin.
2. Sterilisasi alat dilakukan dengan alat-alat seperti botol kultur, cawan petri, pinset dan *scalpel* yang direndam dengan cairan surfaktan selama 30 menit

dan direndam dengan *Natrium hipoklorit* 5% selama satu malam. Kemudian, alat-alat dicuci dengan air dan dikeringkan dengan kain bersih serta disemprot alkohol 70%. Alat - alat seperti logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas dan plastik, sedangkan alat seperti botol ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet pada bagian leher botol. Kemudian semua alat disterilkan dengan autoklaf.

3. Sterilisasi botol dan alat dengan autoklaf dilakukan dengan semua alat dimasukkan ke dalam autoklaf hingga memenuhi volume autoklaf yang sudah diisi dengan aquades hingga batas. Tutup dan kunci autoklaf kemudian *setting* autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Setelah selesai, semua alat dikeluarkan dari autoklaf dan disimpan pada ruang inkubasi dengan suhu 23 – 25°C dan kelembaban 70 - 80%.

2. Pembuatan larutan stok BAP dan NAA

Pembuatan stok BAP dan NAA dengan konsentrasi 100 mg/L dalam volume total 100 mL dilakukan dengan cara BAP dan NAA ditimbang masing-masing sebanyak 0,01 g (Lampiran 4 dan 5), kemudian diencerkan dengan aquades hingga 100 mL. Larutan tersebut diaduk dengan *magnetic stirrer* dan ditambahkan 1 mL larutan HCl 0,1 N sebagai pelarut hingga homogen. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam botol dan diberi label pada tiap botolnya dan disimpan dalam lemari pendingin.

3. Pembuatan media dan sterilisasi media

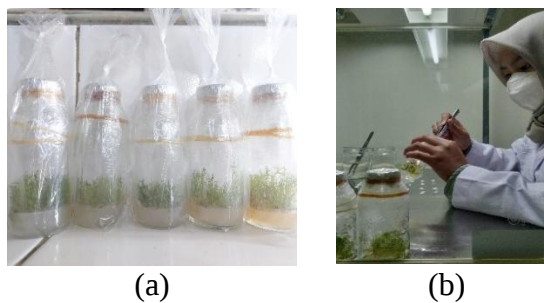


Ilustrasi 4. Pembuatan Media Kultur

Pembuatan media dan sterilisasi media dilakukan dengan media MS instan sebanyak 4,43 g/L dituang pada gelas ukur (1 L) berisi akuades steril lalu ditambahkan gula putih sebanyak 30 g/L serta zpt BAP dan NAA sesuai dengan taraf perlakuan. Larutan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan diukur pH media dengan kertas lakmus pH universal dengan pH yaitu 5,6 – 5,8. Penurunan dan peningkatan pH dilakukan dengan penambahan beberapa tetes larutan HCl 0,1 N dan NaOH 0,1 N. pH kurang dari 5,6 ditambahkan dengan larutan NaOH sedangkan pH lebih dari 5,8 ditambahkan dengan larutan HCl. Selanjutnya agar-agar 8 g/L dan arang aktif 2 g/L ditambahkan pada labu erlenmeyer dan dipanaskan dengan *hot magnetic stirrer* hingga mendidih dan homogen (Ilustrasi 4). Larutan kemudian dituang ke masing- masing botol kultur $\pm$ 30 mL dan ditutup dengan plastik dan karet. Media yang telah dibuat dilakukan sterilisasi media dengan autoklaf. Semua media dimasukkan ke dalam autoklaf hingga memenuhi volume autoklaf yang sudah diisi dengan akuades hingga mencapai batas. Autoklaf ditutup dan dikunci kemudian *disetting* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Setelah 20 menit, tutup autoklaf dibuka dan semua media dikeluarkan dan

disimpan pada ruang kultur dengan suhu 23 – 25°C dan kelembaban 70 - 80%. Media dapat dipakai setelah pembuatan media minimal 7 hari, hal ini dimaksudkan untuk melihat ada tidaknya kontaminasi bakteri dan jamur terhadap media.

4. Persiapan bahan tanam dan multiplikasi



Ilustrasi 5. Persiapan Bahan Tanam dan Multiplikasi, (a) Bahan tanam anggrek hitam dari multiplikasi ke-3, (b) Multiplikasi ke-4 anggrek hitam

Bahan tanam merupakan tunas anggrek hitam hasil dari multiplikasi ke-3 yang akan disubkultur ke media baru pada multiplikasi ke-4. Persiapan dilakukan dengan botol berisi bahan tanam dan botol berisi media baru serta alat-alat lainnya harus disemprot dengan alkohol 70% sebelum dimasukkan ke meja *Laminar Air Flow* (LAF). Multiplikasi ke-4 dilaksanakan di dalam LAF dengan cara bahan tanam planlet anggrek hitam (*Coelogyne pandurata*) diambil dari botol dengan alat pinset. Kemudian planlet dipindahkan ke dalam cawan petri untuk dipisahkan dengan *scalpel*. Setelah dipisahkan, planlet ditanam dengan pinset ke dalam botol kultur berisi media yang telah diberi kombinasi perlakuan BAP dan NAA dengan variasi konsentrasi (Ilustrasi 5). Kemudian mulut botol didekatkan ke api bunsen secara memutar, ditutup plastik dan diikat dengan karet, dibungkus dengan *plastic*

wrap dan diberi label lalu disimpan di ruang kultur dengan suhu 23 – 25°C dan kelembaban 70 - 80%. Hasil multiplikasi ke-4 disajikan pada (Lampiran 6 dan 7).

5. Pengamatan



Ilustrasi 6. Pengamatan Pertumbuhan Anggrek Hitam Tiap Minggu

Pengamatan dilakukan selama 8 minggu, serta dilakukan pengambilan data dan dokumentasi di akhir pengamatan (Ilustrasi 6). Parameter yang diamati diantaranya waktu muncul tunas (minggu), tinggi tunas (cm), tinggi planlet (cm), jumlah daun (helai), jumlah tunas (buah), jumlah akar (buah), panjang akar (cm), bobot segar planlet (mg), persentase kontaminasi (%) dan persentase planlet tumbuh (%).

3.2.3. Parameter Penelitian

Pengamatan dilakukan setiap minggu hingga minggu ke-8 dengan parameter pengamatan yang diamati antara lain:

1. Waktu muncul tunas (minggu)

Waktu muncul tunas diukur dengan menghitung minggu seberapa muncul tunas pada planlet.

2. Tinggi tunas (cm)

Tinggi tunas diukur dengan menggunakan alat penggaris (0,10 cm) dari pangkal batang hingga ujung daun tertinggi yang dilakukan di akhir pengamatan.

3. Tinggi planlet (cm)

Tinggi planlet diukur dengan menggunakan alat penggaris (0,10 cm) dari pangkal batang hingga ujung daun tertinggi yang dilakukan di akhir pengamatan.

4. Jumlah daun (helai)

Jumlah daun diukur dengan menghitung jumlah daun yang tumbuh pada planlet yang dilakukan di akhir pengamatan.

5. Jumlah tunas (buah)

Jumlah tunas diukur dengan menghitung jumlah tunas yang tumbuh pada planlet yang dilakukan di akhir pengamatan.

6. Jumlah akar (buah)

Jumlah akar diukur dengan menghitung jumlah akar yang tumbuh pada planlet yang dilakukan di akhir pengamatan.

7. Panjang akar (cm)

Panjang akar diukur dengan alat penggaris (0,10 cm) dari pangkal akar hingga ujung akar yang dilakukan di akhir pengamatan.

8. Bobot segar planlet (mg)

Bobot segar planlet diukur dengan cara seluruh bagian planlet ditimbang dengan alat neraca digital (0,001 g) yang dilakukan di akhir pengamatan.

9. Persentase kontaminasi (%)

Persentase kontaminasi diukur dengan cara jumlah media yang terkontaminasi dihitung setiap minggunya hingga minggu ke-8, dimana kontaminasi jamur dicirikan dengan adanya hifa berwarna putih dan abu-abu seperti benang dan membentuk koloni seperti kapas dan tanaman kering; Serta media terkontaminasi bakteri yang dicirikan dengan tanaman berlendir, berserat/bergaris dan tanaman kuning/pucat. Rumus persentase kontaminasi sebagai berikut:

$$\text{Persentasi kontaminasi (\%)} = \frac{\text{Jumlah botol yang terkontaminasi}}{\text{Jumlah ulangan}} \times 100\%$$

10. Persentase planlet tumbuh (%)

Persentase planlet tumbuh diukur dengan cara jumlah planlet yang tumbuh dihitung setiap minggunya hingga minggu ke-8. Rumus persentase tumbuh sebagai berikut:

$$\text{Persentase planlet tumbuh (\%)} = \frac{\text{Jumlah planlet yang tumbuh}}{\text{Jumlah planlet yang ditanam}} \times 100\%$$

3.2.4. Analisis Data

Model linear aditif yang menjelaskan setiap nilai pengaruh sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + N_j + (BN)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

Y_{ijk} = Nilai pengamatan akibat pengaruh konsentrasi BAP ke-i dan konsentrasi NAA ke-j pada ulangan ke-k

μ = Nilai rata-rata populasi dari total perlakuan

B_i = Pengaruh aditif konsentrasi BAP ke i ($i = 0,00; 0,50; 1,00; 1,50$)

N_j = Pengaruh aditif konsentrasi NAA ke j ($j = 0,00; 0,50; 1,00$)

$(BN)_{ij}$ = Pengaruh interaksi antara konsentrasi BAP ke- i dan konsentrasi NAA ke- j

ϵ_{ijk} = Pengaruh galat percobaan yang disebabkan oleh perlakuan konsentrasi BAP ke- i dan konsentrasi NAA ke- j

Hipotesis statistik yang diuji dalam penelitian meliputi:

1) Pengaruh faktor konsentrasi BAP

H0 : $B_1 = B_2 = B_3 = B_4 = 0$ (Tidak ada pengaruh konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata*)

H1 : Minimal ada satu $B_i \neq 0$ (Ada pengaruh konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata*)

2) Pengaruh faktor konsentrasi NAA

H0 : $N_1 = N_2 = N_3 = 0$ (Tidak ada pengaruh konsentrasi NAA terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata*)

H1 : Minimal ada satu $N_i \neq 0$ (Ada pengaruh konsentrasi NAA terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata*)

3) Pengaruh interaksi konsentrasi BAP dan konsentrasi NAA

H0 : $B_0N_0 = B_0N_1 = B_0N_2 = \dots = B_4N_3 = 0$ (Tidak ada pengaruh interaksi antara konsentrasi BAP dengan konsentrasi NAA terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata*)

H1 : Minimal ada satu $B_iN_j \neq 0$ (Ada pengaruh interaksi antara konsentrasi BAP dengan konsentrasi NAA terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Coelogyne pandurata*)

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf 5% untuk mengkaji adanya pengaruh perlakuan. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dapat dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf 5% untuk membandingkan perbedaan rata-rata antar perlakuan serta uji Polinomial Ortogonal (PO) untuk melihat konsentrasi optimal pada perlakuan.