

Studi Kualitas Regeneran *Phalaenopsis* Hasil Kultur *In Vitro* dari Eksplan Tangkai Infloresen, Tunas Pucuk, dan Empulur (*The Quality Study of Phalaenopsis Regenerants from In Vitro Propagation of Inflorescence, Shoot Tip, and Pith Explants*)

Dewi Pramanik, Herni Shintiavira dan Budi Winarto

Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln. Raya Segunung-Ciherang, Pacet, Cianjur, Jawa Barat, Indonesia 43253

E-mail: pramanikdewi53@gmail.com

Diterima: 3 April 2018; direvisi: 7 Juni 2018; disetujui: 31 Juli 2018

ABSTRAK. Anggrek *Phalaenopsis* memiliki nilai komersial yang tinggi, karena keindahannya dapat dinikmati sepanjang tahun. Hal tersebut berdampak pada kebutuhan benih tanaman yang semakin meningkat. Salah satu cara penyediaan benih secara massal adalah melalui perbanyakan klonal secara *in vitro* sehingga perlu dilakukan studi kualitas regeneran hasil perbanyakan klonal untuk menjamin ketersediaan benih dengan kualitas baik. Penelitian bertujuan menguji kualitas regeneran yang dihasilkan dari perbanyakan klonal secara *in vitro* beberapa varietas *Phalaenopsis* dengan menggunakan eksplan yang berbeda. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kebun Percobaan Segunung, Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi) sejak bulan Januari 2014 hingga Mei 2015. Penelitian menggunakan dua faktor, yaitu varietas (Ayu Lestari, Ayu Pratiwi, dan Karindra) dan jenis eksplan (tangkai infloresen, tunas pucuk, dan empulur). Percobaan disusun menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial dan setiap perlakuan diulang tiga kali. Hasil penelitian menunjukkan tidak terjadi interaksi yang nyata antara faktor jenis eksplan dan varietas yang diujikan pada semua tahap percobaan. Respon terbaik diperoleh pada eksplan empulur dengan 42,85% eksplan berhasil membentuk kalus pada minggu ke-8 dan hampir 100% kalus tersebut dapat beregenerasi menjadi tunas pada minggu ke-24 dengan tingkat multiplikasi tunas 1,87 kali. Pada minggu ke-32 terbentuk rata-rata 3,13 daun per planlet dengan 2,47 cm panjang daun, 1,36 cm lebar daun, 1,52 akar per planlet, dan panjang akar per planlet mencapai 1,26 cm. Kerapatan stomata memiliki korelasi negatif dengan tingkat abnormalitas planlet. Planlet dengan kerapatan stomata tertinggi dan abnormalitas yang rendah diperoleh pada var. Karindra dan planlet yang berasal dari eksplan empulur dan tunas pucuk. Setelah 8 minggu tahap aklimatisasi, tingkat keberhasilan hidup tertinggi (92%) diperoleh pada tunas yang berasal dari eksplan empulur. Penelitian membuktikan bahwa perbedaan varietas tidak memiliki pengaruh nyata pada tingkat abnormalitas regeneran dan dari eksplan empulur diperoleh jumlah regeneran tertinggi dengan kualitas baik (tingkat abnormalitas rendah).

Kata kunci: Kultur jaringan; Kualitas regeneran; *Phalaenopsis*; Jenis eksplant

ABSTRACT. *Phalaenopsis* orchids have a high commercial value, because of its beauty and it can be enjoyed throughout the year. This condition gives the impact on the increasing demand of the seeds. One of the ways of providing mass seeds is through *in vitro* clonal propagation. However, it is necessary to study the quality of regenerants of clonal propagation products to ensure the availability of qualified seeds. The aimed of this study was to test the quality of regenerants obtained from *in vitro* clonal propagation of *Phalaenopsis* using inflorescence stalk, shoot tips, and pith explants. This research was conducted at Tissue Culture Laboratory, Segunung Experimental Station, Indonesian Ornamental Crops Research Institute (IOCRI) from January 2014 to May 2015. The study used two treatments, varieties (Ayu Lestari, Ayu Pratiwi, and Karindra) and type of explant (inflorescence stalk, shoot tips, and pith). Experiments were prepared using a randomized complete block design with two factors and each treatment was replicated three times. The results showed there were no significant interaction between types of explants and varieties tested in all experiment stages. The best response was obtained using pith explants with 42.85% callus formation in the week eighth and nearly 100% callus can regenerate into shoots at week 24th with the rate of shoot multiplication up to 1.87 times. At week 32th the cultures formed plantlets with an average number of leaves of 3.13 and an average size of 2.47 cm x 1.36 cm (length x width) and an average number of roots of 1.52 with average length reached 1.26 cm. Stomatal density has negative correlation with plantlet abnormality rate. Plantlets with the highest stomatal density and low abnormality were obtained in var. Karindra and plantlet derived from explant pith and shoot buds. After 8 weeks of acclimatization stage, the highest survival rate (92%) was obtained on the shoot originating from pith explant. This study proved that varietal differences did not have a significant effect on regenerant abnormalities, and the highest number of regenerant with good quality (low abnormality rate) was obtained from pith explant.

Keywords: Tissue culture; Quality of regenerants; *Phalaenopsis*; Type of explants

Anggrek *Phalaenopsis* diproduksi di empat negara produsen utama, yaitu Jerman, Jepang, Belanda, dan Taiwan kemudian diekspor ke berbagai negara. *Phalaenopsis* dapat dinikmati keindahannya sepanjang tahun sehingga kebutuhan akan bunga tersebut semakin

meningkat. Seiring dengan hal tersebut, 20 tahun terakhir petani dan peneliti menitikberatkan pada ketersediaan tanaman dalam jumlah yang banyak sepanjang tahun (Runkle et al. 2007). Telah terjadi penurunan suplai *Phalaenopsis* sekitar 10% di pasar

Eropa pada tahun 2013 dibandingkan tahun sebelumnya yang menyebabkan harga tanaman tersebut meningkat (International Trade Center 2014). *Phalaenopsis* di Indonesia berpotensi dibudidayakan dan mempunyai nilai ekonomi yang tinggi dengan harga sekitar Rp 120.000 per pot untuk tanaman berbunga. Namun, perkembangan komersial *Phalaenopsis* masih sangat terbatas karena kurangnya ketersediaan benih yang seragam dan berkualitas. Teknologi perbanyakan massal yang efektif dan efisien akan menunjang persaingan *Phalaenopsis* di pasar lokal dan global.

Teknik perbanyakan vegetatif (klonal) melalui kultur *in vitro* sangat potensial digunakan untuk perbanyakan *Phalaenopsis* secara massal, cepat, dan seragam (Niknejad, Kadir & Kadzimin 2011; Mondal, Aditya, Banarjee 2013). Teknologi perbanyakan massal tanaman *Phalaenopsis* telah banyak dilaporkan dengan menggunakan media Murashige & Skoog (1962:MS) (Park, Murthy & Paek 2002; Gnasekaran *et al.* 2012; Antensari, Mariani & Wicaksono 2014; Rittirat, Klaosheed & Thammasiri 2014), New Dogishima Medium (Tokuhara & Mii 1993; Samarfard *et al.* 2013), XER medium (Ernst 1994; Murdad *et al.* 2006, 2010), Vacin & Went medium (Vacin & Went 1949; Niknejad, Kadir & Kadzimin 2011), dan New *Phalaenopsis* medium (Ichihashi 1992; Liu, Lin & Wu 2006). Terkait dengan media, faktor lain yang sangat berpengaruh pada perbanyakan klonal *Phalaenopsis* adalah zat pengatur tumbuh (ZPT). Beberapa ZPT yang digunakan antara lain *thidiazuron* (TDZ) (Chen, Chang & Chang 2000; Kuo, Chen & Chang 2005; Hvoslef-Eide & Preil 2005; Chen & Chang 2006; Rittirat, Klaosheed & Thammasiri 2014), *N6-benzyl adenine* (BA) (Park, Murthy & Paek 2002; Tokuhara & Mii 2003; Gow, Chen & Chang 2008; Sinha & Jahan 2011), kinetin, isopentenyl adenin (2iP), zeatin (Gow, Chen & Chang 2008), α -naphthaleneacetic acid (NAA) (Park, Murthy & Paek 2002), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Chen, Chang & Chang 2000), dengan tambahan bahan organik seperti air kelapa (Murdad *et al.* 2006; Liu, Lin & Wu 2006; Gnasekaran *et al.* 2012; Murdad *et al.* 2010; Antensari *et al.* 2014), pepton (Park, Murthy & Paek 2002), ekstrak pisang (Gnasekaran *et al.* 2012; Sinha & Jahan 2011), kentang (Park, Murthy & Paek 2002; Murdad *et al.* 2010), jus apel (Tokuhara & Mii 2001), arang aktif (Park, Murthy & Paek 2002), dan chitosan (Prasertsongsun & Chaipakdee 2011; Samarfard *et al.* (2013).

Selain faktor media dan ZPT, genotipe tanaman juga memiliki respon yang spesifik terhadap jenis eksplan (Gow, Chen & Chang 2008). Penggunaan eksplan segmen nodus pada tangkai bunga dapat menginduksi tunas. Daun dari tunas tersebut dapat digunakan untuk sumber eksplan berikutnya. Teknologi tersebut

digunakan untuk perbanyakan beberapa varietas seperti *Phalaenopsis* kultivar Tinny Sunshine Annie, Taisuco Hatarot, Taipei Gold 'Golden Star', Tinny Galaxy 'Annie' (Park, Murthy & Paek 2002), *Phalaenopsis* kultivar 'Little Steve' (Kuo, Chen & Chang 2005), *Phalaenopsis amabilis* kultivar Cool 'Breeze' (Balilashaki *et al.* 2014). Selain itu, eksplan tunas pucuk dengan ukuran 2–4 mm dari bibit *in vitro Doritis Pulcherima* Lindl dengan usia 6 bulan juga digunakan sebagai sumber eksplan untuk perbanyakan massal *Phalaenopsis* (Mondal, Aditya & Banarjee 2013). Isolasi tunas pucuk dan empulur dari induksi mata tunas sebelum pecah tunas telah dikembangkan oleh Winarto (2014) pada varietas dan klon *Phalaenopsis* Balithi, sedangkan Vendrame, Maguire & Carvalho (2007) menggunakan ujung kuncup bunga, nodus, dan tangkai bunga *Doritaenopsis* Purple Gem 'Ching Hua'. Perbanyakan klonal *Phalaenopsis* menggunakan tangkai bunga infloresen, tunas pucuk, dan empulur telah banyak dilakukan, namun belum dilaporkan kualitas regenerasi yang terkait dengan abnormalitas pada planlet regenerasi dari eksplan-eksplan tersebut.

Perbanyakan tanaman secara *in vitro* dihadapkan dengan kondisi abnormal (Hazarika 2006). Beberapa faktor penyebab terjadinya anomali fisiologi dan morfologi planlet, yaitu vitrifikasi, transparan, sukulen, dan *glassiness* (Chiruvella, Mohammed, & Ghanta 2014), rendahnya lapisan lilin pada permukaan daun dan terjadinya perubahan pigmen pada planlet (Isah 2015), rendahnya efisiensi kapasitas fotosintesis dan malfungsi stomata (Hazarika 2006; Bairu *et al.* 2008). Pada planlet yang mengalami vitrifikasi, kerapatan stomata akan jauh berkurang, namun ukuran stomata membesar (Olmos & Hellín 1998). Perubahan kerapatan stomata pada kondisi *in vitro* sangat dipengaruhi oleh faktor genetik, epigenetik respon terhadap kondisi kultur, kontrol pada perkembangan molekular pada ekspresi gen yang mengarah pada sistesis hormonal, signaling dan regulasi dari transkripsi yang memengaruhi morfogenesis dan variasi somaklonal (Schnable *et al.* 2009). Penyebab terjadinya variasi somaklonal antara lain protocol kultur jaringan tanaman (periode kultur yang panjang) dan aplikasi ZPT dengan konsentrasi yang tinggi yang mengakibatkan adanya alterasi genetik (Us-Camas *et al.* 2014; Boxus *et al.* 1999). Pada kondisi yang tidak ideal tersebut, kualitas regenerasi yang berkaitan dengan abnormalitas planlet perlu menjadi perhatian terutama dengan adanya aplikasi ZPT tertentu pada jangka panjang dan penggunaan eksplan yang berbeda, serta pengaruh genotipe yang berbeda.

Oleh karena itu, penelitian dilakukan untuk mengetahui kualitas hasil regenerasi dari jenis eksplan dan varietas *Phalaenopsis* yang berbeda. Diduga ada

satu eksplan dan satu genotipe yang dapat menghasilkan regeneran dengan kualitas baik.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan sejak bulan Januari 2014 hingga Mei 2015 di Laboratorium Kultur Jaringan, Kebun Percobaan Segunung, Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi). Bahan penelitian yang digunakan adalah tiga varietas *Phalaenopsis* hasil pemulia Balithi, yaitu Ayu Lestari, Ayu Pratiwi, dan Karindra, dan tiga jenis eksplan, yaitu tangkai infloresen, tunas pucuk dan empulur. Tanaman dipelihara di Rumah Kaca Kebun Percobaan Cipanas sesuai dengan prosedur operasional budidaya *Phalaenopsis* Balithi (Gambar 1 dan Gambar 2).

Percobaan disusun menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial dengan faktor pertama, yaitu varietas *Phalaenopsis* (Ayu Lestari, Ayu Pratiwi, dan Karindra) dan faktor kedua, yaitu jenis eksplan (tangkai infloresen, tunas pucuk, dan empulur). Setiap perlakuan terdiri atas tiga ulangan, tiap ulangan terdiri dari tiga botol dan setiap botol terdapat tiga eksplan.

Sterilisasi dan Inisiasi Tunas dari Nodus

Tangkai bunga dipanen dari tanaman donor dengan cara memotongnya pada bagian bawah (2–3 cm dari bagian pangkal tangkai). Tangkai bunga selanjutnya diusap merata dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol 96%. Setelah itu setiap segmen tangkai bunga dipotong dengan jarak $\pm 0,5$ cm di atas mata tunas dan ± 3 cm di bawah mata tunas. Jenis eksplan tangkai infloresen dan mata tunas dipisahkan, selanjutnya diletakkan di bawah air mengalir selama 30 menit, direndam dengan larutan detergen 1% selama 30

menit dan bilas dengan air hingga bersih. Setelah itu, semua eksplan yang telah dipersiapkan dibawa ke dalam *Laminair Air Flow Cabinet*. Selanjutnya, bagian atas dan bagian bawah tangkai bunga dipotong secara merata dan seludang yang menutupi mata tunas tangkai infloresen dikelupas. Sterilisasi dilanjutkan dengan menggojok eksplan dalam larutan HgCl 0,05% (w/v) selama 5 menit, dilanjutkan dalam larutan HgCl 0,01% (w/v) selama 5 menit. Kemudian bilas dengan air destilasi steril 5–6 kali masing-masing 5 menit. Sebelum ditanam eksplan diletakkan dalam petri steril yang berisi tisu steril.

Eksplan berupa tangkai infloresen dan mata tunas ditanam pada media inisiasi yang mengandung setengah konsentrasi media MS ($\frac{1}{2}$ MS) yang ditambahkan 1,5 mg/l TDZ dan 0,5 mg/l BAP (Gambar 2 abc). Eksplan tangkai infloresen diinkubasi selama 2 bulan pada kondisi inkubasi gelap, kemudian dipindah ke kondisi inkubasi terang dengan intensitas cahaya $\pm 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama 16 jam per hari pada suhu $24 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 1 bulan (Gambar 2 ab). Eksplan mata tunas ditanam pada media inisiasi selama 1 bulan hingga menghasilkan tunas yang tumbuh 0,5–1 cm pada inkubasi terang. Tunas yang tumbuh selanjutnya akan digunakan sebagai bahan untuk memperbanyak kalus/PLBs (Gambar 2c).

Inisiasi Kalus

Tunas yang dihasilkan dari tahap inisiasi dibuka seludangnya sampai menemukan tunas pucuk panjang 2 mm diisolasi dibawah mikroskop. Empulur dengan tebal 1 mm diambil dan dikultur pada media inisiasi selama 1 bulan gelap dan 1 bulan terang (Gambar 2 cd). Kalus atau embrio yang tumbuh disubkultur pada media pembentukan dan memperbanyak embrio dengan komposisi $\frac{1}{2}$ MS yang mengandung 0,75 mg/l TDZ dan 0,25 mg/l BAP yang ditambahkan 20 g/l sukrosa dan dipadatkan dengan 2 g/l gelrite. Kultur disimpan



Gambar 1. Tiga jenis varietas *Phalaenopsis* Balithi yang digunakan sebagai sumber eksplan dalam percobaan ini. (a) var. Ayu Lestari, (b) var. Ayu Pratiwi, dan (c) var. Karindra [*Three IOCRI Phalaenopsis varieties as explant sources for this experiment. (a) var. Ayu Lestari, (b) var. Ayu Pratiwi, and (c) var. Karindra*]

selama 2 bulan. Selanjutnya kalus atau embrio utuh disubkultur pada media perkecambahan kalus/embrio selama 2 bulan dengan komposisi $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan 0,5 BAP dan 20 g/l sukrosa dipadatkan dengan 2 g/l gelrite.

Pengamatan dilakukan terhadap (1) persentase eksplan membentuk kalus yang dihitung dengan cara membagi jumlah eksplan yang respon terhadap pembentukan kalus dengan jumlah total eksplan yang diujikan dikali 100%, (2) total kalus/embrio, dihitung dari jumlah kalus/embrio yang tumbuh dari sejak inisiasi awal sampai sebelum terjadi regenerasi tunas, dan (3) jumlah tunas yang beregenerasi dihitung dari jumlah tunas yang terbentuk dari PLBs atau kalus.

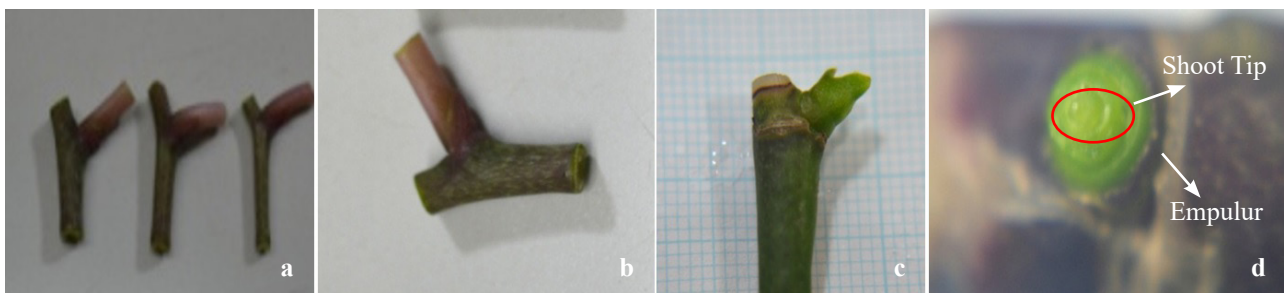
Regenerasi Tunas dan Pertumbuhan Planlet

Embrio yang berkecambah selanjutnya diakarkan pada media pengakaran dengan komposisi $\frac{1}{2}$ MS yang ditambahkan 0,25 mg/l BAP, 2 g/l arang aktif, 20 g/l sukrosa, dan 2 g/l gerlite dengan pH 5,8. Pengamatan dilakukan terhadap: (1) persentase regenerasi (%) yang diukur dengan menghitung jumlah tunas dibagi dengan total jumlah kalus/embrio dikalikan 100%, (2)

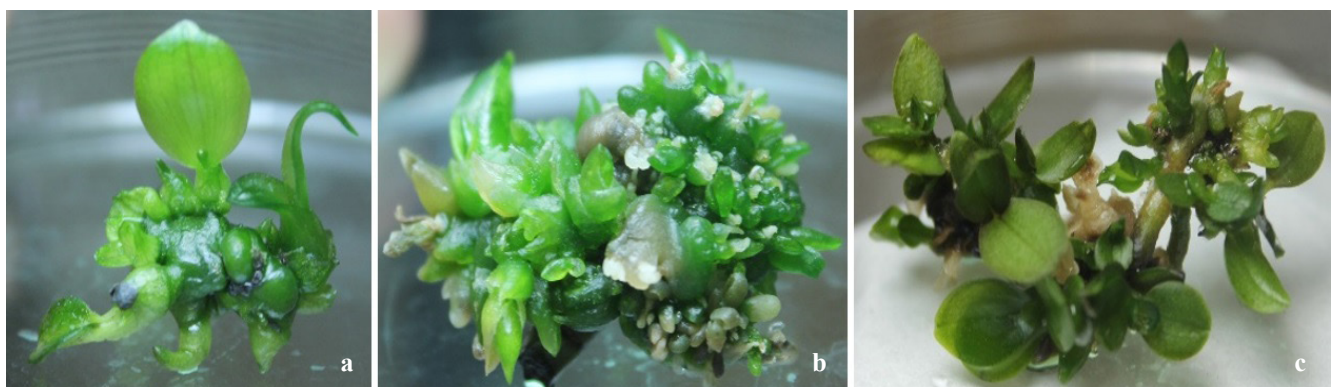
jumlah daun per planlet, diukur dengan menghitung jumlah daun yang membuka sempurna tiap planlet, (3) panjang-lebar daun (cm), diukur dengan menghitung panjang dan lebar daun yang membuka sempurna pada daun pertama tiap planlet, (4) jumlah akar per planlet, diukur dengan menghitung jumlah akar yang tumbuh sempurna tiap planlet, (5) panjang akar (cm), diukur dengan menghitung jumlah akar dari pangkal tumbuh akar sampai ujung, dan (6) total plantlet dan tanaman berkualitas (bentuk daun dan akar sempurna, tidak terjadi penyimpangan bentuk dan warna).

Abnormalitas Planlet dan Morfologi Stomata

Berbeda dengan pengamatan pertumbuhan planlet, pengamatan abnormalitas planlet dan pengamatan stomata dilakukan dengan mengambil tiga sampel per ulangan, hasil dari pengamatan dirata-rata dan dihitung standar erornya. Abnormalitas planlet (%), dihitung dengan mengamati jumlah planlet yang tidak tumbuh secara normal (bentuk, warna) dibandingkan dengan total jumlah planlet keseluruhan yang tumbuh dikalikan 100%. Kriteria planlet tidak tumbuh dengan normal atau abnormal adalah planlet mengalami vitrifikasi,



Gambar 2. Eksplan yang digunakan dalam percobaan. (a dan b) eksplan tangkai infloresen, (c) tunas yang tumbuh dari nodus tangkai bunga, dan (d) eksplan tunas pucuk dan empulur yang diisolasi dari tunas [Type of explants for the experiments. (a and b) inflorescence, (c) shoot from flower stalk node, and (d) shoot tip and tip explants from shoot]



Gambar 3. Kriteria pertumbuhan abnormal pada planlet *Phalaenopsis*. (a) planlet yang memiliki lapisan lilin yang rendah dan transparan, (b) tunas yang roset, dan (c) planlet yang sukulen [Abnormalities growth criteria in *Phalaenopsis* plantlets. (a) plantlets with reduced wax layer and transparent, (b) rosette buds, and (c) succulent plantlets]

tunas dan daun roset, planlet yang memiliki lapisan lilin yang rendah, planlet transparan, dan planlet yang sukulen (Gambar 3).

Pengamatan stomata dilakukan pada lapisan daun paling bawah yang disayat tipis dan direndam pada larutan iodine selama 10 detik kemudian dijadikan preparat. Pengamatan terhadap stomata dilakukan pada tiga bidang pandang per sampel dengan 10 stomata per bidang pandang dengan peubah: (1) kerapatan stomata dengan menghitung jumlah stomata per luas bidang pandang pada perbesaran 400x dan rumus luas bidang pandang adalah $3,14 \times (\text{jari-jari})^2 \times \text{faktor koreksi (fk)}$ dimana perbesaran 400x mempunyai $\text{fk} = 1/10$ dengan diameter = 0,2 mm dan (2) ukuran stomata (panjang-lebar stomata) diukur menggunakan micrometer okuler di bawah mikroskop dikali faktor koreksi.

Aklimatisasi Tanaman Hasil Perbanyakan

Planlet diaklimatisasi setelah 2–4 minggu dikultur pada media pengakaran. Sebelum planlet dikeluarkan dari botol, proses *hardening* dilakukan dengan meletakkan botol planlet pada suhu ruang tanpa penerangan selama sekitar 1 minggu. Saat aklimatisasi, tanaman yang telah bersih dari media agar direndam pada larutan campuran fungisida 1 g/l dan bakterisida 1 g/l selama 5 menit kemudian dikeringanginkan, lalu ditanam pada media pakis. Setiap perlakuan terdiri atas tiga pot diameter 10 cm masing-masing berisi 10–20 planlet. Pengamatan dilakukan terhadap keberhasilan aklimatisasi dengan menghitung persentase tanaman yang hidup pada minggu ke-2, ke-4, dan ke-8 sejak diaklimatisasi.

Analisis Data

Data hasil percobaan yang terkumpul dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) dengan program SAS Release Window 9,12. Jika terdapat pengaruh nyata antarperlakuan maka nilai rata-rata perlakuan diuji lanjut menggunakan uji Tukey pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inisiasi Kalus

Pengamatan inisiasi kalus berlangsung selama 24 minggu dan pembentukan kalus terjadi setelah eksplan dikultur 4–8 minggu. Hasil percobaan inisiasi menunjukkan interaksi antara varietas dan jenis eksplan tidak berbeda nyata pada taraf 5%. Pada faktor tunggal, perbedaan varietas memberikan hasil yang berbeda nyata pada peubah jumlah kalus yang terbentuk, jumlah PLBs, dan jumlah tunas yang terbentuk. Pada minggu ke-8 telah terjadi proses inisiasi kalus dan PLBs

namun belum terdapat inisiasi tunas. Persentase kalus terbentuk berkisar antara 20–50% dengan persentase tertinggi pada var. Ayu lestari dan Ayu Pratiwi masing-masing 42,83% dan 42,06%, var. Karindra hanya dapat menghasilkan inisiasi kalus sebesar 28,80%. Hasil yang berbeda ditunjukkan pada inisiasi PLBs, var. Karindra dan Ayu Pratiwi memiliki jumlah PLBs yang lebih banyak (masing-masing 6,60 PLBs per eksplan) dan var. Ayu Lestari hanya menghasilkan 4,94 PLBs per eksplan (Tabel 1 dan Gambar 4a–c).

Dua bulan setelah subkultur dengan media $\frac{1}{2}$ MS yang ditambahkan 0,75 mg/l TDZ dan 0,25 mg/l BAP, yaitu pada minggu ke-16, jumlah PLBs meningkat hingga dua kali dengan jumlah PLBs terbesar pada var. Karindra (12,55 PLBs per eksplan) sedangkan var. Ayu Lestari dan Ayu Pratiwi hanya menginisiasi 9,89 dan 9,72 PLBs per eksplan (Tabel 1 dan Gambar 4 d–f).

Pada minggu ke-16, PLBs disubkultur ke media perkecambahan dengan komposisi $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan 0,5 mg/l BAP. Pada minggu ke-24, jumlah PLBs yang terbentuk menurun seiring dengan dimulainya PLBs beregenerasi menjadi tunas. Jumlah inisiasi PLBs berkisar antara 1–8 PLBs per eksplan dengan jumlah PLBs pada var. Ayu Lestari dan Pratiwi sebanyak 7,70 dan 7,80 PLBs per eksplan. Pada var. Karindra jumlah inisiasi PLBs mengalami penurunan yang drastis dengan hanya menghasilkan 1,33 PLBs per eksplan. Hal tersebut diindikasikan eksplan mulai menginisiasi tunas di mana var. Karindra memiliki jumlah inisiasi tunas tertinggi dengan 16,49 tunas per eksplan dibandingkan dengan varietas lainnya (var. Ayu Lestari sebanyak 9,50 tunas per eksplan dan var. Ayu Pratiwi 6,57 tunas per eksplan) (Tabel 1 dan Gambar 4g–i).

Pada percobaan dengan jenis eksplan yang berbeda, satu tanaman induk dapat menghasilkan 6–7 eksplan dari masing-masing jenis eksplan, keberhasilan hidup pada 4 minggu pertama inisiasi sekitar 80–100%, namun belum terbentuk kalus. Pada minggu ke-8 persentase membentuk kalus mencapai 60%. Kalus yang terbentuk dari berbagai jenis eksplan pada minggu ke-8 bervariasi antara 34–60% dengan 2,5–15 PLBs per eksplan. Inisiasi kalus terbesar diperoleh pada eksplan tangkai infloresen dengan 53,93% dan inisiasi kalus terendah pada eksplan tunas pucuk dengan 34,76%. Berbeda dengan inisiasi kalus, inisiasi PLBs tertinggi diperoleh pada eksplan empulur dengan 12,67 PLBs per eksplan dan inisiasi PLBs pada eksplan tangkai infloresen dan tunas pucuk hanya berkisar 2,61 dan 3,00 PLBs per eksplan (Tabel 1 dan Gambar 4a–c).

Selanjutnya pada minggu ke-16, jumlah PLBs bertambah menjadi 3–26 PLBs per eksplan dengan inisiasi PLBs tertinggi diperoleh pada eksplan empulur

Tabel 1. Rata-rata jumlah PLBs dan tunas *Phalaenopsis* dari tiga varietas dan tiga eksplan yang berbeda (The PLBs and shoots average from three different varieties and explants of *Phalaenopsis*)

Varietas <i>Phalaenopsis</i> (<i>Phalaenopsis</i> varietas)/Eksplan (<i>Explant</i>)	Minggu ke-8 (Week 8 th)			Minggu ke-16 (Week 16 th)		Minggu ke-24 (Week 24 th)		
	Kalus terbentuk (<i>Callus formed</i>), %			Jumlah respon (<i>Respons number</i>)				
	<i>Callus initiation</i> , %	PLBs (PLBs)	Tunas (Shoots)	PLBs (PLBs)	Tunas (Shoots)	PLBs (PLBs)	Tunas (Shoots)	
Ayu Lestari	42,83 a	4,94 a	-	9,89 a	-	7,70 a	9,50 b	
Ayu Pratiwi	42,06 a	6,60 a	-	9,72 a	-	7,80 a	6,57 b	
Karindra	28,58 b	6,60 a	-	12,55 a	-	1,33 b	16,49 a	
Tangkai floresens (<i>Inflorescent</i>)	53,93 a	2,61 b	-	4,06 b	-	10,70 a	6,78 b	
Tunas Pucuk (<i>Shoot tip</i>)	34,76 b	3,00 b	-	4,60 b	-	0,67 c	5,10 b	
Empulur (Pith)	42,85 ab	12,67 a	-	23,50 a	-	5,61 b	20,67 a	
KK (CV), %	16,01	14,07	-	18,67	-	18,67	16,97	

Keterangan (*Remarks*): Angka rata-rata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Tukey 5% (*Mean followed by the same letter in the same column are not significant different based on Tukey test p=0,05*), KK: koefisien keragaman (*CV: coefficient of variation*)

sebanyak 23,50 PLBs per eksplan dan inisiasi PLBs pada eksplan tangkai infloresen dan tunas pucuk masing-masing sebanyak 4,06 PLBs dan 4,60 PLBs per eksplan (Tabel 1 dan Gambar 4d-f).

Inisiasi PLBs menurun pada biakan asal eksplan empulur dan eksplan tunas di minggu ke-24 (masing-masing 10,70 dan 0,67 PLBs per eksplan) seiring dengan terjadinya regenerasi tunas. Jumlah tunas yang tumbuh berkisar antara 3–29 tunas per biakan dengan regenerasi tunas tertinggi pada biakan yang berasal dari eksplan empulur (20,67 tunas per biakan). Jumlah tunas pada biakan asal eksplan tangkai infloresen dan asal eksplan tunas pucuk tidak berbeda nyata dengan jumlah masing-masing 6,78 dan 5,10 tunas per eksplan (Tabel 1 dan Gambar 4g-i).

Persentase keberhasilan eksplan tangkai infloresen membentuk kalus lebih besar, yaitu sekitar 53,94% dibandingkan dengan eksplan tunas pucuk dan empulur (34,76–42,85%), namun seiring dengan pertumbuhannya kalus yang terbentuk banyak yang mengalami pencokelatan akibat aktifitas senyawa fenol dan hanya 65% yang beregenerasi membentuk tunas. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Vendrame & Maguire (2007), kuncup lateral yang belum matang, kuncup bunga, nodus pada tangkai bunga dan potongan pedisel mengalami kegagalan pada kultur *in vitro* setelah 15 hari karena nekrosis dan jaringan mati atau lebih dari 40% terjadi kontaminasi. Tunas pucuk 88,89% dan empulur 100% mengalami regenerasi tunas, karena tunas pucuk dan empulur merupakan kumpulan sel-sel somatik yang bersifat meristematik. Meristem merupakan jaringan muda yang sel-selnya aktif melakukan pembelahan secara mitosis dan

mengalami regenerasi (Pierik 1987). Menurut Guo *et al.* (2004) isolasi tunas pucuk dari tunas aksilar *Phalaenopsis* menginduksi 100% PLB, 90% inisiasi tunas, 100% planlet berakar, dan 90% tanaman hidup saat diaklimatisasi.

Regenerasi Tunas dan Pertumbuhan Planlet

Tunas yang terbentuk disubkultur tunggal pada media ½ MS yang ditambahkan 0,25 mg/l BAP dan 2 g/l arang aktif. Hasil analisis varian pada berbagai parameter pertumbuhan *Phalaenopsis* menunjukkan tidak terjadi interaksi antara varietas yang diuji dengan jenis eksplan yang digunakan. Pada pertumbuhan tanaman minggu ke-32, var. Ayu Lestari memiliki persentase regenerasi yang tidak berbeda nyata dengan var. lainnya dan memiliki tingkat multiplikasi yang rendah, yaitu 1,32 kali dengan pertumbuhan jumlah daun per planlet yang lebih sedikit dibanding var. lain, yaitu 2,80 daun per planlet dengan panjang 1,59 cm dan lebar 1,00 cm. Planlet yang berasal dari var. tersebut memiliki jumlah akar dan panjang akar yang tidak berbeda nyata dengan planlet dari var. Karindra (Ayu Lestari: 1,33 akar per planlet dengan panjang 1,12 cm, Karindra: jumlah akar 1,28 akar per planlet dengan panjang 1,28 cm). Varietas Karindra memiliki tingkat multiplikasi tertinggi (1,91 kali) dengan jumlah daun 2,9 daun per planlet, dengan ukuran 2,56 x 1,37 cm (panjang x lebar). Varietas Ayu Pratiwi memiliki pertumbuhan dominan pada peubah jumlah daun tertinggi dengan 3,2 daun per planlet (Tabel 2).

Jenis eksplan tunas pucuk menghasilkan persentase tunas berakar yang lebih banyak sekitar 48,11% diikuti dengan yang berasal dari eksplan empulur, yaitu 31,44%, sedangkan tunas yang berasal dari eksplan

Tabel 2. Kualitas pertumbuhan planlet *Phalaenopsis* dari perlakuan tiga varietas dan tiga jenis eksplan pada minggu ke-32 setelah kultur (*Growth quality of Phalaenopsis plantlet 32 weeks after culture from three difference Phalaenopsis varieties*)

Varietas <i>Phalaenopsis</i> (<i>Phalaenopsis varietie</i>)	PR (%)	MT	JDP	PDP (cm)	LDP (cm)	JAP	PAP (cm)
Ayu Lestari	66,67 a	1,32 b	2,80 b	1,59 b	1,00 b	1,33 a	1,12 a
Ayu Pratiwi	87,22 a	1,26 b	3,20 a	1,55 b	0,85 b	1,03 b	0,89 b
Karindra	100,00 a	1,91 a	2,90 ab	2,56 a	1,37 a	1,28 a	1,28 a
Tangkai floresens (<i>Inflorescent</i>)	65,00 a	0,96 b	2,83 a	1,41 c	0,85 b	0,87 c	0,94 b
Tunas Pucuk (<i>Shoot tip</i>)	88,89 a	1,66 a	2,94 a	1,82 b	1,00 b	1,26 b	1,10 ab
Empulur (<i>Pith</i>)	100,00 a	1,87 a	3,13 a	2,47 a	1,36 a	1,52 a	1,26 a
KK (CV), %	2,63	10,87	8,4	10,13	16,29	15,27	13,14

Keterangan (*Remarks*): PR=Persentase regenerasi, MT= multiplikasi tunas, JDP= jumlah daun per planlet, PDP= panjang daun, LDP= lebar daun per planlet, JAP= jumlah akar per planlet, PAP= panjang akar per planlet, KK=koefisien korelasi. (*PR= regeneration percentage, MT= shoot multiplication, JDP= number of leaves per plantlet, PDP= length of leaves, LDP= wide of leaves, JAP= number of roots per plantlet, PAP= length of root, CV= coefficient varians*)

tangkai infloresen hanya mempunyai kemampuan berakar 1,67%. Jumlah akar dan panjang akar tertinggi diperoleh pada tunas asal eksplan empulur, demikian pula dengan jumlah daun (3,13 per planlet), ukuran daun (panjang 2,47 cm dan lebar 1,36 cm) terbesar diperoleh pada planlet asal eksplan empulur (Tabel 2).

Morfologi Stomata dan Abnormalitas Planlet

Pada pengamatan stomata, kerapatan stomata tertinggi diperoleh pada var. Karindra (1.910,00 stomata/mm²), namun pada varietas tersebut panjang (1,66 µm) dan lebar stomata (1,19 µm) lebih kecil jika dibandingkan dengan varietas lainnya (var. Ayu Lestari 1,74 µm panjang stomata dan lebar 1,63 µm, var. Ayu Pratiwi 1,65 µm panjang dan 1,48 µm lebar). Pada pengamatan abnormalitas, var. Karindra memiliki persentase abnormalitas terendah dengan 8,92% dibandingkan dengan tingkat abnormalitas pada var. lainnya, yaitu var. Ayu Lestari 24,02% dan var. Ayu Pratiwi sebanyak 14,32% (Tabel 3).

Rata-rata panjang stomata dari hasil regenerasi tunas asal eksplan tunas pucuk, tangkai infloresen dan empulur berkisar antara 1,62–1,69 µm dan lebar 1,41–1,46 µm, namun eksplan empulur mempunyai kerapatan yang lebih tinggi, yaitu sekitar 1.719,75 mm². Biakan yang berasal dari eksplan tunas pucuk menghasilkan 100% planlet normal dan setiap periode subkulturnya jarang mengalami kontaminasi (kurang dari 1%). Biakan asal eksplan empulur menghasilkan persentase planlet abnormal sekitar 8,64%, sedangkan biakan asal eksplan tangkai floresen menghasilkan planlet abnormal yang relatif tinggi sekitar 38,68 % (Tabel 3).

Regeneran hasil isolasi tunas pucuk dan empulur memiliki kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan dari regeneran yang berasal dari eksplan tangkai

infloresen. Regeneran hasil isolasi empulur memiliki persentase abnormalitas yang cukup rendah, yaitu 8,64%, sedangkan regeneran hasil isolasi tunas pucuk tidak mengalami abnormalitas (Tabel 3). Ukuran tunas pucuk sebesar 2 mm pada ujungnya mengandung jaringan yang bersifat meristematik dengan ukuran diameter 0,1 mm panjang 0,2–0,4 mm (Pierik 1987) sehingga hasil isolasi tunas pucuk mengandung sel-sel meristem yang stabil karena mitosis pada sel-sel meristem terjadi bersama pembelahan sel yang berkesinambungan sehingga ekstra duplikasi dapat dihindarkan (Gunawan 1983). Pada penelitian Tokuhara & Mii (2001) variasi somaklonal pada perbanyak *Phalaenopsis* menggunakan eksplan tunas pucuk yang diisolasi dari tangkai bunga yang mengandung mata tunas kurang dari 10%. Diduga eksplan empulur yang diisolasi dari daerah sekitar tunas pucuk masih mengandung jaringan meristem sehingga pada minggu ke-32 eksplan empulur mampu menghasilkan regeneran yang lebih berkualitas dari segi jumlah daun, panjang daun, lebar daun, jumlah akar per planlet dan panjang akar per planlet, serta kerapatan stomata dibandingkan dengan eksplan tunas pucuk dan tangkai infloresen. Teknologi menggunakan eksplan tangkai infloresen menghasilkan planlet dengan abnormalitas yang tinggi (38,67%), hal tersebut sudah diindikasikan dari awal proliferasi kalus bahwa pembentukan kalus tidak sempurna dan rendahnya kemampuan regenerasi tunas. Hasil penelitian tersebut dikuatkan oleh hasil penelitian Yongwei *et al.* (1993) yang melaporkan bahwa induksi sekumpulan tunas langsung *Phalaenopsis* tanpa melalui pembentukan kalus menghasilkan regeneran dengan variabilitas yang rendah.

Kerapatan stomata berkorelasi negatif dengan ukuran stomata (Doheny-Adams *et al.* 2012).

Tabel 3. Kerapatan dan ukuran stomata daun dari planlet tiga varietas *Phalaenopsis* yang berasal dari eksplan yang berbeda pada 32 minggu setelah kultur (*The density and size of plantle's leaf stomatae of three Phalaenopsis varieties originating from different explants at 32 weeks after culture*)

Varietas <i>Phalaenopsis</i> (<i>Phalaenopsis varieties</i>)	Kerapatan stomata per mm ² (<i>Stomata density per</i> mm ²)	Ukuran rata-rata (<i>Average size</i>)		Abnormalitas (<i>Abnormalities</i>), %
		Panjang stomata (<i>Length of stomata</i>)	Lebar stomata (<i>Width of stomatae</i>)	
		µm	µm	
Ayu Lestari	1401,27 b	1,74 a	1,63 a	24,02 a
Ayu Pratiwi	1380,00 b	1,65 b	1,48 b	14,32 a
Karindra	1910,00 a	1,66 ab	1,19 c	8,92 a
Tangkai infloresen (<i>Inflorescent</i>)	1443,74 b	1,62 a	1,46 a	38,68 a
Tunas pucuk (<i>Shoot tip</i>)	1528,66 b	1,69 a	1,41 a	0,00 b
Empulur (<i>Pith</i>)	1719,75 a	1,62 a	1,41 a	8,64 b
KK (<i>CV</i>), %	10,56	10,31	8,64	15,36

Keterangan (*Remarks*): Lihat Tabel 1 (*See Tabel 1*)

Pernyataan tersebut didukung oleh hasil percobaan ini, di mana kerapatan stomata berkorelasi negatif dengan tingkat abnormalitas planlet (nilai korelasi pada faktor varietas -0,73 dan nilai korelasi pada faktor eksplan -0,57) sedangkan ukuran stomata terutama lebar stomata berkorelasi positif dengan tingkat abnormalitas (nilai korelasi pada faktor varietas dan eksplan adalah 0,95). Semakin tinggi kerapatan stomata dan semakin sempit ukuran stomata maka tingkat abnormalitas planlet semakin rendah (Tabel 4). Secara fisiologi kerapatan stomata berkorelasi dengan konduktivitas stomata, tingkat asimilasi net CO₂ dan *water use efficiency* (*WUE*) (Xu & Zhou 2008). Planlet abnormal yang mengalami vitrifikasi tidak dapat menutup dengan adanya perlakuan penggelapan ABA atau Ca. Hal tersebut terjadi karena adanya modifikasi elastis sel penjaga stomata (Ziv, Schwartz & Fleminger 1987). Planlet abnormal pada kondisi *in vitro* dapat bersifat genetik dan fenotipe yang akan diwariskan pada regenerasi hasil melalui perbanyakan klonal, namun abnormalitas dapat pula bersifat epigenetik dengan planlet abnormal dapat berubah pada tahap *in vitro* berikutnya melalui perubahan anatomi, fisiologi, dan metabolisme (Isah 2015). Adanya variasi pada regenerasi hasil kultur *in vitro* dikenal dengan variasi somaklonal yang dapat disebabkan oleh faktor internal seperti genotipe, kondisi fisiologis pohon induk, asal eksplan, dan adanya *chimera* pada jaringan, sedangkan faktor eksternal antara lain frekuensi subkultur, media, dan konsentrasi ZPT (Etienne & Bertrand 2003). Variasi somaklonal pada kultur *in vitro Phalaenopsis* telah banyak dilaporkan (Khoddamzadeh *et al.* 2010; Chen *et al.* 1998; Tokuhara & Mii 1993).

Aklimatisasi Planlet

Hasil aklimatisasi menunjukkan bahwa persentase hidup semua varietas bertahan 100% sampai minggu

ke-2 dan ke-4 setelah aklimatisasi, namun persentase hidup menurun pada minggu ke-8 dengan kisaran 30–82%. Persentase tanaman hidup tertinggi adalah var. Karindra dengan rata-rata 70% dan persentase hidup terendah pada var. Ayu Lestari yang memiliki keberhasilan aklimatisasi hanya 38% (Gambar 6a).

Percobaan menggunakan jenis eksplan berbeda memiliki kecenderungan yang sama dengan hasil aklimatisasi pada percobaan dengan varietas yang berbeda pada minggu ke-2 dan ke-4 persentase tanaman hidup mencapai 100%. Untuk minggu ke-8, persentase hidup berkisar antara 62–96%. Persentase tanaman hidup tertinggi diperoleh tanaman yang berasal dari eksplan empulur yaitu 92%, sedangkan tanaman dari eksplan tangkai infloresen dapat hidup sebanyak 67% dan tanaman yang berasal dari tunas pucuk berhasil hidup sebanyak 90% (Gambar 6b).

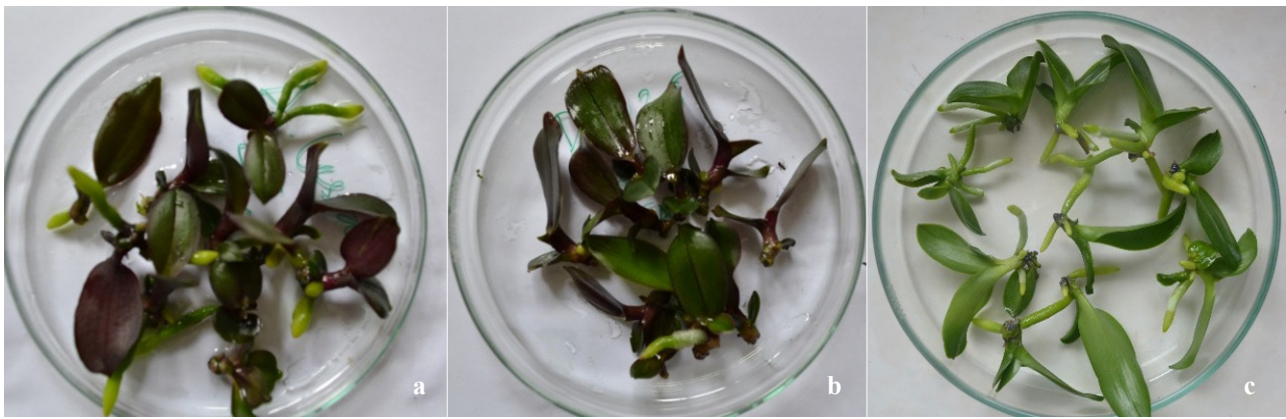
Rendahnya keberhasilan aklimatisasi setelah 8 minggu pada jenis varietas dan jenis eksplan yang berbeda disebabkan oleh kondisi lingkungan rumah kaca yang tidak mendukung, seperti kelembaban ruang yang rendah dan suhu yang tinggi dengan kondisi yang terlalu terang. *Phalaenopsis* merupakan anggrek tropis yang memiliki proses metabolisme CAM (Sayed 2001) dan keberhasilan hidup *Phalaenopsis* sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan terutama suhu dengan kebutuhan 28–35°C saat siang dan 20–24°C saat malam hari dengan kondisi penyiangan yang terbatas karena tertutupi kanopi hutan (Pridgeon 2000). Dengan demikian, *Phalaenopsis* membutuhkan waktu panjang dari tahap sejak tanaman berbunga kemudian diambil tangkai bunganya untuk kultur klonal hingga berbunga. Menurut Runkle *et al.* (2007) dari tahap awal tersebut, tahap subkultur dan menjadi tanaman siap aklimatisasi membutuhkan waktu 1–2 tahun. Dari tanaman muda hingga dapat dinikmati tangkai bunganya kembali membutuhkan waktu sekitar 13–20 bulan.

Tabel 4. Korelasi antara kerapatan dan ukuran stomata daun dengan tingkat abnormalitas planlet dari tiga varietas *Phalaenopsis* yang berasal dari eksplan yang berbeda (*The correlation between the density and the size of the leaf stomata with the plantlet abnormality rates of the three Phalaenopsis varieties originating from different explants*)

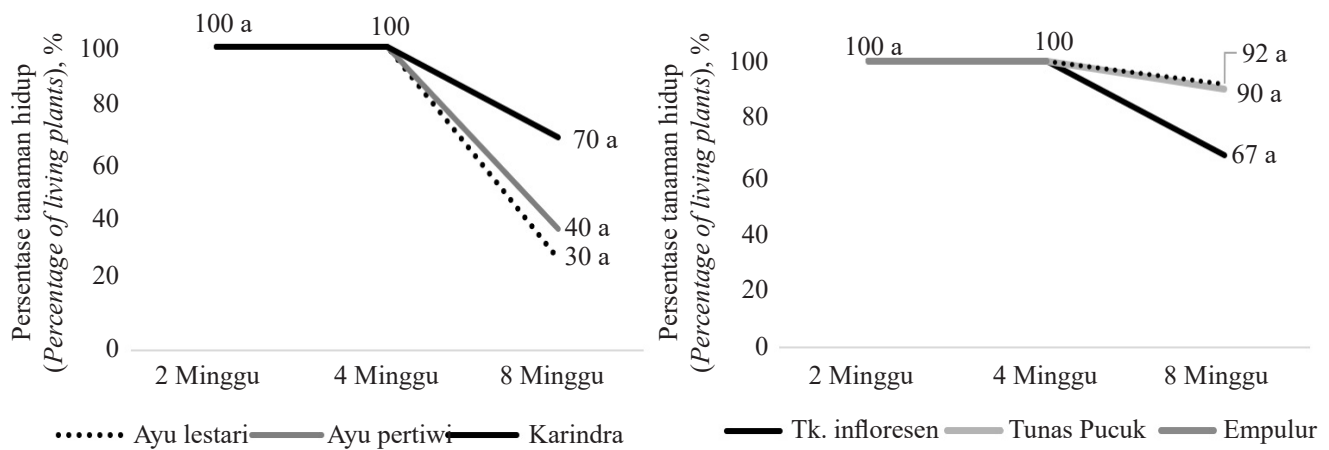
Variabel (Variables)	Mean	Standard deviation	Korelasi (Correlations)			
			1	2	3	4
Kerapatan stomata per mm ² (<i>Stomata density per mm²</i>)	1.568,8	300,00	1,00			
Panjang stomata (<i>Length of stomata</i>), μm	1,67	0,07	-0,49	1,00		
Lebar stomata (<i>Width of stomata</i>), μm	1,42	0,22	-0,90	0,06	1,00	
Abnormalitas (<i>Abnormalities</i>), %	15,77	8,37	-0,73	-0,24	0,95	1,00



Gambar 4. Pertumbuhan kalus membentuk planlet dari minggu ke-8 hingga minggu ke-32 dari tiga varietas *Phalaenopsis* yang berasal dari tiga jenis eksplan yang berbeda. Inisiasi kalus pada minggu ke-8 dari eksplan yang berasal dari (a) tangkai infloresen var. Ayu Lestari, (b) tunas pucuk var. Ayu Pratiwi, (c) empulur var. Karindra. Perkembangan kalus pada minggu ke-12 dari eksplan (d) tangkai infloresen var. Ayu Lestari, (e) tunas pucuk var. Ayu Pratiwi, (f) empulur var. Karindra. Regenerasi tunas pada minggu ke-24 yang berasal dari (g) tangkai infloresen var. Ayu Lestari, (h) tunas pucuk var. Ayu Pratiwi, (i) empulur var. Karindra. Planlet berakar pada minggu ke-32 yang berasal dari eksplan: (a) tangkai infloresen var. Ayu Lestari, (k) tunas pucuk var. Ayu Pratiwi dan (l) empulur var. Karindra. (*The growth of callus to plantlet of 3 different varieties of Phalaenopsis originated from three different type of explants from week 8th to week 32nd. Callus initiation on week 8th originated from explants: (a) inflorescent of var. Ayu Lestari, (b) shoot tip of var. Ayu Pratiwi, and (c) pith of var. Karindra. The development of callus on week 12nd from explant (d) inflorescent of var. Ayu Lestari, (e) shoot tip of var. Ayu Pratiwi, and (f) pith var. Karindra. Shoot regeneration on week 24 from explant (g) inflorescent of var. Ayu Lestari, (h) shoot tip of var. Ayu Pratiwi, and (i) pith of var. Karindra. Rooted plantlets from explant (j) inflorescent of var. Ayu Lestari, (k) shoot tip of var. Ayu Pratiwi, and (l) pith of var. Karindra*)



Gambar 5. Planlet dari sumber eksplan yang berbeda siap diaklimatisasi: (a) asal tangkai infloresen var. Ayu Lestari, (b) asal tunas pucuk var. Ayu Pratiwi, dan (c) asal empulur var. Karindra (Plantlets from different explant sources were ready to be acclimatized: (a) from inflorescent of var. Ayu Lestari, (b) from shoot tip of var. Ayu Lestari, and (c) from pith of var. Karindra)



Gambar 6. Keberhasilan planlet yang diaklimatisasi pada minggu ke-2, ke-4, dan ke-8. (a) Tiga varietas *Phalaenopsis* yang berbeda dan (b) Asal tiga jenis eksplan yang berbeda [The successful of planlets acclimatization. (a) three different *Phalaenopsis* varieties and (b) originated from three different types of explants]

KESIMPULAN DAN SARAN

Perbedaan varietas *Phalaenopsis* dan jenis eksplan pada inisiasi PLBs hingga aklimatisasi planlet menghasilkan respon pertumbuhan kultur yang berbeda. Tidak diperoleh interaksi antara faktor varietas dengan jenis eksplan pada semua tahap percobaan. Persentase pembentukan kalus tertinggi diperoleh dari var. Ayu lestari, Ayu Pratiwi, dan eksplan tangkai infloresen. Jumlah PLBs tertinggi diperoleh pada minggu ke-16 pada var. Karindra dan asal eksplan empulur. PLBs berkecambah terjadi pada minggu ke-24 dengan jumlah tunas tertinggi pada var. Karindra dan asal eksplan empulur.

Tingkat multiplikasi tunas tertinggi pada biakan var. Karindra dan asal eksplan empulur/tunas pucuk, sedang pertumbuhan daun terbaik pada biakan var.

Karindra dan asal eksplan empulur, pertumbuhan akar terbaik pada planlet var. Karindra dan Ayu Lestari, serta pada planlet asal eksplan empulur.

Kerapatan stomata berbanding terbalik dengan abnormalitas tanaman, sedangkan ukuran stomata berbanding positif dengan tingkat abnormalitas pada planlet *Phalaenopsis*. Kerapatan stomata tertinggi diperoleh pada var. Karindra dan eksplan tunas pucuk dengan tingkat abnormalitas rendah.

Hasil aklimatisasi menunjukkan bahwa 100% tanaman dapat bertahan baik hingga minggu ke-4 dan menurun pada minggu ke-8 dengan persentase tanaman hidup tertinggi pada var. Karindra dan eksplan empulur.

Untuk mengkonfirmasi hasil penelitian ini, pengamatan abnormalitas dengan menggunakan analisis molekuler sangat disarankan untuk mengetahui perubahan genetik yang terjadi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Antensari, F, Mariani, S & Wicaksono, A 2014, 'Micropropagation of *Phalaenopsis* "R11xR10" through somatic embryogenesis method', *Asian Journal of Applied Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 145–150.
2. Bairu, M., Stirk, W, Doležal, K & van Staden, J 2008, 'The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars "Williams" and "Grand Naine" (*Musa* spp. AAA)', *Plant cell, tissue and organ culture*, vol. 95, no. 3, pp. 373–379.
3. Balilashaki, K, Naderi, R, Kalantari, S & Soorni, A 2014, 'Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* cv Cool "Breeze" with using of flower stalk nodes and leaves of sterile obtained from node culture', *Intl J Farm & Alli Sci*, vol. 3, no. 7, pp. 823–829.
4. Boxus, P, Jemmali, A, Terzi, J & Arezki, O 1999, 'Drift in genetic stability in micropropagation: The case of strawberry', *International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation*, no. 530, pp. 155–162.
5. Chen, JT & Chang, W 2006, 'Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*', *Biol. Plant*, vol. 50, pp. 169–173.
6. Chen, WH, Chen, TM, Fu, YM, Hsieh, RM & Chen, W 1998, 'Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*', *Plant Cell Reports*, vol. 18, no. 1, pp. 7–13.
7. Chen, YC, Chang, C & Chang, W 2000, 'A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*', *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 36, no. 5, pp. 420–423.
8. Chiruvella, K, Mohammed, A & Ghanta, R 2014, 'Phenotypic aberrations during micropropagation of *Soymida febrifuga* (Roxb.) ADr. Juss', *Notulae Scientia Biologicae*, vol. 6, no. 1, pp. 99–104.
9. Doheny-Adams, T, Hunt, L, Franks, P, Beerling, D & Gray, J 2012, 'Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, vol. 367, no. 1588, pp. 547–555.
10. Ernst, R 1994, 'Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae)', *Plant cell, tissue and organ culture*, vol. 39, no. 3, pp. 273–275.
11. Etienne, H & Bertrand, B 2003, 'Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants', *Tree Physiol*, vol. 23, no. 6, pp. 419–426.
12. Gnasekaran, P, Poobathy, R, Mahmood, M, Samian, MR & Subramaniam, S 2012, 'Effects of complex organic additives on improving the growth of PLBs of Vanda Kasem's Delight', *Australian Journal of Crop Science*, vol. 6, no. 8, p. 1245.
13. Gow, W, Chen, J & Chang, W 2008, 'Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids', *Acta Physiol Plant*, vol. 30, pp. 507–51.
14. Gunawan, L 1983, *Teknik kultur jaringan tumbuhan*, Institut Pertanian Bogor, pp. 304.
15. Guo, Z, Lian, DI, E, IY, Fang, L, Cun, BY & Qiang, D 2004, 'The regeneration technology system of axillary bud from *Phalaenopsis wisonii* flower stem with tissue culture', *J. Shandong Agriculture Sciences*, vol. 6, pp. 4–7.
16. Hazarika, B 2006, 'Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants', *Scientia Horticulturae*, vol. 108, no. 2, pp. 105–120.
17. Hvoslef-Eide, A & Preil, W 2005, *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, Springer Publisher, pp. 581.
18. Ichihashi, S 1992, 'Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks', *Lindleyana*, vol. 7, pp. 208–215.
19. International Trade Centre 2014, *Market insider: Floriculture product indicative price information/European Markets*, diunduh 28 Januari 2016, <http://www.intracen.org/uploadfiles/intracen.org/content/exporters/market_data_and_information/market_insider/floriculture/floriculture_weekly_14_16.pdf>, pp. 5.
20. Isah, T 2015, 'Adjustments to in vitro culture conditions and associated anomalies in plants', *Acta Biologica Cracoviensia Botanica*, vol. 57, no. 2, pp. 9–28.
21. Khoddamzadeh, A, Sinniah, U, Kadir, M, Kadzimin, S, Mahmood, M & Sreeramanan, S 2010, 'Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson', *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 40, pp. 6632–6639.
22. Kuo, HL, Chen, JT & Chang, W 2005, 'Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* "Little Steve"', *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, vol. 41, pp. 453–456.
23. Liu, THA, Lin, JJ & Wu, R 2006, 'The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like-bodies', *Plant cell, tissue and organ culture*, vol. 8, no. 1, pp. 125–129.
24. Mondal, T, Aditya, S & Banarjee, N 2013, 'In vitro axillary shoot regeneration and direct protocorm-like body induction from axenic shoot tips of *Doritis pulcherrima* Lindl.', *Plant Tissue Cult. & Biotech*, vol. 23, no. 2, pp. 251–261.
25. Murashige, T & Skoog, F 1962, 'A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures', *Physiologia plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497.
26. Murdad, R, Hwa, K, Seng, C, Latip, M, Aziz, Z & Ripin, R 2006, 'High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique', *Science Horticulture*, vol. 111, pp. 73–79.
27. Murdad, R, Latip, M, Aziz, Z & Ripin, R 2010, 'Effects of carbon source and potato homogenate on in vitro growth and development of Sabah's endangered orchid *Phalaenopsis gigantea*', *Asia-Pac J Mol Biol*, vol. 18, no. 1, pp. 199–202.
28. Niknejad, A, Kadir, M & Kadzimin, S 2011, 'In vitro plant regeneration from protocorm like bodies (PLB) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (Epidendroideae: Orchidaceae)', *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 56, pp. 11808–11816.
29. Olmos, E & Hellin, E 1998, 'Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants', *Scientia Horticulturae*, vol. 75, no. 1, pp. 91–101.
30. Park, S, Murthy, H & Paek, K 2002, 'Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves', *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, vol. 38, pp. 168–172.
31. Pierik, R 1987, *In vitro culture of higher plant*, Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, pp. 344.
32. Prasertsongskun, S & Chaipakdee, W 2011, 'Effect chitosan on growth and development of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb. f.', *Khon Kaen University (KKU) Science Journal*, vol. 39, pp. 113–119.

33. Pridgeon, A 2000, *The illustrated encyclopaedia of orchids*, Portland, Ore, USA, Timber Press.
34. Rittirat, S, Klaocheed, S & Thammasiri, K 2014, 'Enhanced efficiency for propagation of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb. F. using trimmed leaf technique', *International Journal of Biological, Food, Veterinary and Agricultural Engineering*, vol. 8, no. 4, pp. 328–331.
35. Runkle, E, Wang, YT, Blanchard, M & Lopez, R 2007, *Growing the Best Phalaenopsis*, Orchids, vol. 76, no. 1, pp. 24–28.
36. Samarfard, S, Kadir, M, Kadzimin, S, Ravanfar, S & Halimi, M 2013, 'Genetic stability of in vitro multiplied *Phalaenopsis gigantea* protocorm-like bodies as affected by chitosan', *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, vol. 41, no. 1, pp. 177–183.
37. Sayed, O 2001, 'Crassulacean Acid Metabolism 1975–2000 a check list', *Photosynthetica*, vol. 39, no. 3, pp. 339–352.
38. Schnable, P, Ware, D, Fulton, R, Stein, J, Wei, F, Pasternak, S & Minx, P 2009, 'The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics', *Science*, vol. 326, no. 5956, pp. 1112–1115.
39. Sinha, P & Jahan, M 2011, 'Clonal Propagation of *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL. cv. 'Golden Horizon' through in vitro culture of leaf segments', *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, vol. 46, no. 2, pp. 163–168.
40. Tokuhara, K & Mii, M 1993, 'Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds', *Plant Cell Reports*, vol. 13, no. 1, pp. 7–11.
41. Tokuhara, K & Mii, M 2001, 'Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae)', *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 37, no. 4, pp. 457–461.
42. Tokuhara, K & Mii, M 2003, 'Highly efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Dendrobium* orchids by adjusting carbohydrate sources', *In vitro. Cell. Dev. Biol., Plant*, vol. 39, pp. 635–639.
43. Us-Camas, R, Rivera-Solis, G, Duarte-Aké, F & De-la-Pena, C 2014, 'In vitro culture: an epigenetic challenge for plants', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 118, no. 2, pp. 187–201.
44. Vacin, E & Went, F 1949, 'Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds', *Botanical gazette*, vol. 111, no. 2, pp. 175–183.
45. Vendrame, WA, Maguire, I & Carvalho, VS 2007, 'In vitro propagation and plantlet regeneration from *Doritaenopsis* purple gem "Ching Hua" flower explants', *HortScience*, vol. 42, no. 5, pp. 1256–1258.
46. Winarto, B 2014, 'Teknologi perbanyakan *phalaenopsis* secara in vitro melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-1', *Seri perbanyakan tanaman hias secara in vitro*, pp. 148.
47. Xu, Z & Zhou, G 2008, 'Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass', *Journal of experimental botany*, vol. 59, no. 12, pp. 3317–3325.
48. Yongwei, L, Qingchao, M, Yanfang, C & Xiazoyan, M 1993, 'Cluster shoot: a new way for rapid vegetatif propagation of *Phalaenopsis*', *Chinese Journal of Tropical Crops*, vol. 2.
49. Ziv, M, Schwartz, A & Fleminger, D 1987, 'Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro; implications for hardening', *Plant Science*, vol. 52, no. 1–2, pp. 127–134.