

Pengaruh Medium Dasar dan Amonium Nitrat terhadap Pembentukan, Regenerasi Kalus, dan Penggandaan Tunas Hasil Kultur Anther *Anthurium* (Effect of Basic Medium and Ammonium Nitrate on Formation and Regeneration of Calli and Shoot Multiplication Derived from Anther Culture of *Anthurium*)

Winarto, B

Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang-Pacet, Cianjur 43253

E-mail: budi_winarto67@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 26 Januari 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 8 Januari 2013

ABSTRAK. Medium dasar dan amonium nitrat merupakan dua komponen penting yang berpengaruh besar terhadap keberhasilan kultur anther tanaman. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat terhadap pembentukan, pertumbuhan, dan regenerasi kalus. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung sejak Bulan Januari hingga Oktober 2008. Spadik *Anthurium andraeanum* Linden ex André kultivar Tropical dan kalus hasil regenerasinya digunakan dalam penelitian ini. Medium dasar yang digunakan dalam percobaan ini ialah: (1) ½ WT, (2) ½ NWT, dan (3) NWT, sedangkan konsentrasi amonium nitrat yang diaplikasikan ialah (1) 750 mg/l, (2) 550 mg/l, (3) 413 mg/l, (4) 206 mg/l, dan (5) 103 mg/l. Media penggandaan tunas (MP) pada percobaan ini ialah (1) 0,5 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (sebagai kontrol, MP-1), (2) 1,0 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-2), (3) 1,5 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-3), (4) 1,0 mg/l TDZ, 1,5 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-4), (5) 0,5 mg/l TDZ, 2,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-5), (6) 1,0 mg/l BAP dan 0,01 mg/l NAA (MP-6), (7) 0,5 mg/l BAP (MP-7), dan (8) tanpa hormon (MP-8). Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAK) dan RAK pola faktorial dengan empat ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi amonium nitrat memiliki pengaruh yang signifikan terhadap induksi pembentukan kalus. Konsentrasi 750 mg/l pada ½ WT merupakan kombinasi terbaik dengan potensi tumbuh anther mencapai 54% dengan 38% regenerasi anther dan 2,3 kalus per perlakuan. Medium ½ WT dan 205 mg/l amonium nitrat merupakan kombinasi perlakuan terbaik untuk pertumbuhan kalus dan pembentukan tunas. Kombinasi ini mampu menstimulasi pertumbuhan kalus hingga 205 mm³ dengan jumlah tunas terbanyak mencapai 5,2 tunas per eksplan. Medium MP-3 (½ WT yang ditambah 1,5 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA) merupakan kombinasi hormon yang sesuai untuk penggandaan tunas hasil kultur anther *Anthurium*. Medium ½ WT yang ditambah dengan 0,02 mg/l NAA dapat digunakan untuk pengakaran tunas hingga membentuk planlet yang siap untuk aklimatisasi.

Katakunci: Amonium nitrat; *Anthurium*; Kalus; Kultur anther; Medium dasar; Regenerasi; Penggandaan tunas

ABSTRACT. Basic medium and ammonium nitrate are two important components giving high effect on plant anther culture. The study was conducted at Tissue Culture Laboratory of Indonesian Ornamental Crops Research Institute from January to October 2008. The aim of this research was to know the effect of basic medium and ammonium nitrate concentrations on callus formation, growth, and regeneration. Spadix of *Anthurium andraeanum* Linden ex André cv. Tropical and callus derived from the anther were used in the experiment. Basic medium tested in the study were (1) half-strength WT, (2) half-strength NWT, and (3) full-strength NWT. While ammonium nitrate concentrations investigated were (1) 750 mg/l, (2) 550 mg/l, (3) 413 mg/l, (4) 206 mg/l, and (5) 103 mg/l. Hormones on shoot multiplication media (MP) of ½ WT tested in the study were (1) 0.5 mg/l TDZ, 1.0 mg/l BAP, and 0.01 mg/l NAA (as control, MP-1), (2) 1.0 mg/l TDZ, 1.0 mg/l BAP, and 0.01 mg/l NAA (MP-2), (3) 1.5 mg/l TDZ, 1.0 mg/l BAP, and 0.01 mg/l NAA (MP-3), (4) 1.0 mg/l TDZ, 1.5 mg/l BAP, and 0.01 mg/l NAA (MP-4), (5) 0.5 mg/l TDZ, 2.0 mg/l BAP, and 0.01 mg/l NAA (MP-5), (6) 1.0 mg/l BAP and 0.01 mg/l NAA (MP-6), (7) 0.5 mg/l BAP (MP-7), and (8) hormone free (MP-8). The experiment was arranged in a randomized complete block design (RCBD) and factorial RCBD with four replications. Results of the studies indicate that ammonium nitrate concentration had significantly effect in stimulating callus formation. Concentration of the component at 750 mg/l in half-strength WT gave high effect on increasing potential growth of anther up to 54% with 38% anther regeneration and 2.3 calluses per replication. Half-strength WT and 205 mg/l of ammonium nitrate were the suitable basic medium and ammonium nitrate concentration for callus growth and regeneration. The combination stimulated the highest callus growth up to 205 mm³ with the highest shoot number up to 5.2 shoots per explant. MP-3 medium (½ WT medium containing 1.5 mg/l TDZ, 1.0 mg/l BAP, and 0.01 mg/l NAA) was suitable hormone combination to multiply shoots derived from *Anthurium* anther culture. Half-strength WT containing 0.2 mg/l NAA can be used to root the shoots till plantlets readily for acclimatization.

Keywords: Ammonium nitrate; *Anthurium*; Callus; Anther culture; Basic medium; Regeneration; Shoot multiplication

Keberhasilan pengembangan dan aplikasi kultur jaringan pada banyak tanaman dengan berbagai tujuan sangat dipengaruhi oleh medium kultur dan tingkat kesesuaiannya dengan eksplan yang ditanam (George

et al. 2008). Berbagai jenis medium dasar seperti medium Anderson's Rhododendron (AR; Anderson 1980), Chee & Pool (C2D; Chee & Pool 1987), Chu (N6; Chu 1978), DKW/Juglans (Driver & Kuniyaki

1984), Gamborg (B5; Gamborg *et al.* 1968)), Kao & Michayluk (KM; Kao & Michayluk 1975), Knudson (K; Knudson 1946), Linsmaier & Skoog (LS; Linsmaier & Skoog 1965), Morel (M; Morel 1964), Murashige & Skoog (MS; Murashige & Skoog 1962), serta Nitsch & Nitsch (NN; Nitsch & Nitsch 1969) berhasil dikembangkan dan diaplikasikan pada kultur jaringan berbagai tanaman. Di antara berbagai jenis medium dasar tersebut, medium Murashige & Skoog (MS) (1962) merupakan salah satu jenis medium kultur jaringan yang memiliki tingkat kesesuaian tinggi pada beberapa jenis eksplan (George *et al.* 2008). Medium dasar tersebut dan beberapa modifikasinya juga berhasil diaplikasikan dalam kultur jaringan *Anthurium* untuk berbagai tujuan, baik untuk induksi pembentukan kalus, embrio, maupun regenerasinya (Kuehnle *et al.* 1992, Matsumoto *et al.* 1996, Hamidah *et al.* 1997).

Medium MS dan modifikasinya juga berhasil digunakan untuk mengembangkan kultur anther pada tanaman sayur, buah, dan hias. Pada tanaman sayur, aplikasi medium tersebut dilaporkan pada wortel (Hu *et al.* 1993, Górecka *et al.* 2009), asparagus (Ziauddin *et al.* 1993), kubis (Gorecka & Krzyzanowska 1996, Achar 2002), dan cabai (Matsubara *et al.* 1998, Kim *et al.* 2004). Pada tanaman buah dilaporkan pada kultur anther pisang (Assani *et al.* 2003) dan pepaya (Rimberia *et al.* 2006). Pada tanaman hias dilaporkan pada kultur anther *Pelargonium* (Tokumasu & Kato 1979), lili (Han *et al.* 1997, Niimi *et al.* 2001), bunga matahari (Thengane *et al.* 1994, Saji & Sujatha 1998), dan anyelir (Fu *et al.* 2008), tetapi medium ini tidak sesuai untuk kultur anther *Anthurium* (Winarto & Rachmawati 2007, Winarto 2009). Pada kultur anther *Anthurium* medium $\frac{1}{2}$ Winarto-Teixeira (WT) (Winarto *et al.* 2011), $\frac{1}{2}$ New Winarto-Teixeira (NWT) (Winarto *et al.* 2011), dan NWT merupakan medium yang berpotensi besar digunakan untuk pembentukan dan regenerasi kalus (Winarto & Rachmawati 2007, Winarto *et al.* 2011), sehingga optimalisasi medium tersebut perlu diteliti lebih lanjut.

Amonium nitrat merupakan komponen penting yang tidak hanya berpengaruh nyata terhadap keberhasilan pembentukan dan regenerasi kalus dari eksplan vegetatif seperti daun, tangkai daun, batang, dan akar (Aswath & Biswas 1999), tetapi juga terhadap eksplan generatif (anther dan ovul) (Winarto & Rachmawati 2007). Amonium nitrat diketahui juga berperan penting dalam pembentukan kalus pada *Colocasia* (Malamug *et al.* 1992), melon (Kintzios *et al.* 2004), kapas (ul-Haq 2005), jeruk (Niedz & Evens 2007), pembentukan tunas pada bit (Tsay & Saunders 1999), *Holostemma* (Decruse & Seeni 2002), kualitas produksi tunas pada *Cynara scolymus* L. (Tavazza

et al. 2003), dan kecepatan penggandaan tunas pada hibrida almond x peach (Ponce & Monter 2009). Setiap perubahan konsentrasi bahan tersebut berpengaruh terhadap respons eksplan dalam kultur *in vitro*, baik menghambat atau meningkatkan pembelahan sel, regenerasi eksplan, penambahan biomasa, dan abnormalitas pertumbuhan (Matsubayashi & Sakagami 1998, Nowak *et al.* 2007, Ivanova & van Staden 2008, Rahman *et al.* 2011). Oleh karena itu menemukan konsentrasi amonium nitrat yang sesuai untuk pembentukan dan regenerasi kalus juga menjadi faktor penting dalam menunjang keberhasilan kultur anther *Anthurium*.

Pada penelitian ini optimalisasi medium dasar potensial dan variasi konsentrasi amonium nitrat diteliti lebih lanjut untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pembentukan dan regenerasi kalus. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat yang berbeda terhadap pembentukan dan regenerasi kalus hingga pengaruhnya terhadap penggandaan tunas. Diduga terdapat satu jenis medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat yang optimal untuk tujuan tersebut.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Penyiapan Bahan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung (1100 m dpl.) dari Bulan Januari hingga Oktober 2008.

Anthurium andraeanum Linden ex Andre cv. Tropical yang digunakan sebagai tanaman donor dalam penelitian ini berasal dari PT. Eka Graha Flora, Kanoman, Cianjur, Jawa Barat. Tanaman donor ditanam dalam polibag (diameter 35 cm, tinggi 40 cm dengan volume medium 36,5 cm³). Medium tanaman terdiri atas campuran arang sekam bakar, sekam, humus bambu, dan kotoran sapi (1:1:1:1, v/v/v/v). Tanaman ditempatkan dalam rumah kaca dengan suhu 35–40°C pada siang hari dan 15–20°C pada malam hari, 12 jam fotoperiode dengan intensitas cahaya 10.000-20.000 lux pada musim kemarau (April sampai Oktober) dan 2000-6000 lux pada musim penghujan (November sampai Maret) serta kelembaban 50–90% pada siang hari dan 25–60% pada malam hari. Tanaman disiram setiap 3 hari dengan air yang mengandung 2 g/l N:P:K (20:15:15). Aplikasi pestisida, baik yang disemprotkan ke daun maupun yang disiramkan ke tanah tidak dilakukan selama pemeliharaan tanaman untuk menjaga kualitas eksplan tetap optimal untuk kultur anther.

Spadik yang dipanen dari tanaman donor sebagai donor anther ialah yang 50% stigmanya berada dalam kondisi reseptif yang ditandai dengan produksi lendir yang banyak pada permukaan stigma. Spadik disterilisasi secara bertahap, awalnya spadik diletakkan di bawah air mengalir selama 30 menit, setelah itu direndam sambil digojok dalam larutan 1% sabun bubuk selama 30 menit. Selanjutnya dipindahkan ke dalam larutan 1% pestisida (50% benomil dan streptomisin sulfat 20%) selama 30 menit, kemudian dibilas dengan air destilasi 5–6 kali hingga bersih. Setelah itu spadik direndam sambil digojok pada larutan 1% natrium hipoklorida (NaOCl) yang ditambah dengan 2–3 tetes Tween 20 selama 10 menit, selanjutnya dalam larutan 2% NaOCl ditambah 2–3 tetes Tween 20 selama 5 menit, kemudian dibilas dengan air destilasi steril 5–6 kali dengan 5 menit tiap kali pembilasan.

Spadik steril selanjutnya diletakkan dalam cawan petri steril. Spadik dipotong pada daerah transisinya (ditandai dengan perubahan warna kumpulan bunga dari putih ke kuning, panjangnya ± 2 cm, merupakan daerah donor anther yang paling responsif ketika dikultur dalam medium uji). Petal-petal bunga yang menyerupai sisik dibuka menggunakan pisau kultur. Anther yang terlihat pada 3–4 sisi stigma selanjutnya dipotong pada bagian tengah dan langsung ditanam pada medium uji.

Medium dasar yang digunakan dalam percobaan ini ialah Winarto-Teixeira (WT) dan New Winarto-Teixeira (NWT) (Winarto *et al.* 2011). Medium tersebut diformulasi secara khusus untuk pengembangan kultur anther *Anthurium*. Winarto-Teixeira mengandung 0,5 mg/l Thidiazuron (TDZ), 1,0 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP), dan 0,01 mg/l α -naphthalen acetic acid (NAA). NWT ditambah dengan 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP, dan 0,02 mg/l NAA. Kedua medium ditambah dengan 30 g/l sukrosa, dan 2 g/l gelrite. pH medium diatur pada 5,8 dan disterilisasi pada suhu 121°C, 15 kPa selama 20 menit.

Pengaruh Medium Dasar dan Konsentrasi Amonium Nitrat terhadap Pembentukan Kalus

Medium dasar yang digunakan dalam percobaan ini ialah $\frac{1}{2}$ WT, $\frac{1}{2}$ NWT, dan NWT. Konsentrasi amonium nitrat yang diaplikasikan yaitu 750, 550, 413, 206, dan 103 mg/l.

Rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan digunakan dalam percobaan ini. Tiap ulangan terdapat tiga botol. Tiap botol berisi enam anther. Botol kultur yang berisi anther selanjutnya diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu $24\pm 1^\circ\text{C}$ selama 2 bulan. Setelah itu diinkubasi pada kondisi

terang 12 jam dengan penyinaran lampu fluoresen intensitas ± 1000 lux untuk pertumbuhan kalus lebih lanjut.

Parameter yang diamati ialah: (1) potensi tumbuh anther (PTA, %) (potensi tumbuh anther ialah anther yang masih terlihat segar hingga 1 bulan setelah kultur dan memiliki potensi besar membentuk kalus), (2) persentase regenerasi anther (persentase regenerasi anther ialah jumlah anther yang berhasil membentuk kalus dibandingkan dengan total anther yang ditanam dikalikan 100% dan diamati 2–2,5 bulan setelah inisiasi kultur), dan (3) jumlah anther yang membentuk kalus diamati 2,5–3 bulan setelah inisiasi kultur.

Pengaruh Medium Dasar dan Konsentrasi Amonium Nitrat terhadap Regenerasi Kalus

Kalus-kalus hasil inisiasi pada percobaan sebelumnya digunakan dalam penelitian ini. Kalus yang telah tumbuh dan beradaptasi dengan baik, selanjutnya dipotong menggunakan pisau kultur dengan ukuran yang seseragam mungkin (3x3x3 mm). Potongan-potongan kalus inilah yang digunakan sebagai sumber eksplan dan ditanam pada medium perlakuan.

Medium dasar yang digunakan dalam percobaan ini ialah $\frac{1}{2}$ WT, $\frac{1}{2}$ NWT, dan NWT. Konsentrasi amonium nitrat yang diaplikasikan ialah 750, 550, 413, 206, dan 103 mg/l.

Rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan digunakan dalam percobaan ini. Tiap ulangan terdapat tiga botol. Tiap botol berisi empat eksplan dengan ukuran $\pm 3 \times 3 \times 3$ mm. Botol kultur yang berisi kalus selanjutnya diinkubasi dengan suhu $24\pm 1^\circ\text{C}$ pada kondisi terang selama 12 jam di bawah lampu fluoresen dengan intensitas 13 mmol/m/detik untuk pertumbuhan kalus hingga regenerasi membentuk bakal tunas dan tunas \pm selama 3 bulan.

Parameter yang diamati dalam percobaan ini ialah: (1) persentase tumbuh kalus, (2) volume kalus, (3) skor bakal tunas - sampai dengan ++++ (di mana – tidak ada bakal tunas yang teramati, + terdapat 1-5 bakal tunas, ++ terdapat 6-10 bakal tunas, +++ terdapat 11–20 bakal tunas, dan ++++ terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan yang diamati), dan (4) jumlah tunas. Pengamatan dilakukan 2,5–3 bulan setelah kultur awal pada skoring bakal tunas, sedangkan jumlah tunas diamati 4,5 bulan setelah inisiasi kultur.

Pengaruh Media Perbanyakan terhadap Pengandaan Tunas

Medium $\frac{1}{2}$ WT dengan 206 mg/l NH_4NO_3 merupakan medium yang paling potensial dalam menginisiasi pembentukan tunas pada kalus hasil kultur anther. Medium ini diperbaiki untuk perbanyakan tunas

dengan mengubah konsentrasi hormon yang ada dalam medium tersebut (0,5 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA). Media perlakuan untuk penggandaan tunas (MP) pada percobaan ini ialah: (1) 0,5 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (sebagai kontrol, MP-1), (2) 1,0 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-2), (3) 1,5 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-3), (4) 1,0 mg/l TDZ, 1,5 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-4), (5) 0,5 mg/l TDZ, 2,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-5), (6) 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA (MP-6), (7) 0,5 mg/l BAP (MP-7), dan (8) tanpa hormon (MP-8).

Rancangan acak lengkap dengan empat ulangan digunakan dalam percobaan ini. Tiap ulangan terdapat tiga botol. Tiap botol berisi lima tunas. Botol kultur yang berisi kalus selanjutnya diinkubasi dengan suhu $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ pada kondisi terang selama 12 jam di bawah lampu fluoresen dengan intensitas 13 mmol/m/detik untuk pertumbuhan kalus hingga regenerasi membentuk bakal tunas dan tunas \pm selama 3 bulan.

Parameter yang diamati dalam percobaan ini ialah: (1) waktu pembentukan tunas baru (hari), (2) jumlah tunas, (3) tinggi tunas, dan (4) jumlah daun. Pengamatan rutin dilakukan untuk mengetahui waktu pembentukan tunas. Parameter lain diamati dan dicatat 2,5 bulan setelah kultur.

Data yang berhasil dikumpulkan dianalisis menggunakan analisis varian menggunakan program SAS Release window 6.12. Jika terdapat perbedaan nilai rerata perlakuan, maka diuji lanjut menggunakan uji wilayah berganda duncan pada taraf 5%. Bilamana data pengamatan tidak menyebar normal, maka data ditransformasi sesuai dengan karakter data tersebut. Data dikembalikan ke kondisi aslinya saat disajikan dalam tulisan ini.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Medium Dasar dan Konsentrasi Amonium Nitrat terhadap Pembentukan Kalus

Induksi dan pertumbuhan kalus dalam kultur jaringan tanaman sangat dipengaruhi oleh komponen nutrisi dalam medium (Niedz & Evens 2007) dan salah satunya ialah amonium nitrat. Amonium nitrat ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$) merupakan salah satu komponen penting dalam sintesis asam amino, seperti glutamat, glutamin, arginin, asparagin, prolin, triptofan, aminolevulinat, dan asam nukleat, melalui siklus glutamat GOGAT (*glutamate-oxoglutarate-aminotransferase*) yang ada pada jaringan tanaman (Smart & Bloom 2001). Jenis dan konsentrasi asam-asam amino tersebut selanjutnya memberi pengaruh yang besar terhadap pertumbuhan dan diferensiasi kalus (George *et al.* 2008) dan setiap

perubahan konsentrasi amonium nitrat berpengaruh terhadap asam amino dalam jaringan tanaman.

Konsentrasi amonium nitrat dalam medium dasar yang diuji berpengaruh nyata terhadap pembentukan kalus. Pengaruh interaksi yang sangat nyata pada semua parameter juga ditemukan dalam percobaan ini. Interaksi tersebut lebih banyak dipengaruhi oleh perlakuan amonium nitrat. Kalus yang dikultur mulai terbentuk 25–30 hari setelah inisiasi kultur. Kalus yang tetap segar dapat terus tumbuh dan bertambah besar dalam ukuran/volume, dan terlihat jelas 2,0 bulan setelah inisiasi kultur. Jumlah anther yang membentuk kalus berkisar antara 1–4 anther dengan rerata tertinggi mencapai 2,3 kalus per ulangan.

Jenis medium dasar tidak memberi pengaruh yang nyata terhadap pembentukan kalus. Tiga medium dasar yang diuji dalam percobaan ini memberikan hasil yang hampir sama dan tidak berbeda nyata antara satu medium dengan medium yang lain (Tabel 1). Ini berarti ketiga medium dasar yang diuji memiliki kemampuan yang hampir sama dalam merangsang pembentukan kalus, meskipun $\frac{1}{2}$ WT cenderung menghasilkan jumlah kalus yang lebih banyak dibanding dua medium yang lain.

Konsentrasi amonium nitrat dalam medium yang diuji memberikan pengaruh yang sangat nyata dalam pembentukan kalus. Meskipun tidak berbeda nyata dengan konsentrasi normal, reduksi konsentrasi dari 750 menjadi 206 mg/l menstimulasi pembentukan kalus lebih baik dibanding perlakuan yang lain (Tabel 2). Konsentrasi amonium nitrat yang direduksi dari 750 menjadi 206 mg/l mampu menstimulasi potensi tumbuh anther hingga 38%, 19% regenerasi anther, dan 1,1 anther yang membentuk kalus per perlakuan.

Terdapat pengaruh interaksi yang nyata antara konsentrasi amonium nitrat dan medium dasar yang diuji. Konsentrasi 750 mg/l yang dikombinasikan dengan $\frac{1}{2}$ WT memberi hasil tertinggi pada semua parameter yang diamati. Pada kombinasi ini potensi tumbuh anther dapat mencapai 54% dengan 38% regenerasi anther, dan 2,3 anther yang membentuk kalus per perlakuan (Tabel 3). Hasil ini menunjukkan bahwa reduksi medium WT menjadi $\frac{1}{2}$ -nya yang dikombinasikan dengan konsentrasi amonium nitrat 750 mg/l memberi pengaruh yang nyata terhadap pembentukan kalus. Selanjutnya NWT dengan reduksi konsentrasi amonium nitrat menjadi 206 mg/l juga memberi pengaruh nyata dibanding kombinasi yang lain. Kombinasi ini mampu menginduksi potensi tumbuh anther hingga 46% dengan 29% regenerasi anther dan 1,8 kalus per perlakuan (Tabel 3), meskipun tidak berbeda nyata dengan kombinasi antara 206 mg/l amonium nitrat dan $\frac{1}{2}$ NWT.

Tabel 1. Pengaruh medium dasar terhadap keberhasilan induksi kalus (*Effect of basic medium on success in callus induction*)

Medium dasar (<i>Basic medium</i>)	Potensi tumbuh anther (<i>Potential growth of anthers</i>), %	Persentase regenerasi anther (<i>Percentage of anther regeneration</i>), %	Jumlah anther yang membentuk kalus (<i>Number of anthers produced callus</i>)
½ WT	25,0 a	12,1 a	0,7 a
½ NWT	30,8 a	10,4 a	0,6 a
NWT	29,2 a	10,4 a	0,6 a
KK (CV), %	14,99	19,75	16,77

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda duncan pada taraf 5%. (*Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on duncan multiple range test (DMRT) at p=0.05*)

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi amonium nitrat terhadap keberhasilan induksi kalus (*Effect of ammonium nitrate concentrations on success in callus induction*)

Konsentrasi amonium nitrat (<i>Concentration of ammonium nitrate</i>) mg/l	Potensi tumbuh anther (<i>Potential growth of anthers</i>), %	Persentase regenerasi anther (<i>Percentage of anther regeneration</i>), %	Jumlah anther yang membentuk kalus (<i>Number of anthers produced callus</i>)
750	33,3 ab	14,6 a	0,8 a
550	26,4 b	8,4 b	0,5 b
413	26,4 b	7,7 b	0,5 b
206	37,5 a	18,8 a	1,1 a
103	18,1 c	5,6 b	0,3 b
KK (CV), %	14,99	19,75	16,77

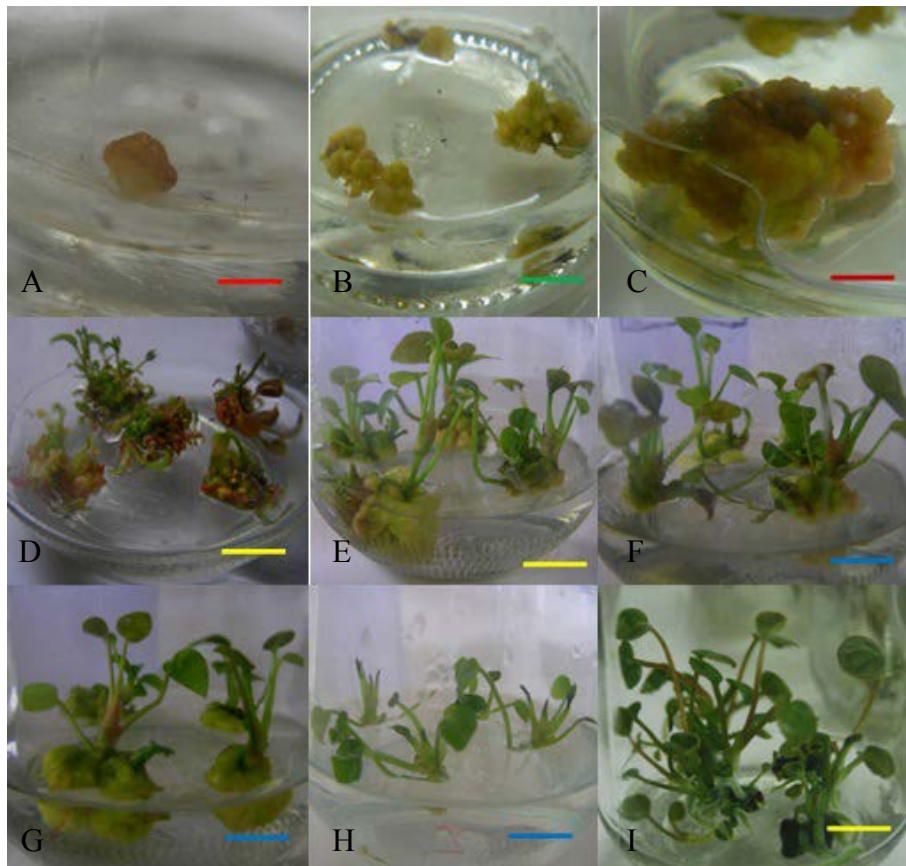
Tabel 3. Pengaruh interaksi medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat terhadap jumlah anther yang membentuk kalus per ulangan (*Interaction effect of basic medium and concentrations of ammonium nitrate on number of anthers produced callus*)

Medium dasar (<i>Basic medium</i>)	Konsentrasi amonium nitrat (<i>Concentration of ammonium nitrate</i>), mg/l				
	750	550	413	206	103
½ WT	2,3 a	0,8 a	0,5 a	0,1 b	0,0 a
½ NWT	0,3 b	0,4 a	0,5 a	1,5 a	0,5 a
NWT	0,0 b	0,4 a	0,4 a	1,8 a	0,5 a
KK (CV), %	11,99	23,00	23,57	14,56	19,44

Perubahan konsentrasi amonium nitrat dalam medium memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respons pembentukan kalus pada kultur anther *Anthurium*. Pengaruh perubahan komponen tersebut terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan juga dibuktikan pada kultur anther *Linum usitatissimum* (Nichterlein *et al.* 1991), *Populus trichocarpa* (Baldursson *et al.* 1993), *Asparagus officinalis* (Falavigna *et al.* 1999), pada kultur *in vitro* *Colocasia esculenta* (Malamug *et al.* 1992), asparagus (Matsubayashi & Sakagami 1998), *Holostemma annulare* (Decruse & Seeni 2002), dan *Prunus domestica* (Nowak *et al.* 2007). Pada konsentrasi yang sesuai, amonium nitrat dalam medium kultur anther yang diuji dapat meningkatkan kemampuan anther dalam membentuk kalus. Konsentrasi 750 mg/l pada MD-1 dan 205 mg/l pada MD-3 sesuai untuk pembentukan kalus. Pada penelitian lain, 10 ppm amonium nitrat sesuai untuk pembentukan kalus pada kultur anther peach (Biggs & Sherman 1980), 165 mg/l

dalam medium induksi sesuai untuk *L. usitatissimum* (Nichterlein *et al.* 1992), 165 mg/l dalam medium MS-1 pada *P. trichocarpa* (Baldursson *et al.* 1993), 825 mg/l dalam medium A2 pada *A. officinalis* (Falavigna *et al.* 1999) merupakan konsentrasi yang terbaik untuk pembentukan kalus.

Peningkatan pembentukan kalus melalui penurunan konsentrasi amonium nitrat pada kultur anther juga telah dilaporkan. Penurunan konsentrasi amonium nitrat dari 1.650 mg/l menjadi 825 mg/l dilaporkan pada kultur anther asparagus (Falavigna *et al.* 1999), 400 menjadi 165 mg/l pada kultur anther poplar (Uddin *et al.* 1988, Baldursson *et al.* 1993). Pada kultur *in vitro* yang lain dilaporkan bahwa penurunan konsentrasi amonium nitrat dari 700 mg/l menjadi 200 mg/l pada medium Ringe dan Nitsch meningkatkan pembentukan kalus *C. esculenta* (Malamug *et al.* 1992). Sementara pada kultur anther *Anthurium*, konsentrasi amonium nitrat diturunkan dari 750 mg/l menjadi 205 mg/l pada NWT. Penurunan hingga konsentrasi terendah kadang



Gambar 1. Pertumbuhan dan regenerasi kalus hasil kultur *Anthurium*. (A) kalus pada awal kultur inisiasi, (B) kalus \pm 1 bulan setelah kultur inisiasi, (C) kalus dengan bakal tunas 2,5–3,0 bulan setelah kultur inisiasi, (D) kalus dengan tunas yang teregenerasi 4,0–4,5 bulan setelah kultur inisiasi, (E) penggandaan tunas pada medium yang mengandung 1,5 mg/l TDZ dan 1 mg/l BAP (MP-3), (F) penggandaan tunas pada medium yang mengandung 1 mg/l TDZ dan 1,5 mg/l BAP (MP-4), (G) penggandaan tunas pada medium yang mengandung 1 mg/l TDZ dan 1 mg/l BAP (MP-2), (H) penggandaan tunas pada medium MP-8, dan (I) pengakaran tunas pada medium $\frac{1}{2}$ WT yang mengandung 0,2 mg/l NAA (*Growth and regeneration of callus derived from anther culture of Anthurium*. (A) callus in initial time of culture, (B) callus \pm 1 month after initiation culture, (C) callus with initial shoots 2.5–3.0 months after culture, (D) callus with regenerated shoots, (E) shoot multiplication on medium containing 1.5 mg/l TDZ and 1 mg/l BAP (MP-3), (F) shoot multiplication on medium containing 1 mg/l TDZ and 1.5 mg/l BAP (MP-4), (G) shoot multiplication on medium containing 1 mg/l TDZ and 1 mg/l BAP (MP-2), (H) shoot multiplication on medium hormone free (MP-8), and (I) root formation of shoots on $\frac{1}{2}$ WT medium with 0.2 mg/l NAA). Bar merah (red bar) = 0.3 cm, bar hijau (green bars) = 0,55 cm, bar kuning (yellow bar) = 1,2 cm, bar biru (blue bars) = 1,0 cm

diperlukan untuk meningkatkan aktivitas pembelahan sel (Matsubayashi & Sakagami 1998), sedangkan peningkatan konsentrasi dapat menghambat aktivitas pembelahan sel dan pertumbuhan eksplan (Jampeetong & Brix 2009).

Pengaruh Medium Dasar dan Konsentrasi Amonium Nitrat terhadap Regenerasi Kalus

Kalus hasil induksi pada percobaan pertama yang mampu beradaptasi pada kondisi inkubasi terang terus bertumbuh dan berkembang, mengalami perubahan morfologi, ukuran, dan bentuk. Kalus yang berwarna

kuning pada awal kultur berubah menjadi kehijauan atau kemerahan (Gambar 1B). Inisiasi bakal tunas terlihat jelas 2,5–3 bulan setelah kultur awal (Gambar 1C). Tunas dengan 1–2 daun dapat diamati dengan jelas 4–4,5 bulan setelah inisiasi kultur (Gambar 1D). Jumlah tunas bervariasi antara 1–10 tunas per eksplan, dengan rerata tertinggi 5,3 tunas per eksplan diperoleh pada kombinasi medium $\frac{1}{2}$ WT dengan 103 mg/l amonium nitrat (Gambar 1D).

Medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat yang diuji untuk menstimulasi regenerasi kalus memberikan pengaruh yang nyata hingga sangat nyata pada volume

Tabel 4. Pengaruh medium dasar terhadap pertumbuhan kalus lambat hasil kultur anther *Anthurium* (Effect of basic medium on slow growth of callus derived from anther culture of *Anthurium*)

Medium dasar (Basic medium)	Persentase tumbuh kalus (Percentage of callus growth), %	Volume kalus (Callus volume) mm ³	Jumlah tunas per eksplan (Number of shoots per explant)
½ WT	91,7 a	123 a	2,4 a
½ NWT	95,0 a	135 a	2,6 a
NWT	98,3 a	70 b	0,2 b
KK (CV), %	13,32	11,83	12,54

kalus dan jumlah tunas yang dihasilkan. Terdapat pengaruh interaksi nyata di antara kedua perlakuan, di mana jenis medium dasar memberi pengaruh yang lebih besar dibanding konsentrasi amonium nitratnya. Persentase tumbuh kalus sangat tinggi dan tidak berbeda nyata pada semua kombinasi perlakuan. Ini memberi bukti bahwa proses subkultur yang seringkali diikuti oleh pencoklatan eksplan dan kematiannya tidak menjadi kendala dalam percobaan ini.

Medium ½ NWT memicu pertumbuhan dan regenerasi kalus, meskipun tidak berbeda nyata dengan medium ½ WT. Medium tersebut menstimulasi pertumbuhan kalus hingga 136 mm³ per eksplan yang dikultur dengan 2,6 tunas per eksplan (Tabel 4). Sementara medium ½ WT menstimulasi pertumbuhan kalus hingga 123 mm³ dengan 2,4 tunas per eksplan. Jika dibandingkan dengan rerata volume kalus awal (27 ± 2,1 mm³ per kalus), maka pertumbuhan kalus pada medium ½ NWT meningkat hingga 400%, sementara pada ½ WT meningkat hingga 356%. Hasil ini sekaligus memberi bukti bahwa penurunan konsentrasi medium dasar sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus yang dikultur dan seperti yang dilaporkan pada kultur anther *L. usitatissimum* (Nichterlein *et al.* 1991).

Pada penelitian tersebut reduksi beberapa komponen makro medium Nichterlein hingga ½ dan mikro hingga ¼-nya berhasil memaksimalkan pembentukan tunas. Reduksi hingga ¼ medium MS menghasilkan regenerasi tunas tinggi pada *L. speciosum* (van Aartrijk & Blom-Barnhoorn 1980). Sementara pada studi lain dilaporkan Hoque & Arima (2002) pada *Trapa japonica*, Chen *et al.* (2005) pada *Bupleurum koi*, Nowak *et al.* (2007) pada *P. domestica*, serta Wang &

Bao (2007) pada *V. wittrockiana*. Reduksi konsentrasi medium MS hingga ½-nya menjadi kunci keberhasilan dalam regenerasi dan perbanyak tunas dengan variasi hormon yang digunakan.

Konsentrasi amonium nitrat memberi pengaruh yang fluktuatif pada pertumbuhan kalus. Pada konsentrasi normal (750 mg/l), volume pertumbuhan kalus tinggi, tetapi reduksi konsentrasi hingga 550 mg/l menurunkan volume pertumbuhan, kemudian meningkat pada level reduksi konsentrasi berikutnya (Tabel 5). Volume kalus tertinggi diperoleh pada 103 mg/l amonium nitrat meski tidak berbeda nyata dengan 750 mg/l. Kondisi yang berbeda diperoleh pada jumlah tunas yang dihasilkan. Penurunan konsentrasi komponen ini memiliki kecenderungan positif terhadap peningkatan jumlah tunas yang dihasilkan. Meningkatnya pembentukan tunas diduga berkaitan dengan menurunnya dampak toksisitas NH₄⁺ terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus seperti yang dilaporkan pada ketimun (Roosta *et al.* 2009). Pada ketimun, pembentukan tunas meningkat ketika konsentrasi amonium nitrat diturunkan hingga di bawah 5 mM. Penurunan konsentrasi amonium nitrat hingga nol menghasilkan pembentukan tunas yang optimal pada kultur anther *L. usitatissimum* (Nichterlein *et al.* 1991).

Berdasarkan skor jumlah bakal tunas yang dihasilkan, kombinasi medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat memberikan hasil yang bervariasi. Jumlah bakal tunas yang dihasilkan berkisar antara 6 s/d lebih dari 20 tunas per eksplan. Medium ½ NWT dengan penurunan konsentrasi amonium nitrat dari 750 mg/l ke konsentrasi yang lebih rendah memiliki kecenderungan meningkatkan jumlah bakal tunas.

Tabel 5. Pengaruh konsentrasi amonium nitrat terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus (Effect of ammonium nitrate concentrations on growth and regeneration of callus)

Konsentrasi amonium nitrat (Concentration of ammonium nitrate), mg/l	Persentase tumbuh kalus (Percentage of callus growth), %	Volume kalus (Callus volume), mm ³	Jumlah tunas per eksplan (Number of shoots per explant)
750	94,5 a	123 ab	1,3 c
550	94,5 a	93 c	1,9 ab
413	94,5 a	96 c	1,4 c
206	97,2 a	100 bc	1,8 b
103	94,5 a	96 c	2,3 a
KK (CV), %	13,32	11,83	12,54

Tabel 6. Skor jumlah bakal tunas per eksplan (Score of number of initial shoots per explant)

Konsentrasi amonium nitrat (Concentration of ammonium nitrate), mg/l	Medium dasar (Basic medium)		
	½ WT	½ NWT	NWT
750	++/+++	+++	+++
550	++	+++	+++
413	++	+++/++++	+++
206	+++/++++	+++/++++	++/+++
103	+++/++++	++++	+++/++++

– tidak ada bakal tunas yang teramati, + terdapat 1-5 bakal tunas per eksplan yang diamati, ++ terdapat 6-10 bakal tunas per eksplan yang diamati, +++ terdapat 11-20 bakal tunas per eksplan yang diamati, dan ++++ terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan yang diamati. (-, no initial shoots observed; +, 1-5 initial shoots per explant observed; ++, 6-10 initial shoots per explant observed; +++, 11-20 initial shoots per explant observed; and ++++, more than 20 initial shoots per explant observed)

Tren yang sama juga terlihat pada kombinasi medium ½ WT dengan semua level amonium nitrat. Sementara tren yang berbeda terlihat pada NWT dan konsentrasi komponen ini. Reduksi kekuatan medium ½ NWT hingga ½-nya menjadi kombinasi terbaik dalam pembentukan bakal tunas per eksplan (Tabel 6). Sedangkan kombinasi yang lain menunjukkan jumlah bakal tunas yang cenderung menurun.

Kombinasi medium ½ WT dengan 103 mg/l amonium nitrat merupakan kombinasi medium yang terbaik untuk pertumbuhan kalus dan regenerasi tunas (Tabel 7 dan 8). Pada kombinasi ini pertumbuhan kalus mencapai 205 mm³ dengan 5,2 tunas per eksplan, diikuti ½ WT dengan 206 mg/l amonium nitrat (pertumbuhan kalus 171 mm³ dan 3,7 tunas per eksplan). Kombinasi medium ½ NWT dengan 750 mg/l amonium nitrat memberi hasil yang terbaik dan berbeda nyata dengan kombinasi yang lain, tetapi pertumbuhan kalus yang baik tidak diikuti dengan kemampuan regenerasi tunas yang baik. Pertumbuhan kalus mencapai 185 mm³ tetapi jumlah tunas hanya

mencapai 1,8 tunas per eksplan. Sementara kombinasi ½ NWT dengan 550 mg/l amonium nitrat meski hanya mendorong pertumbuhan kalus hingga 144 mm³ tetapi dapat menstimulasi regenerasi tunas hingga 4,7 tunas per eksplan. Hal itu berbeda dengan kombinasi NWT dengan amonium nitrat pada berbagai konsentrasi memberikan hasil yang rendah.

Pada medium dasar, amonium nitrat dapat berperan sebagai sumber nitrogen (Tsai & Saunders 1999), juga dapat meningkatkan pengaruh aplikasi asam-asam organik (George *et al.* 2008), pembelahan sel, pembentukan kalus, organogenesis, dan embriogenesis eksplan (Malamug *et al.* 1992, Matsubayashi & Sakagami 1998, Wang & Tan 2002, Shanjani 2003, Tavazza *et al.* 2003, ul-Haq 2005, Ponce & Monter 2009). Selain itu amonium nitrat pada konsentrasi tertentu bersifat racun pada sel tanaman (Roosta *et al.* 2009) dan dapat menurunkan pH medium (Leljak-Levanic *et al.* 2004), karena itu penentuan konsentrasi amonium nitrat yang tepat dalam medium dasar memiliki peran yang sangat penting dalam

Tabel 7. Pengaruh interaksi antara medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat terhadap volume kalus (Interaction effect of basic medium and ammonium nitrate concentrations on callus volume)

Konsentrasi amonium nitrat (Concentration of ammonium nitrate), mg/l	Medium dasar (Basic medium)		
	½ WT	½ NWT	NWT
750	119 bc	185 a	65 b
550	56 d	144 ab	78 ab
413	64 cd	135 b	90 ab
206	171 ab	115 b	24 c
103	205 a	98 b	102 a
KK (CV), %	12,79	10,05	11,03

Tabel 8. Pengaruh interaksi antara medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat terhadap jumlah tunas per eksplan (JT) (Interaction effect of basic medium and ammonium nitrate concentrations on number of shoots per explant)

Konsentrasi amonium nitrat (Concentration of ammonium nitrate), mg/l	Medium dasar (Basic medium)		
	½ WT	½ NWT	NWT
750	1,9 c	1,8 c	0,0 b
550	1,1 cd	4,7 a	0,0 b
413	0,3 d	3,0 b	0,8 a
206	3,7 b	1,8 c	0,0 b
103	5,2 a	1,7 c	0,0 b
KK (CV), %	10,81	10,47	23,32

Tabel 9. Pengaruh media terhadap penggandaan tunas hasil kultur anther (*Effect of medium on shoot multiplication derived from anther culture*)

Media penggandaan (MP) (<i>Multiplication medium</i>)	Waktu pembentukan tunas (<i>Shoot initiation period</i>), hari (<i>days</i>)	Jumlah tunas (<i>Shoot number</i>)	Tinggi tunas (<i>Height of shoot</i>), cm	Jumlah daun (<i>Leaf number</i>)
MP-1	16,5 ab	1,8 ab	0,7 ab	5,8 cd
MP-2	16,0 ab	2,5 a	0,9 ab	6,8 bcd
MP-3	11,5 d	2,8 a	1,2 a	9,3 a
MP-4	12,0 d	2,5 a	1,2 a	7,3 abc
MP-5	12,8 cd	2,8 a	1,2 a	8,3 ab
MP-6	15,3 bc	1,8 ab	0,8 ab	7,3 abc
MP-7	16,3 ab	1,8 ab	0,7 ab	5,0 d
MP-8	19,0 a	1,3 b	0,6 b	4,8 d
KK (CV), %	8,64	19,05	18,48	13,32

menunjang keberhasilan kultur jaringan. Pada kultur anther *Anthurium*, konsentrasi amonium nitrat yang diturunkan dari 750 mg/l menjadi 205 mg/l pada NWT merupakan konsentrasi yang sesuai untuk pembentukan kalus.

Pada medium ½ WT dengan 103 mg/l amonium nitrat dan ½ NWT dengan 550 mg/l amonium nitrat merupakan kombinasi terbaik bagi respons pertumbuhan dan regenerasi kalus yang optimal. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi amonium nitrat yang rendah dalam medium dasar sesuai untuk pembentukan, pertumbuhan, dan regenerasi kalus pada kultur anther *Anthurium*. Pada kultur anther poplar medium yang sesuai adalah WPM dengan 400 mg/l amonium nitrat (Uddin *et al.* 1988), medium Tsay (1996) dengan 1650 mg/l amonium nitrat sesuai untuk kultur anther asparagus (Tsay *et al.* 1982), dan medium Nichterlein tanpa amonium nitrat sesuai untuk kultur anther *L. usitatissimum* (Nichterlein *et al.* 1991, Chen *et al.* 1998).

Pengaruh Media terhadap Penggandaan Tunas Hasil Kultur Anther

Pada percobaan ini inisiasi pembentukan tunas mulai terlihat 10 hari setelah kultur. Kecepatan inisiasi tunas dan pembentukan tunas yang optimal dampak aplikasi TDZ juga dilaporkan oleh Chen *et al.* (2004) pada *Paphiopedilum* dan Fei *et al.* (2009) pada *Lilium davidii*. Pertumbuhan tunas pada percobaan ini tidak sebaik pada hasil percobaan sebelumnya (Winarto *et al.* 2011). Hal ini dimungkinkan terjadi karena tunas yang berhasil diregenerasi pada percobaan ini dominan adalah tunas haploid sama seperti yang dilaporkan pada penelitian peningkatan pertumbuhan dan regenerasi tunas hasil kultur *Anthurium* (Winarto 2011). Pada percobaan ini pembentukan kalus pada bagian pangkal tunas merupakan efek menarik yang dipengaruhi oleh keberadaan hormon TDZ. Pembentukan kalus inilah yang diduga juga menghambat penggandaan tunas. Dampaknya jumlah tunas yang dihasilkan pada percobaan ini hanya berkisar 0–4 tunas per eksplan.

Media penggandaan yang diuji dalam percobaan ini memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah dan kondisi tunas yang dihasilkan. MP-3 merupakan medium yang mampu menginduksi penggandaan tunas dengan pertumbuhan yang terbaik dibanding dengan media yang lain. Medium ini menginduksi waktu inisiasi tunas tercepat, jumlah dan tinggi tunas yang maksimal dengan jumlah daun terbanyak (Tabel 9, Gambar 1E). Hasil yang lebih maksimal dilaporkan pada medium NWT yang ditambah dengan 0,25 mg/l 2,4-D, 0,02 mg/l NAA, 1,5 mg/l TDZ, dan 0,75 mg/l BAP (Winarto *et al.* 2011). Perlakuan ini juga menginduksi pembentukan kalus terbanyak dibanding perlakuan yang lain. Aplikasi hormon BAP dan NAA pada percobaan ini tidak memberi pengaruh yang maksimal dalam penggandaan tunas, sedangkan medium tanpa hormon memberi hasil terendah dalam penggandaan tunas.

Tunas hasil percobaan tumbuh membentuk planlet dengan akar yang cukup banyak pada medium ½ WT yang ditambah dengan 0,2 mg/l NAA. Pada percobaan sebelumnya pengakaran tanaman haploid ditemukan optimal pada medium MS yang ditambah dengan 0,2 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA (Winarto 2011) dan NWT yang ditambah dengan 0,2 mg/l NAA dan 1 mg/l kinetin (Winarto *et al.* 2011). Meski pembentukan akar pada percobaan ini tidak seoptimal pada percobaan sebelumnya, namun planlet yang dihasilkan dalam percobaan ini juga mudah untuk diaklimatisasi. Secara keseluruhan percobaan ini berhasil menginduksi pembentukan kalus dari anther *Anthurium*, hingga regenerasi dan penggandaan tunas menggunakan perlakuan media dasar, konsentrasi amonium nitrat, dan hormon.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Jenis medium dasar dan konsentrasi amonium nitrat memiliki pengaruh yang nyata terhadap induksi pembentukan kalus dan pembentukan tunas.

2. Kombinasi konsentrasi 750 mg/l dan medium ½ WT berpengaruh terbaik pada potensi tumbuh anther mencapai 54%, regenerasi anther 38% dan 2,3 kalus per perlakuan dibandingkan dengan kombinasi perlakuan lainnya.
3. Kombinasi medium ½ WT dan 205 mg/l amonium nitrat merupakan kombinasi perlakuan terbaik untuk pertumbuhan kalus dan pembentukan tunas dengan pertumbuhan kalus mencapai 205 mm³ dengan jumlah tunas terbanyak mencapai 5,2 tunas per eksplan.
4. MP-3, (1,5 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP, dan 0,01 mg/l NAA) merupakan kombinasi hormon yang sesuai untuk penggandaan tunas hasil kultur anther *Anthurium*.
5. Medium ½ WT yang ditambah dengan 0,2 mg/l NAA dapat digunakan untuk pengakaran tunas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fitri Rachmawati, Dewi Pramanik, Supenti, Euis Rohayati, Nina Marlina, dan Dedi Rusnandi yang menjadi teman berdiskusi, membantu persiapan penelitian dan pemeliharaan *Anthurium andraeanum* kultivar Tropical sebagai tanaman donor dalam penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih untuk Indonesian Torai Foundation yang telah memberikan dukungan dana untuk kegiatan penelitian ini.

PUSTAKA

1. Achar, PN 2002, 'A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage', *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.*, vol. 26, no. 2, pp.183-88.
2. Anderson, WC 1980, 'Tissue culture propagation of Red and Black Raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*', *Acta Horticulturae*, vol.112, pp.13
3. Assani, A, Bakry, F, Kerbellec, F, Haicour, R, Wenzel, G & Foroughi-Wehr, B 2003, 'Production of haploids from anther culture of banana [*Musa balbisiana* (BB)]', *Plant Cell Rep.*, vol. 21, pp. 511-16.
4. Aswath, C & Biswas, B 1999, 'Anthurium', in Parthasarathy, V.A., Bose, T.K., & Das, P. Naya Prokash (eds.), *Biotechnology of Horticultural Crops*, India.
5. Baldursson, S, Nogard, JV, Krogstrup, P, Andersen, SA 1993, 'Microspore embryogenesis in anther culture of three species of *Populus* and regeneration of dihaploid plants of *Populus tricarpa*', *Can. J. For. Res.*, vol. 23, pp. 1821-1825.
6. Biggs, RH & Sherman, WB 1980, 'Some Factors Affecting Callus Production By Peach Anthers', *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, vol. 93, pp.106-108.

7. Chee, R & Pool, RM 1987, 'Improved organic medium constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*', *Scientia Horticulturae*, vol. 32, pp. 85-95.
8. Chen, TY, Chen, JT & Chang, WC 2004, 'Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids', *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.*, vol.76, no. 1, pp. 11-15.
9. Chen, UC, Chueh, FS, Hsia, CN, Yeh, MS, Tsay, HS 2005, 'Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid on Leaf Callus Induction, proliferation and Saikosaponin Formation of *in vitro* *Bupleurum kanoi* Liu, Chao et Chuang', *Crop, Envi. Bioinfo.*, vol. 2, pp. 39-49.
10. Chen, Y, Kenaschuck, E & Dribnenki, P 1998, 'High frequency of plant regeneration from anther culture in flax, *Linum usitatissimum* L', *Plant Breeding*, vol. 117, pp. 463-67.
11. Chen, UC, Chueh, FS, Hsia, CN, Yeh, MS & Tsay, HS 2005, 'Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on leaf callus induction, proliferation and saikosaponin formation of *in vitro* *Bupleurum kanoi* Liu, Chao et Chuang', *Crop, Environ & Bioinformatics*, vol. 2, pp. 39-49.
12. Chu, CC 1978, 'The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops', *Proceeding of Symposium Plant Tissue Culture*, Peking, pp. 43.
13. Decruse, SW & Seeni, S 2002, 'Ammonium nitrate in the culture medium influences regeneration potential of cryopreserved shoot tips of *Holostemma annulare*', *Cryoletters*, vol. 23, no.1, pp. 55-60.
14. Driver, JA & Kuniyaki, AH 1984, 'In vitro propagation of paradox walnut rootstock', *HortSci.*, vol. 19, pp. 4.
15. Falavigna, A, Casali, PE & Battalaglia, A 1999, 'Achievement of asparagus breeding in Italy', *Acta Hort.*, vol. 479, pp. 67-74.
16. Fei, XL, Wang, MF & Dong, L 2009, 'Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolor)', *Scientia Horticulturae*, vol. 119, no. 4, pp 458-61.
17. Fu, XP, Yang, SH & Bao, MZ 2008, 'Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.)', *In Vitro Cell and Develop Biol. Plant*, vol. 44, no.3, pp. 194-202.
18. Gamborg, OL, Miller, RA & Ojima, K 1968, 'Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells', *Exp. Cell Res.*, vol. 50, pp. 151-58.
19. George, EF, Hall, MA & De Klerk, GJ 2008, 'The components of plant tissue culture medium I: macro- and micro-nutrients' in eds. George, EF, Hall, MA & De Klerk, GJ, *plant propagation by tissue culture: the background*, vol. 1, 3rd Edition Springer, Netherlands.
20. Gorecka, K & Krzyzanowska, D 1996, 'Plant regeneration from anther-derived embryos of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)', *ISHS Acta Horticulturae* 447: III International Symposium on *In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, viewed 2 February 2009 <www.actahort.org/members/showpdf?booknr=447_67>.
21. Górecka, K, Krzyzanowska, D, Kiszczak, W & Kowalska, U 2009, 'Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos', *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 31, pp. 1139-45.
22. Hamidah, M, Karim, AGA & Debergh, P 1997, 'Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*', *Plant Cell Tis. and Org. Cult.*, vol. 48, pp. 189-93.

23. Han, DS, Niimi, Y & Nakano, M 1997, 'Regeneration of haploid plants from anther cultures of the Asiatic Irbid lily 'Connecticut King'', *Plant Cell Tis. and Org. Cult.*, vol. 47, pp. 153-58.
24. Hoque, A & Arima, S 2002, 'Overcoming phenolic accumulation during callus induction and *in vitro* organogenesis in water chestnut (*Trapa japonica* Flerov)', *In Vitro Cell and Develop. Biol. Plant*, vol. 38, pp. 342-46.
25. Hu, KL, Matsubara, S & Murakami, K 1993, 'Haploid plant production by anther culture in carrot (*Daucus carota* L.)', *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, vol. 62, no. 3, pp. 561-65.
26. Ivanova, M & van Staden, J 2008, 'Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*', *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, vol. 92, no. 2, pp. 227-31.
27. Jampeetong, A & Brix, H 2009, 'Effects of NH_4^+ concentration on growth, morphology and NH_4^+ uptake kinetics of *Salvinia natans*', *Ecol. Engineer.*, vol. 35, no. 5, pp. 695-702.
28. Kao, KN & Michayluk, MR 1975, 'Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid medium', *Planta* (Berl.), vol. 126, pp. 105.
29. Kim, M, Kim, J, Yoon, M, Choi, DI & Lee, KL 2004, 'Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*)', *Plant Cell Tis. and Org. Cult.*, vol. 77, pp. 63-72.
30. Kintzios, S, Stavropoulou, E & Skamneli, S 2004, 'Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis)', *Plant Sci.*, vol. 167, no. 3, pp. 655-64.
31. Knudson, 1946, 'A new nutrient solution for orchid seed germination', *Am. Orchid Soc. Bull.*, vol. 15, pp. 214-17.
32. Kuehnle, AR, Chen, FC & Sugii, N 1992, 'Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* L. hybrids', *Plant Cell Rep.*, vol. 11, pp. 438-42.
33. Leljak-Levanic, D., Bauer, N., Mihaljevic, S., & Jelaska, S. 2004, 'Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds', *J. Plant Physiol.*, vol. 161, pp. 229-36.
34. Linsmaier, EM & Skoog, F 1965, 'Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures', *Physiologia Plantarum*, vol. 18, pp. 100.
35. Matsubara, S, Yamamoto, Y, Jo, MH & Murakami, K 1998, 'Embryoid and callus formation from microspores by anther culture from July to November in pepper (*Capsicum annuum* L.)', *Reports* vol. 87, *Faculty of Agriculture, Okayama University*.
36. Malamug, JF, Yazawa, S & Asahira, T 1992, 'Callus formation and multiplication in Taro', *J. Japan. Soc. Hort.*, vol. 60, no. 4, pp. 927-933.
37. Matsubayashi, Y., & Sakagami, Y 1998, 'Effects of the medium ammonium nitrate ratio on competence for asparagus cell division induced by phytosulphokine-a', *Plant Cell Rep.*, vol. 17, pp. 368-72.
38. Matsumoto, T, Webb, DT & Kuehnle, AR 1996, 'Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André lamina', *Am. Soc. Hort. Sci.*, vol. 12, no. 3, pp. 404-407.
39. Morel, G 1964, 'Tissue culture: A new means of clonal propagation of orchids', *Am. Orchid Soc. Bull.*, vol. 33, pp. 473-78.
40. Murashige, T & Skoog, F 1962, 'A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures', *Plant Physiol.*, vol. 15, pp. 473-97.
41. Nichterlein, K, Umbach, H and Friedt, W 1992, 'Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.)', *Euphytica*, vol. 85, pp. 157-164.
42. Nichterlein, K, Umbach, H & Friedt, W 1991, 'Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.)', *Euphytica*, vol. 58, pp. 157-64.
43. Niedz, RP & Evens, TJ 2007, 'Regulating plant tissue growth by mineral nutrition', *In Vitro Cell and Develop Biol. Plant*, vol. 43, pp. 370-81.
44. Niimi, Y, Han, DS & Fujisaki, M 2001, 'Production of virus-free plantlets by anther culture of *Lilium* 'Enchantment'', *Sci. Hort.*, vol. 90, no. 3-4, pp. 325-34.
45. Nitsch, JP & Nitsch, C 1969, 'Haploid plants from pollen grains', *Science*, vol. 169, pp. 85.
46. Nowak, BK, Miczyński, K & Hudy, L 2007, 'The effect of total inorganic nitrogen and the balance between its ionic forms on adventitious bud formation and callus growth of 'Węgiełka Zwykła' plum (*Prunus domestica* L.)', *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 29, no. 5, pp. 479-84.
47. Ponce, DMP & Monter, AV 2009, 'In vitro propagation of almond × peach hybrid H1', *Revista Fitotecnica Mexicana*, vol. 32, no. 2, pp. 103-109.
48. Rahman, MH, Haider, SA, Hossain, M & Islam, R 2011, 'Effect of potassium and ammonium nitrate medium on *in vitro* growth response of potato (*Solanum tuberosum* L.)', *Internat J. Biosciences*, vol. 1, no. 2, pp. 54-7.
49. Rimberia, F, Shinichi, A, Takeomi, E & Yukio, I 2006, 'Sex and ploidy of anther culture derived papaya (*Carica papaya* L.) plants', *Euphytica*, vol. 149, no. 1-2, pp. 53-9.
50. Roosta, HR, Sajjadinia, A, Rahimi, A & Schjoerring, JK 2009, 'Responses of cucumber plant to NH_4^+ and NO_3^- nutrition: The relative addition rate technique vs. cultivation at constant nitrogen concentration', *Sci. Hort.*, vol. 121, no. 4, pp. 397-403.
51. Saji, KV & Sujatha, M 1998, 'Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.)', *Euphytica*, vol. 103, pp. 1-7.
52. Shanjani, PS 2003, 'Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excels*', *Internat. J. Agric. Bio.*, vol. 5, no. 4, pp. 419-22.
53. Smart, DR & Bloom, AJ 2001, 'Wheat leaves emit nitrous oxide during nitrate assimilation', *PNAS*, vol. 98, pp. 7875-78.
54. Tavazza R, Papacchioli, V & Ancora, G 2003, 'An improved medium for *in vitro* propagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.)', *ISHS Acta Horticulturae* 660: V *International Congress on Artichoke* [viewed 2 February 2009 <www.actahort.org/members/showpdf?booknr=660_10>].
55. Thengane, SR, Joshi, MS, Khuspe, SS & Mascarenhas, AE 1994, 'Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration', *Plant Cell Rep.*, vol. 13, pp. 222-26.
56. Tokumasu, S & Kato, M 1979, 'Variation of chromosome numbers and essential oil components of plants derived from anther culture of the diploid and the tetraploid in *Pelargonium roseum*', *Euphytica* vol. 28, pp. 329-338.

57. Tsai, CJ & Saunders, JW 1999, 'Evaluation of sole nitrogen sources for shoot and leaf disc cultures of sugarbeet', *Plant Cell Tis. and Org. Cult.*, vol. 59, no. 1, pp. 47-56.
58. Tsay, HS, Lai, PC and Chen, LJ 1982, 'The development of haploid plants of *Asparagus officinalis* L. through anther culture', *Taiwan Asparagys Res.*, vol. 1981, pp. 23-26.
59. Tsay, HS 1996, 'Haploid in asparagus anther culture', In: Jain, SM, Sopory, SK and Veileux RE (Eds.), *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, pp. 109-134.
60. Uddin, MR, Meyer, MMJ & Jokela, JJ 1988, 'Plantlet production from anthers of eastern cottonwood (*Populus deltoides*)', *Canad. J. Fores Res.*, vol. 18, pp. 937-41.
61. ul-Haq, I. 2005, 'Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 4, no. 2, pp. 206-09.
62. van Aartrijk, J & Blom-Barnhoorn, GJ 1980, 'Effects of sucrose, mineral salts, and some organic substances on the adventitious regeneration *in vitro* of plantlets from bulb-scale tissue of *Lilium speciosum* 'rubrum'', *ISHS Acta Horticulturae* 109: III *International Symposium on Flower Bulbs* [viewed 15 April 2009 <www.actahort.org/members/showpdf?booknr=109_41>].
63. Wang, JW & Tan, RX 2002, 'Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium', *Biotechnol. Letters*, vol. 24, no. 14, pp. 1153-56.
64. Wang, J & Bao, MZ 2007, Plant regeneration of pansy (*Viola wittrockiana*) 'Caidie' via petiole-derived callus', *Scientia Horticulturae*, vol. 111, no. 3, pp. 266-70.
65. Winarto, B & Rachmawati, F 2007, 'Teknik kultur anther pada pemuliaan *Anthurium*', *J. Hort.*, vol. 17, no. 2, pp.127-37.
66. Winarto, B 2009, 'Androgenesis: a breakthrough effort for preparing haploid or double haploid plants in *Anthurium*', PhD Dissertation, Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture, Bogor Agriculture Institute, 235 pp.
67. Winarto, B, Rachmawati, F & Teixeira da Silva, JA 2011, 'New basal media for half-anther culture of *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre' cv. Tropical', *Plant Growth Regul.*, vol. 65, pp. 513-29.
68. Ziauddin, A, Feng, XR & Wolyn, DJ 1993, 'Advances in asparagus anther culture', *ISHS Acta Horticulturae* 415: VIII *International Asparagus Symposium* [viewed 15 April 2009<www.actahort.org/members/showpdf?booknr=415_33>].