

Induksi Kalus pada Kultur Pollen *Phalaenopsis* dengan Menggunakan Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat

NI PUTU MERTHANINGSIH, HESTIN YUSWANTI^{*}, DAN
A.A. MADE ASTININGSIH

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman, Denpasar, 80231, Bali
^{*}E-mail: hestin.yuswanti@yahoo.com

ABSTRACT

Callus Induction on *Phalaenopsis* Pollen using 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. Tissue culture is one of the modern methods of plant propagation. In tissue culture hormone has an important role. The goals of this research was to determine the effect of 2,4-D hormone on callus growth of *Phalaenopsis* pollen explants on NP media and to know the most optimal concentration for the formation and growth of explants. This research used the complete randomized design with five treatment of 2,4-D dosage such as 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, 1.5 ppm, and 2 ppm. The variables observed in this research was time of explant swollen, percentage of explant swollen, time of explants detached, percentage of explants detached, time of callus growing, percentage of explants grow callus, callus colour, and callus texture. The result of analysis was 1,5 ppm of 2,4-D treatment gave the best effect to explants, with the fastest swollen explants time of 3 days after culture, the highest swollen explants (86.6%), the fastest detached explants (7.4 days after culture), and the highest detached percentage (66.6%), time of explant growth callus (28.4 days after culture) and percentage of explant growth callus (53.3%).

Keywords: Callus, Phalaenopsis pollen, 2,4-D

PENDAHULUAN

Anggrek merupakan salah satu tanaman hias yang termasuk dalam famili *Orchidaceae*. Kebanyakan anggota famili ini hidup sebagai epifit, terutama yang berasal dari daerah tropika (Silviasari, 2010). Pengembangan anggrek *Phalaenopsis* masih banyak mengalami masalah dari segi teknik budidaya, salah satunya masih adanya gangguan hama dan penyakit yang sering kali dapat menyebabkan pengusaha anggrek

atau pemilik *nursery* mengalami kerugian secara ekonomis yang dilaporkan oleh pemilik *nursery* Bali Sai *Orchid* (Ibu Dita, komunikasi pribadi 2017). Untuk mengatasi permasalahan tersebut, diperlukan bibit tanaman anggrek yang sehat khususnya *Phalaenopsis*.

Kultur anther dengan menggunakan eksplan berupa pollen *Phalaenopsis* dilakukan secara *invitro*, namun banyak faktor yang menentukan keberhasilannya seperti media dan zat pengatur tumbuh.

Media tumbuh pada kultur jaringan sangat besar pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang dihasilkannya (Tuhuteru *et al.*, 2012). *New Phalaenopsis* (NP) merupakan media khusus untuk menumbuhkan anggrek genus *Phalaenopsis* secara *invitro*, sehingga pada penelitian ini media NP dipilih sebagai media regenerasi pollen *Phalaenopsis*. Selain media, hal yang terpenting dalam keberhasilan kultur jaringan adalah zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT adalah senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah mampu mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Kalus adalah suatu kumpulan sel *amorphous* yang terjadi dari sel-sel yang membelah diri secara terus menerus dalam keadaan *in vitro*. Kalus dapat diperoleh dari bagian tanaman seperti akar, batang, daun, maupun pollen (Moega, 1991 dalam Sudarmandji, 2003). Zat pengatur tumbuh auksin yang sering digunakan dalam media kultur *in vitro* adalah asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D). Penambahan asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pertumbuhan kalus.

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui respon pertumbuhan pollen *Phalaenopsis* yang menggunakan media *New Phalaenopsis* dengan penambahan zat pengatur tumbuh asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas

Pertanian Universitas Udayana, Jalan Pulau Moyo, Denpasar. Dilaksanakan mulai Bulan Oktober 2017 – Februari 2018. Bahan tanam yang digunakan pollen *Phalaenopsis*, yang disterilisasi terlebih dahulu dengan perlakuan perendaman fungisida 0,5ml/L (Score) selama 5 menit, kemudian dibilas dengan aquades. Kemudian eksplan direndam dengan alkohol 70% selama 1 menit. Formulasi media dasar yang digunakan media *New Phalaenopsis* (NP), derajat keasaman media diatur pada pH 5,6-5,8. Bahan sterilan (*Detergent*, Dithane, dan alkhohol).Suhu ruangan berkisar antara 26-30°C.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan media *New Phalaenopsis* (NP) dan 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetat) perlakuan yakni $K_0 = NP + 0$ ppm 2,4-D, $K_1 = NP + 0,5$ ppm 2,4-D, $K_2 = NP + 1$ ppm 2,4-D, $K_3 = NP + 1,5$ ppm 2,4-D dan $K_4 = NP + 2$ ppm 2,4-D dengan 5 perlakuan di ulang sebanyak 5 kali, sehingga diperoleh 25 unit percobaan. Setiap unit percobaan ditanam 3 eksplan.

Pengamatan dilakukan setiap hari, variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah saat eksplan membengkak, persentase eksplan membengkak. Persentase eksplan membengkak dihitung dari banyaknya jumlah eksplan yang membengkak dalam satu botol, saat eksplan memisah, persentase eksplan memisah, saat tumbuh kalus, persentase eksplan tumbuh kalus, warna kalus dan tekstur kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan eksplan membengkak dilakukan setiap hari setelah tanam. Pengamatan meliputi saat eksplan

membengkak dan persentase eksplan ppm 2,4-D, sedangkan saat eksplan membengkak terbanyak. Saat eksplan membengkak paling lama adalah (K₀) yaitu membengkak tercepat adalah 3,0 HST, 5,6 HST tanpa pemberian hormon 2,4-D terdapat pada perlakuan (K₃) konsentrasi 1,5 (Tabel 1).

Tabel 1. Saat Eksplan Membengkak dan Persentase Eksplan Membengkak

Perlakuan	Saat Eksplan Membengkak (HST)	Persentase Eksplan Membengkak (%)
K ₀	5.6	60.0
K ₁	3.8	73.3
K ₂	4.2	80.0
K ₃	3.0	86.6
K ₄	4.6	80.0

Persentase eksplan yang membengkak tertinggi secara berurutan terdapat pada perlakuan K₃ (86,6%), K₂ (80,0%), dan K₄ (80,0%), K₁ (73,3%) dan K₀ (60,0%) (Tabel 2).

Tabel 2. Saat Eksplan Memisah dan Persentase Eksplan Memisah

Perlakuan	Saat Eksplan Memisah (HST)	Persentase Eksplan Memisah (%)
K ₀	14.0	6.7
K ₁	9.2	46.6
K ₂	8.8	46.6
K ₃	7.4	66.6
K ₄	10.0	20.0

Eksplan memisah tercepat terdapat pada perlakuan K₃ yakni (7,4 HST). Eksplan yang memisah paling lama terdapat pada perlakuan K₀ (14,0 HST) (Tabel 2). Persentase eksplan memisah tertinggi terdapat pada perlakuan K₃ (66,6%), dan perlakuan K₀ (6,7%), K₁ dan K₂ (46,6%), dan K₄ (20,0%) menunjukkan persentase eksplan yang memisah terendah (Tabel 2).

Eksplan yang mulai menjadi kalus diamati setiap hari setelah eksplan ditanam sampai terjadi perubahan. Perubahan yang diamati berupa memisahnyapollendan mulai menggerombol membentuk kalus dengan warna kuning pucat atau putih. Induksi kalus tercepat terjadi pada perlakuan K₃ (28,4 HST). Tumbuhnya kalus paling lama terdapat pada perlakuan K₁ (30,0 HST). Perlakuan K₂ dan K₄ menunjukkan angka yang sama (29,3 HST).

Tabel 3. Saat Eksplan Tumbuh Kalus dan Persentase Eksplan Tumbuh Kalus

Perlakuan	Saat Eksplan Tumbuh Kalus (HST)	Persentase Eksplan Tumbuh Kalus (%)
K ₀	0.0	0.0
K ₁	30.0	20.0
K ₂	29.3	33.3
K ₃	28.4	53.3
K ₄	29.3	20.0

Persentase eksplan yang menjadi kalus tertinggi secara berurutan terdapat pada perlakuan K₃ (53,3%), K₂ (33,3%), K₁ dan K₄ (20,0%) dapat dilihat pada (Tabel 3). Warna kalus pada perlakuan K₁, K₂, K₃ dan K₄ menunjukkan warna yang sama yaitu kuning keputihan. Dari segi tekstur, perlakuan K₁,

K₂, K₃ dan K₄ menunjukkan tekstur yang remah. Kalus dengan warna putih dianggap baik dikarenakan memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Tekstur remah dianggap baik karena bersifat embriogenik, sifat embriogenik ini mempunyai kemampuan yang lebih tinggi untuk membentuk organ.

Tabel 4. Warna Kalus dan Tekstur Kalus

Perlakuan	Warna Kalus	Tekstur Kalus
K ₀	-	-
K ₁	Kuning Keputihan	Remah
K ₂	Kuning Keputihan	Remah
K ₃	Kuning Keputihan	Remah
K ₄	Kuning Keputihan	Remah

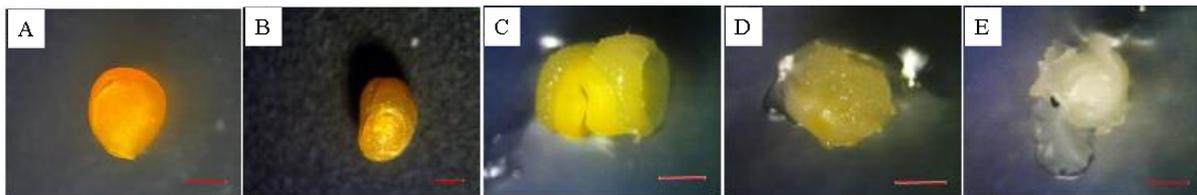
Kalus merupakan sumber bahan tanam yang penting untuk regenerasi tanaman baru. Kalus dapat diperoleh dari seluruh bagian tanaman, salah satunya melalui kultur pollen *Phalaenopsis*. Pembentukan kalus ada berbagai banyak faktor yang mendukung keberhasilannya, salah satunya penggunaan zat pengatur tumbuh. Pada penelitian ini digunakan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin yaitu asam 2,4-D. Warna kalus dari perlakuan K₁-K₄ sama yaitu kuning keputihan dengan tekstur kalus remah (Tabel 4). Penggunaan konsentrasi 2,4-D dengan hasil terbaik adalah sebanyak 1,5 ppm, yang

ternyata mampu menginduksi terbentuknya kalus *Phalaenopsis* yang berasal dari pollen secara *in vitro*. Pada umur 3 hari setelah dikulturkan mulai terlihat perubahan pada pollen berupa pembengkakan.

Pembengkakan eksplan pada penelitian ini diduga merupakan respon yang mengarah ke pembentukan kalus. Ajjiah *et al.*, (2010) menyatakan bahwa pembengkakan pada eksplan adalah tahap awal pembentukan kalus yang mengindikasikan adanya aktivitas sel pada eksplan. Pembengkakan tercepat dan persentase pembengkakan terbanyak terdapat pada perlakuan K₃ (1,5 ppm 2,4-D).

Pembengkakan paling lama dan persentase pembengkakan terendah pada perlakuan K₀ (0 ppm, 2,4-D) (Tabel 1). Pembengkakan eksplan dapat dilihat pada Gambar 1. Respon pembengkakan terjadi karena adanya interaksi antara eksplan terhadap lingkungan tumbuh dan zat pengatur tumbuh melalui penyerapan nutrisi yang dilakukan oleh

eksplan (Sitinjak *et al.*, 2015). Diduga pembesaran pada sel yang terjadi sebagai aktivitas sel berupa penyerapan air dan unsur hara yang mengakibatkan eksplan mengalami pembengkakan. Pada penelitian ini hampir semua perlakuan pada setiap eksplan mengalami pembengkakan, hanya saja waktu pembengkakan yang tidak bersamaan.

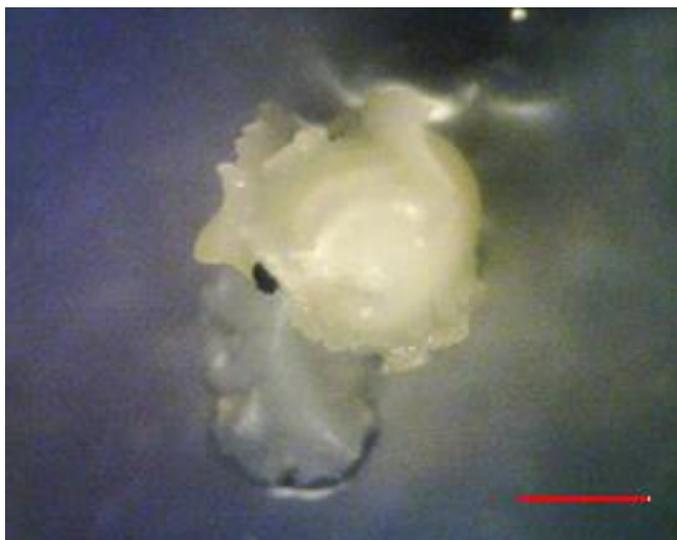


Gambar 1. Tahap perkembangan pollen Phalaenopsis, A. Pollen umur 0 HST, B. Pollen umur 7 HST, C. Pollen umur 14 HST, D. Pollen umur 28 HST, E. Pollen umur 56 HST. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 20x. Skala = 0,125 cm.

Respon selanjutnya yang terjadi selama pengamatan adalah eksplan yang membengkak mengalami pemisahan menjadi dua. Namun tidak semua eksplan mengalami perubahan seperti ini. Memisahkannya eksplan tercepat dan persentase memisah terbanyak terdapat pada perlakuan K₃ (7,4 HST sebanyak 66,6%), sedangkan persentase eksplan yang memisah paling lama dan persentase eksplan yang paling rendah terdapat pada perlakuan K₀ (14,0 HST sebanyak 6,7%) (Tabel 2). Respon terhadap waktu memisahkannya eksplan dari setiap perlakuan berbeda-beda. Perbedaan ini terjadi karena adanya perbedaan jumlah konsentrasi 2,4-D yang diberikan. Pengaruh pemberian suatu konsentrasi zat pengatur tumbuh berbeda untuk setiap tanaman, jenis

tanaman, bahkan berbeda pula antar varietas suatu spesies (Hidayat, 2009).

Auksin 2,4-D merupakan hormon yang dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel. Plastisitas dan pengembangan dinding sel didorong oleh pemberian auksin, karena auksin mengeluarkan H⁺ ke dalam dinding sel yang menyebabkan pH dinding sel menurun sehingga terjadi pelonggaran struktur dinding (plastisitas meningkat) sehingga ukuran sel bertambah (Wardani *et al.*, 2004).



Gambar 2. Kalus dari pollen *Phalaenopsis* pada perlakuan $K_3 = 1,5$ ppm. Skala = 0,125 cm.

Pengamatan destruktif dilakukan untuk melihat anatomi sel pada masing – masing fase (pembengkakan, memisah dan mulai terbentuknya kalus). Pengamatan ini bertujuan agar mengetahui aktivitas sel didalam organ (pollen *Phalaenopsis*). Berdasarkan gambar anatomi sel (gambar 3) diketahui bahwa gambar A dimana eksplan berumur 0 hari struktur sel yang terbentuk masih rapat, secara visual tekstur pollen keras, dan agak lengket. Kultur pollen pada 7 HST secara visual terlihat mulai mengalami pembengkakan, dengan tekstur yang sudah mulai meremah, gambar B terlihat anatomi sel mulai mengalami celah, terpisah dan agak sedikit merenggang. Perubahan ini terjadi diduga karena adanya penambahan 2,4-D. Aktivitas 2,4-D dalam media kultur dapat menyebabkan elongasi sel, pembengkakan jaringan dan pembentukan kalus.

Winarto *et al.*,(2010) menyatakan bahwasel pada dinding anther merupakan sel-sel yang mudahdiferensiasi menjadi kompeten dan responsif untuk diinduksi dan diregenerasi membentuk kalus. Kultur pollen

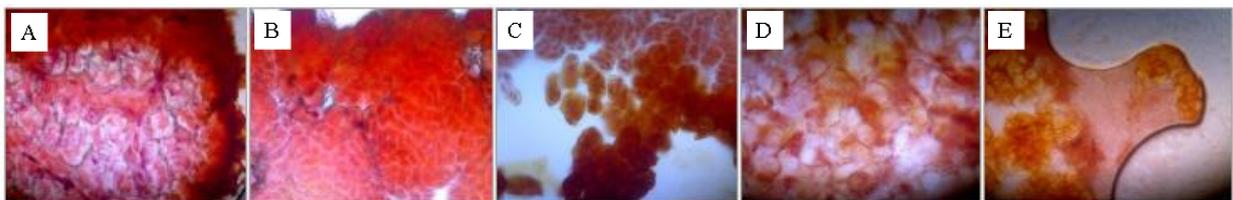
pada14 HST secara visual eksplan terlihat mulai mengalami memisah, dengan tekstur remah pada gambar C sel – sel mulai mengalami pemisahan secara berkelompok dan mulai terlihat ruang kosong diantara sel – sel yang sebelumnya rapat dengan kultur yang berumur 7 HST. Hormon 2,4-D akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus.

Pada pembentukan kalus, penambahan 2,4-D memiliki peran yang sangat signifikan terhadap proses pembentukan kalus, terkait dengan diferensiasi, dan peningkatan aktivitas sel (Winarto *et al.*, 2010). Pada kulturpollen 28 dan 56 HST sudah mulai terbentuknya kalus, secara visual eksplan bergerombol, dengan tekstur yang sangat remah dan warna yang semakin kuning pucat hampir keputihan (Gambar 3). Pada gambar D dan E sel terlihat semakin memisah, renggang dan semakin banyak terdapat ruang kosong antar sel. Pada bagian dinding sel bagian – bagian sel semakin rapat dan membentuk tonjolan, tonjolan ini diduga

akan menjadi tunas (bakal tunas). Perbedaan waktu pertumbuhan kalus selain dipengaruhi oleh peningkatan kecepatan pembelahan sel karena pengaruh pemberian 2,4-D juga dipengaruhi oleh kondisi genetik, umur jaringan dan jenis tanaman serta faktor lingkungan yang meliputi cahaya, kandungan O₂, suhu dan kelembaban udara (Gunawan *et al.*, 1992).

Pengaruh pemberian hormon 2,4-D mampu merespon pertumbuhan dan pembentukan kalus pollen *Phalaenopsis* dibandingkan tanpa perlakuan pemberian

hormon 2,4-D (kontrol). Hal ini disebabkan karena pembentukan kalus pada eksplan, secara fisiologi dipengaruhi oleh perubahan genetik pada sel tanaman oleh auksin. Sel yang merespon auksin akan menyebabkan diferensiasi sel dan memacu pembelahan sel, senyawa auksin 2,4-D merupakan jenis auksin yang berperan dalam merangsang perbesaran dan sangat baik dalam pembelahan sel untuk membentuk kalus (Kumianjani *et al.*, 2015).



Gambar 3. Tahap perkembangan anatomi pollen *Phalaenopsis*, A. Pollen umur 0 HST, B. Pollen umur 7 HST, C. Pollen umur 14 HST, D. Pollen umur 28 HST, E. Pollen umur 56 HST. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 40x.

Penambahan konsentrasi pada perlakuan K₄ (2 ppm 2,4-D) ternyata masih memberikan hasil yang kurang dari perlakuan terbaik yaitu K₃ (1,5 ppm 2,4-D). Hal ini sesuai dengan fungsi zat pengatur tumbuh yaitu aktif dalam konsentrasi rendah (<1 mM) mampu mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Dalam hal ini konsentrasi K₄ diduga kurang optimal dan dianggap dapat menghambat pertumbuhan pollen *Phalaenopsis*. Asam 2,4-D merupakan auksin yang kuat, sehingga dalam konsentrasi yang tidak sesuai atau bahkan berlebihan dapat menghambat bahkan dapat

berfungsi sebagai herbisida (Purwitasari *et al.*, 2012).

Meskipun untuk semua perlakuan digunakan pollen setelah 30 hari bunga mekar, tetapi keadaan tiap sel penyusunnya tidaklah sama. Menurut Lakitan (1996) setiap sel mempunyai kepekaan tersendiri terhadap zat tumbuh yang diberikan, selain itu waktu pembelahan sel untuk memperbanyak diri tidak sama karena siklus selnya berbeda-beda. Perbedaan persentase pertumbuhan kalus juga dipengaruhi oleh kemampuan jaringan untuk menyerap unsur hara yang tersedia, hal ini banyak dipengaruhi oleh aerasi dan tekstur kalus.

Morfologi kalus merupakan bentuk fisik kalus yang dihasilkan dalam setiap perlakuan yang diamati berdasarkan bentuk, warna dan tekstur kalus. Kalus yang dihasilkan dengan perlakuan K₃ (1,5 ppm 2,4-D) berwarna kuning pucat agak keputihan, dengan tekstur yang sangat remah (Gambar 2). Kalus yang baik adalah kalus yang memiliki tekstur yang remah karena mudah dipisahkan menjadi sel-sel tunggal (Armila *et al.*, 2014). Kalus tipe kompak umumnya mempunyai pertumbuhan yang lambat, sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat namun kalus tipe kompak dianggap baik untuk digunakan sebagai penghasil metabolit sekunder (Indah *et al.*, 2013), sedangkan tipe kalus yang intermediet mempunyai pertumbuhan yang lebih cepat (Fitriani, 2008).

Warna kalus digunakan sebagai salah satu indikator untuk menentukan baik tidaknya kualitas kalus. Kualitas kalus yang baik adalah kalus yang berwarna hijau, sedangkan warna putih atau terang dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus cukup baik (Andaryani, 2010). Widyawati (2010), menyatakan bahwa pertumbuhan kalus yang semakin menurun ditandai dengan adanya warna yang semakin gelap (menjadi coklat). Perubahan warna kalus tersebut menunjukkan adanya perubahan fase pertumbuhan pada sel dan daya regenerasi sel. Warna putih menunjukkan sel-sel yang masih muda yang aktif membelah, warna kuning atau putih kekuningan menunjukkan bahwa sel-sel yang dewasa menuju fase pembelahan aktif (Armila *et al.*, 2014). Berdasarkan pengamatan yang dilakukan selama 60 HST warna kalus yang dihasilkan dari induksi eksplan *pollen*

Phalaenopsis adalah putih (Gambar 2). Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embriogenik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi (Tsuro, 1998). Kalus yang bersifat embriogenik adalah kalus yang memiliki sel yang berukuran kecil, sitoplasma padat, inti sel besar, vakuola kecil dan mengandung butiran pati.

SIMPULAN

1. Perlakuan yang sudah berhasil menginduksi kalus pollen *Phalaenopsis* yaitu perlakuan 0,5 ppm 2,4-D, 1 ppm 2,4-D, 1,5 ppm 2,4-D dan 2 ppm 2,4-D. Namun pada perlakuan 1,5 ppm 2,4-D memberikan hasil yang terbaik (tercepat dan terbanyak) dari perlakuan yang lainnya.
2. Induksi kalus pollen *Phalaenopsis* terbaik terdapat pada perlakuan 1,5 ppm asam 2,4-D saat eksplan membengkak tercepat (3,0 HST), persentase eksplan membengkak terbanyak (86,6%), saat eksplan memisah tercepat (7,4 HST), persentase eksplan yang memisah terbanyak (66,6%), saat muncul kalus tercepat (28,4 HST) dan persentase eksplan menjadi kalus terbanyak (53,3%).

DAFTAR PUSTAKA

- Andaryani, S. 2010. Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Secara *In Vitro*. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret.
- Armila, N. K. P., Mirni, U. P., Zainuddin, B. 2014. Sterilisasi dan Induksi Kalus Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) Lokal Palu Secara *In Vitro*. E-

- Jurnal Agrotekbis 2 Vol.2 (2) : 129-137.
- Bekti, R., Solichatun., E. Anggarwulan.2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. Biofarmasi. Vol.1, No.1., ISSN:1693-2242.
- Fitriani, H., 2008, Kajian Konsentrasi BAP dan NAA terhadap Multiplikasi Tanaman *Artemisia annua* L. secara *In Vitro*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian UNS, Surakarta.
- Indah P.N. dan D. Ermavitalini.2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Jurnal Sains dan Seni Pomits. Vol.2, No.1.,2337-3520.
- Kumianjani, E., Revandy, I. D., Luthfi, A.M.S. 2015. Pengaruh Pemberian N 2, 4-D Terhadap Pertumbuhan dan Metabolisme Kalus Kedelai pada Kondisi Hipoksida Secara *In vitro*. Jurnal Agroekoteknologi Vol 4 (1), Desember 2015 (555):1673 – 1680.
- Ramdan. 2011. Kultur Daun Dan Pangkal Batang *In Vitro* Anggrek Bulan Raksasa (*Phalaenopsis Gigantea* J.J.Smith) pada Beberapa Media Kultur Jaringan. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor, 47 hlm.
- Sitinjak, M.A., Mayta N. I., Siti. F. 2015. Induksi Kalus dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Typhonium* sp.) dengan Perlakuan 2,4-D dan Kinetin. Jurnal Biologi Vol 8 (1).
- Silviasari, A. D. 2010. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Ubi Jalar dan Emulsi Ikan Terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek *Dendrobium alicenodae* x *Dendrobium tomiense* dan *Phalaenopsis pinlong cinderella* X *Vanda tricolor* Pada Medium Vacin dan Went. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, 51 hlm.
- Sudarmandji. 2003. Penggunaan Benzil Amino Purine pada kalus Kapas Secara *In Vitro*. Buletin Teknik Pertanian Vol 8, No. 1.
- Tuhuteru.S., M.L. Hehanussa., S.H.T. Raharjo. 2012. Pertumbuhan dan Perkembangan Anggrek *Dendrobium anosmum* pada Media Kultur *In vitro* dengan Beberapa Konsentrasi Air Kelapa. Jurnal Agrologia, Vol. 1(1) Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura.
- Winarto., N.A. Mattjik., A. Purwito., B. Marwoto. 2010. Aplikasi 2,4-D dan TDZ dalam Pembentukan dan Regenerasi Kalus pada Kultur Anther *Anthurium*. Jurnal Hortikultura 20(1):1-9.