

# Studi Embriogenesis Klon-klon *Vanda* Hasil Persilangan *Vanda tricolor* x [(*Vanda* Patao x *Vanda* Jenny Hashimoto) x *Ascocenda* Peggy Foo] secara *In Vitro* (*In Vitro* Embryogenesis Study of *Vanda* Clones Derived from Hybridization of *Vanda tricolor* x [(*Vanda* Patao x *Vanda* Jenny Hashimoto) x *Ascocenda* Peggy Foo])

Winarto, B, Dewanti, M, dan Pramanik, D

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

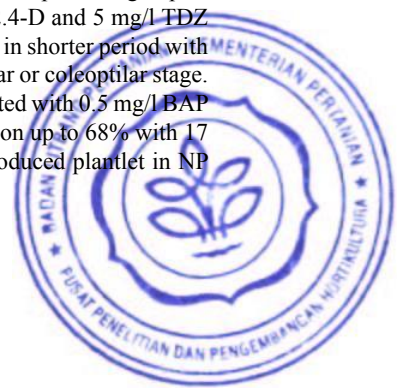
E-mail: budi\_winarto67@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 26 Januari 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 20 Februari 2013

**ABSTRAK.** Perakitan varietas unggul baru *Vanda* beraroma wangi telah dilakukan dan menghasilkan beberapa klon yang terseleksi. Untuk menunjang pelepasan klon-klon terseleksi tersebut diperlukan ketersediaan bibit yang cukup dan perbanyak bibit melalui induksi embriogenesis somatik dapat menjadi alternatif terbaik. Studi embriogenesis klon-klon *Vanda* hasil persilangan *Vanda tricolor* x [(*Vanda* Patao x *Vanda* Jenny Hashimoto) x *Ascocenda* Peggy Foo] secara *in vitro* dalam rangka penyediaan bibit berkualitas dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Hias, dari Bulan Januari 2010 hingga Desember 2011. Delapan belas klon *Vanda*, tiga teknik sterilisasi (TS-1, TS-2, dan TS-3), empat jenis eksplan (JE-1, JE-2, JE-3, dan JE-4), tiga kondisi inkubasi (KI-1, KI-2, dan KI-3), empat kombinasi konsentrasi asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-D)- Tiazuron (TDZ) (KK-1, KK-2, KK-3, dan KK-4), dan 16 jenis media (variasi MI, MP, dan MK) digunakan dan diuji dalam penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dan RAK faktorial dengan empat ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat tujuh klon yaitu V2-17, V2-21, V2-43, V2-10-1, V2-10-2, V2-2010-1, dan V2-2010-3 dengan kemampuan membentuk kalus embriogenik yang hampir sama dengan rerata persentase pembentukan kalus mencapai 25% dan skor pembentukan kalus ++++. Medium ½ Murashige & Skoog (MS) yang ditambah dengan 1 mg/l TDZ, 0,5 mg/l *benzylaminopurine* (BAP), 2% sukrosa (MI-1), dan 0,05% HgCl<sub>2</sub> selama 10 menit yang diikuti oleh pembilasan dengan air steril 5–6 kali (masing-masing 5 menit) (TS-3) merupakan medium inisiasi dan teknik sterilisasi yang sesuai untuk embriogenesis klon-klon *Vanda*. Variasi media MI-1 diperbaiki dan menghasilkan medium ½ MS yang ditambah dengan 10 mg/l (2,4-D), 1 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 1 mg/l asam asetat-3-indol (IAA), dan 3% sukrosa (MP-2). Variasi media MP-2 mampu menginduksi pembentukan embrio (tahap akhir globular/koleoptilar) hingga 18 embrio per eksplan pada nodus tangkai bunga (JE-3). Kombinasi konsentrasi 2,5 mg/l 2,4-D dengan 5 mg/l TDZ (KK-4) pada kondisi inkubasi intensitas cahaya rendah (KI-2) mampu menginduksi pembentukan kalus lebih cepat dengan persentase pembentukan embrio mencapai 32% dan jumlah embrio hingga 20 embrio (tahap akhir globular/koleoptilar) per eksplan. Embrio berkecambah dengan kualitas pertumbuhan tunas terbaik pada medium *New Phalaenopsis* yang ditambah 0,5 mg/l BAP (MK-5). Media MK-5 mampu menekan pencoklatan eksplan turun hingga 1,3% dan meningkatkan persentase perkecambahan hingga 68% dengan jumlah embrio berkecambah mencapai 17 embrio (tahap akhir globular/koleoptilar). Embrio yang berkecambah tumbuh baik membentuk planlet pada medium NP yang ditambah 0,25 mg/l BAP. Keberhasilan induksi embriogenesis hingga pembentukan tunas berkualitas pada studi ini dapat menjadi bahan pertimbangan pengembangan *protocol* embriogenesis pada anggrek *Vanda* yang lain.

Katakunci: Studi; Embriogenesis; Regenerasi; Teknik sterilisasi; Media; Kondisi inkubasi; Klon *Vanda*

**ABSTRACT.** New superior variety engineering of fragrance *Vanda* has been carried out and resulted several selected clones. To support the releasing and registering of them is needed availability of sufficient qualified seedling and seed propagation via somatic embryogenesis induction can be used as the best alternative. *In vitro* embryogenesis studies of *Vanda* clones derived from hybridization of *Vanda tricolor* x [(*Vanda* Patao x *Vanda* Jenny Hashimoto) x *Ascocenda* Peggy Foo] were carried out in Tissue Culture Laboratory, Indonesian Ornamental Crops Research Institute from January 2010 till December 2011. Eighteen clones of *Vanda*, three sterilization techniques (TS-1, TS-2, and TS-3), four explant types (JE-1, JE-2, JE-3, and JE-4), three incubation conditions (KI-1, KI-2, and KI-3), four combination concentration of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)- thiazuron (TDZ) (KK-1, KK-2, KK-3, and KK-4), and 16 media (variation of MI, MP, and MK) were tested in the research. Randomized complete block design (RCBD) and factorial RCBD with four replication were used in the study. Results of the study indicated that there were seven clones i.e. V2-17, V2-21, V2-43, V2-10-1, V2-10-2, V2-2010-1, and V2-2010-3 having similar and high callus formation capacity with average of percentage of callus formation up to 25% and score of callus formation up to ++++. Half-strength Murashige & Skoog (MS) supplemented with 1 mg/l TDZ, 0.5 mg/l benzylaminopurine (BAP), and 2% sucrose (MI-1) and 0.05% HgCl<sub>2</sub> solution for 10 min. followed by rinsing the explant 5-6 times (5 min each) (TS-3) were the appropriate initiation medium and sterilization technique for embryogenesis of *Vanda* clones. Half-strength MS containing 10 mg/l 2,4-D, 1 mg/l TDZ, 0.5 mg/l BAP, 1 mg/l indole-3-acetic acid (IAA), and 3% sucrose (MP-2) was an improved medium of MI-1 stimulating embryo formation in late globular or coleoptilar stage up to 18 embryos per explant from nodus explant of flower stalk (JE-3). Combination concentration of 2.5 mg/l 2,4-D and 5 mg/l TDZ (KK-4) in low light intensity of incubation room (KI-2) significantly improved embryogenic callus formation in shorter period with percentage of callus formation up to 32% and number of embryos per explant up to 20 embryos in late globular or coleoptilar stage. Germinated embryos with high quality shoot growth were determined on *New Phalaenopsis* medium augmented with 0.5 mg/l BAP (MK-5). The MK-5 reduced embryo browning down to 1.3% and increased percentage of embryo germination up to 68% with 17 germinated embryos in late globular or coleoptilar stage. Individual germinated-embryo grew well and produced plantlet in NP



medium supplemented with 0.25 mg/l BAP. Success in induction of embryogenesis till establishment of well-shoot growth obtained from the research can be used as one of important considerations in developing embryogenesis protocol on other *Vanda* orchids.

Keywords: Study; Embryogenesis; Regeneration; Sterilization; Media; Incubation condition; *Vanda* clones

Perakitan varietas unggul baru untuk menghasilkan *Vanda* baru berumur genjah, bentuk bunga dan warna bunga yang menarik, rajin berbunga, jumlah bunga per tangkai yang banyak, komposisi bunga sesuai untuk rangkaian, dan aroma bunga wangi telah dilakukan oleh Balai Penelitian Tanaman Hias sejak tahun 2006 (Dewanti *et al.* 2010). Berbagai persilangan menggunakan *Vanda tricolor* sebagai tetua yang menurunkan karakter aroma wangi juga dilakukan dan salah satunya ialah persilangan *Vanda tricolor* x [(*Vanda* Patao x *Vanda* Jenny Hashimoto) x *Ascocenda* Peggy Foo]. Dari hasil persilangan kedua tetua tersebut dihasilkan beberapa klon terseleksi (V2-14, V2-17, V2-19, V2-21, V2-42, V2-43, dan V2-49) yang memiliki potensi untuk dilepas sebagai varietas unggul baru *Vanda*. Selanjutnya perbanyak dan penyiapan bibit untuk tujuan tersebut harus segera dilakukan dan perbanyak melalui kultur jaringan merupakan alternatif terbaik untuk mempersiapkannya.

*Vanda* merupakan anggrek monopodial dengan dominasi tunas apikal sangat kuat pada pertumbuhannya (Kisor & Devi 2009). Tunas lateral tidak dapat tumbuh dengan baik jika dominasi apikal tersebut tidak dihilangkan. Perbanyak vegetatif anggrek ini dilakukan dengan cara stek untuk menginduksi tunas aksiler. Cara perbanyak ini berlangsung lambat dan materi perbanyak terbatas. Anakan yang dihasilkan hanya berkisar antara 4 sampai 6 anakan per tahunnya (Goh 1990). Perbanyak cara ini tidak dapat diandalkan lagi untuk tujuan penyediaan bibit berkualitas dalam jumlah yang besar, komersial pada skala industri, dan untuk mendukung laju permintaan pasar/konsumen akan produk yang berkualitas. Oleh karena itu teknik perbanyak cepat sangat dibutuhkan untuk mendukung tujuan tersebut dan kultur jaringan menjadi alternatif terbaik.

Aplikasi teknologi kultur jaringan pada anggrek *Vanda* dengan respons dan hasil regenerasi yang bervariasi dilakukan sejak tahun 1970-an dan berkembang pesat hingga saat ini. Berbagai jenis *Vanda* yang dikembangkan secara *in vitro* di antaranya ialah *Vanda* Miss Joaquim (Goh 1970, Kunisaki *et al.* 1972), *V. insignis* x *V. tessellata* (Teo *et al.* 1973), *Vanda* *coerulea* Giff ex. Lindl (Seeni & Latha 2000, Malabadi *et al.* 2004, Lang & Hang 2006), *Vanda* *spatulata* (Decruse *et al.* 2003), *Vanda* *testacea* (Lindl.) Reichb. f. (Kaur & Bhutani 2009), dan *Aerides* *vandarum* Reichb. f x *Vanda* *stangeana* Reichb. f. (Kisor & Devi

2009). Media dasar yang digunakan bervariasi dari medium White (Goh 1970), Vacin & Went (VW) (Kunisaki *et al.* 1972, Sagawa & Kunisaki 1982, Widiastoety 1985, Widiastoety *et al.* 1986, Malabadi *et al.* 2004), Mitra (Seeni & Latha 1992, Decruse *et al.* 2003), dan Murashige & Skoog (MS) (Lang & Hang 2006). Pemanfaatan bahan organik seperti air kelapa (10–15%), arang aktif (1–2%), kasein hidrolisat (0,5–2 g/l), glutamin (500 mg/l), pepton (250 mg/l), hingga pemanfaatan hormon tanaman seperti *benzyladenine* (BA, 1,0–2,0 mg/l), tidiazuron (TDZ, 0,3–0,5 mg/l), *α-naphthaleneacetic acid* (NAA, 0,1–1,0 mg/l) juga digunakan dalam kultur *in vitro* *Vanda*. Sementara daun, tunas ujung, tunas lateral, batang, dan akar, digunakan sebagai sumber eksplannya.

Media yang sering diaplikasikan dalam kultur *in vitro* *Vanda* ialah (1) medium VW ditambah 10% air kelapa dan 2% sukrosa (Goh 1970, Kunisaki *et al.* 1972, Teo *et al.* 1973, Sagawa & Kunisaki, 1982, Widiastoety 1985, Widiastoety *et al.* 1986), (2) VW yang ditambah 1 mg/l NAA dan 1 mg/l BA (Widiastoety 1985, Widiastoety *et al.* 1986), (3) medium VW ditambah 10% air kelapa, 1 g/l pepton, 1,0 mg/l BAP, 1,0 mg/l NAA, dan 2% sukrosa (Malabadi *et al.* 2004), dan ½ MS yang mengandung 0,3 mg/l TDZ dan 0,1 mg/l NAA, 1 g/l pepton, 10% air kelapa, dan 3% sukrosa (Lang & Hang 2006). Kultur diinkubasi pada kondisi inkubasi yang berbeda dengan (1) 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas 25–50 µmol/m<sup>2</sup>/s pada suhu 25±2°C (Seeni & Latha 1992, 2000, Decruse *et al.* 2003, Kaur & Bhutani 2009) dan 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas 100 µmol/m<sup>2</sup>/s pada suhu 25±2°C dan kelembaban 55–60% (Malabadi *et al.* 2004), sedangkan desinfektan HgCl<sub>2</sub> 0,1%, dan NaOCl 1% yang dikombinasikan dengan air mengalir (15 menit hingga 1 jam), alkohol (70%, 30 detik), dan streptomisin (0,1%) diaplikasikan untuk mendapatkan kultur aseptik.

Berbagai studi terkait dengan teknik sterilisasi, jenis eksplan, media, dan kondisi inkubasi telah dilaporkan pada kultur *in vitro* beberapa jenis *Vanda*, tetapi studi tersebut belum pernah dilaporkan pada kultur *in vitro* klon-klon *Vanda* hasil persilangan *V. tricolor* x [(*V.* Patao x *V.* Jenny Hashimoto) x *Ascocenda* Peggy Foo]. Penelitian bertujuan mendapatkan informasi dan teknologi embriogenesis klon *Vanda* hasil persilangan *V. tricolor* x [(*V.* Patao x *V.* Jenny Hashimoto) x



*Ascocenda* Peggy Foo]. Informasi dan teknologi embriogenesis klon *Vanda* sejak pembentukan kalus embriogenik hingga perkecambahannya dapat dihasilkan melalui penelitian ini.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung (1100 m dpl.) dari Bulan Januari 2010 sampai dengan Desember 2011.

Klon-klon *Vanda* hasil persilangan *V. tricolor* x [(*V. Patao* x *V. Jenny Hashimoto*) x *Ascocenda* Peggy Foo], yaitu: V2-8, V2-12, V2-14, V2-17, V2-19, V2-21, V2-23, V2-35, V2-37, V2-39, V2-43, V2-44, V2-51, V2-10-1, V2-10-2, V2-2010-1, V2-2010-3, dan V2-2010-4. Klon-klon tersebut dipelihara secara maksimal dengan cara penyiraman (1–2 hari sekali pada pagi hari bergantung musim), pemupukan dilakukan 1 minggu sekali pada pagi hari dengan larutan campuran pupuk [Growmore 32-10-10 dan 10-55-10 (0,8 g/l, Growmore, Gardena-Canada), Topsoil (5 cc/4 l, Ayub & Sentosa-Indonesia), dan Biosugih (5 cc/4 l, PT. Biosugih Cipta Sentosa-Indonesia)], dan aplikasi campuran [streptomisin sulfat 20%; 0,8 g/l, PT-Mastalin Mandiri-Jakarta-Indonesia), deltametrin 2,5%, 5 cc/4 l, Bayer Crop Science, Ltda-Brasil), difenokonazol 250g, 5 cc/4 l, Syngenta Crop Protection Canada Inc, Guelph), dan tiametoxam 25%, 0,8 g/l, Syngenta Crop Protection Canada, Inc Guelph)] 1 minggu sekali dilakukan untuk menghindarkan tanaman dari serangan penyakit. Bahan tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan ialah daun dari tunas pucuk, tunas muda, tangkai bunga, dan akar, yang diambil dari tanaman donor yang berumur 1–1,5 tahun. Daun muda dari tunas pucuk yang digunakan ialah daun ke-2 dan 3, daun muda dari tunas muda diambil dari tunas dengan tinggi 2–3 cm, tangkai bunga dipanen dari tangkai bunga dengan 2–3 kuncup bunganya mekar.

Semua eksplan yang digunakan dalam penelitian diberi praperlakuan dengan cara mengusap seluruh permukaan eksplan secara merata dengan kapas yang dibasahi alkohol 96%. Untuk eksplan yang berupa tangkai bunga, setelah sterilisasi permukaan tersebut, kuncup-kuncup bunga yang masih menempel selanjutnya dibuang dengan cara dipotong menggunakan pisau kultur. Setelah itu eksplan diletakkan di bawah air mengalir selama 1,5–2 jam. Setelah praperlakuan, eksplan selanjutnya disterilisasi dengan larutan HgCl<sub>2</sub> 0,05% yang diberi beberapa tetes Tween 20 selama 10 menit sambil digojok secara

manual dengan tangan. Eksplan selanjutnya dibilas dengan air destilasi steril enam kali masing-masing 5 menit.

Untuk eksplan daun muda dari tunas pucuk dan akar disiapkan untuk kultur dengan cara memotong bagian eksplan yang rusak akibat proses sterilisasi. Eksplan dipotong dengan ukuran ± 1–1,5 dengan mengutamakan mengambil bagian yang lebih banyak mengandung sel-sel muda.

Untuk eksplan daun muda yang berasal dari tunas muda disiapkan dengan cara memotong bagian eksplan yang rusak akibat sterilisasi dengan pisau kultur. Daun yang melekat selanjutnya dibuka secara hati-hati menggunakan pinset dengan cara mengupas lembar demi lembar daun hingga bagian yang menempel pada pucuk tunas. Daun-daun tersebut selanjutnya dibelah menjadi dua pada bagian tengahnya. Potongan eksplan inilah yang selanjutnya dikultur pada media kultur.

Untuk eksplan yang berasal dari tangkai bunga dipersiapkan dengan cara memotong tiap tangkai kuncup bunga pada bagian dasar hingga nampak rata dengan tangkai bunga. Tiap nodus selanjutnya dipotong dengan jarak 0,3–0,5 cm pada bagian atas nodus dan 0,5–1,0 cm pada bagian bawah. Eksplan selanjutnya dikultur pada media kultur yang diuji.

Eksplan yang telah dikultur dalam media uji selanjutnya diinkubasi pada kondisi gelap dengan suhu 25±1°C selama 2 bulan atau hingga pembentukan kalus dan mudah diamati. Inkubasi terang dilakukan pada 12 fotoperiode pada suhu yang sama di bawah lampu fluoresen dengan intensitas 13–25 µmol/m<sup>2</sup>/s.

### Studi Kemampuan Klon-klon *Vanda* Membentuk Kalus Embriogenik

Studi kemampuan pembentukan kalus klon-klon *Vanda* dilakukan untuk mengetahui variasi respons klon *Vanda* dalam kultur *in vitro*. Delapan belas klon *Vanda* (V2-8, V2-12, V2-14, V2-17, V2-19, V2-21, V2-23, V2-35, V2-37, V2-39, V2-43, V2-44, V2-51, V2-10-1, V2-10-2, V2-2010-1, V2-2010-3, dan V2-2010-4) digunakan pada percobaan ini. Eksplan yang digunakan ialah nodus yang dipanen dari tangkai bunga. Eksplan selanjutnya ditanam pada medium ½ MS yang mengandung 1 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BA, dan 3% sukrosa dan diinkubasi dalam ruang gelap selama ± 2 bulan.

### Pengaruh Media dan Teknik Sterilisasi terhadap Embriogenesis Klon-klon *Vanda*

Media yang diuji dalam penelitian ini ialah (1) medium VW ditambah dengan 10% air kelapa, 2% sukrosa tanpa hormon (MI-1), (2) medium VW ditambah dengan 10% air kelapa, 2% sukrosa, 0,5



mg/l BAP, dan 0,5 mg/l NAA (MI-2), (3) medium VW ditambah dengan 10% air kelapa, 2% sukrosa, 1,0 mg/l BAP, dan 1,0 mg/l NAA (MI-3), (4) medium  $\frac{1}{4}$  MS (170 mg/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) yang ditambah dengan 10% air kelapa, 3% sukrosa, 0,3 mg/l TDZ, dan 0,1 mg/l NAA (MI-4), dan (5) medium  $\frac{1}{2}$  MS yang ditambah dengan 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BA, dan 2% sukrosa (MI-5). Teknik sterilisasi yang diuji ialah (1) larutan NaOCl (10, 5, dan 2%) (masing-masing 20 menit), bilas dengan air steril dua kali (masing-masing 10 menit), alkohol 96% (2 menit), bilas air steril dua kali (masing-masing 10 menit) (TS-1), (2) rifampicin (600 mg/200 cc air steril) (24 jam), larutan sabun 1% (30 menit), larutan pestisida 1% (benomil 50% dan kanamisin sulfat 20%) (30 menit), bilas air steril dua kali (masing-masing 5 menit), larutan NaOCl (10, 5, dan 2%) (masing-masing 15 menit), bilas dengan air steril lima kali (masing-masing 5 menit) (TS-2), dan (larutan  $\text{HgCl}_2$  0,05% (10 menit), bilas dengan air steril 5–6 kali (masing-masing 5 menit) (TS-3). Eksplan yang digunakan dalam percobaan ini ialah nodus yang dipanen dari tangkai bunga klon-klon *Vanda* dengan kemampuan pembentukan kalus yang relatif sama (hasil percobaan 1).

#### **Pengaruh Media dan Jenis Eksplan dalam Embriogenesis Klon-klon *Vanda***

Medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, dan 2% sukrosa (MI-1) merupakan medium inisiasi yang paling potensial dikembangkan dan diperbaiki. Medium tersebut diperbaiki dengan meningkatkan konsentrasi hormon dan jumlahnya. Media perbaikan (MP) yang diuji dalam percobaan ini ialah (1) medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, dan 2% sukrosa (MP-1, sebagai kontrol), (2) medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 10 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l IAA, dan 3% sukrosa (MP-2), (3) medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 10 mg/l pikloram, 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l IAA, dan 3% sukrosa (MP-3), (4) medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 25 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 2,5 mg/l IAA, dan 2% sukrosa (MP-4), (5) medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 25 mg/l pikloram, 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BA, 2,5 mg/l IAA, dan 2% sukrosa (MP-5), dan (6) medium  $\frac{1}{4}$  MS yang mengandung 5 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l IAA, dan 1% sukrosa (MP-6).

Jenis eksplan (JE) yang digunakan ialah (1) daun muda dari tunas pucuk (JE-1), (2) daun muda dari tunas muda (JE-2), (3) nodus tangkai bunga (JE-3), dan akar muda (JE-4). Eksplan yang digunakan dipanen dari klon-klon *Vanda* dengan kemampuan regenerasi yang relatif sama (hasil percobaan 1). Eksplan disubkultur setiap 1 bulan sekali pada medium yang sama hingga

dua kali subkultur (2 bulan). Setelah 2 bulan inkubasi, kalus yang teregenerasi disubkultur pada medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 0,25 mg/l BAP dan 1% sukrosa.

#### **Pengaruh Kombinasi Konsentrasi 2,4-D-TDZ dan Kondisi Inkubasi dalam Embriogenesis Klon-klon *Vanda***

Media dasar yang digunakan ialah medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l IAA, dan 3% sukrosa. Kombinasi konsentrasi 2,4-D-TDZ (KK) yang diuji dalam percobaan ini ialah (1) 10 mg/l 2,4-D dan 1 mg/l TDZ (KK-1), (2) 7,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l TDZ (KK-2), (3) 5 mg/l 2,4-D dan 2,5 mg/l TDZ (KK-3), dan (4) 2,5 mg/l 2,4-D dan 5 mg/l TDZ (KK-4), sedangkan kondisi inkubasi (KI) yang diuji ialah (1) eksplan diinkubasi dan disubkultur dalam ruang gelap secara terus-menerus (KI-1), (2) eksplan diinkubasi dan disubkultur dua kali dalam ruang gelap, subkultur dua kali dalam ruang dengan intensitas cahaya rendah ( $\pm 5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), dan ke cahaya normal ( $\pm 25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) (KI-2), dan (3) eksplan diinkubasi dan subkultur sekali dalam ruang gelap, kemudian disubkultur dalam ruang inkubasi terang dengan  $\pm 25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (KI-3). Eksplan disubkultur setiap 15 hari sekali pada medium yang sama hingga empat kali subkultur (2 bulan). Setelah 2 bulan inkubasi, kalus yang teregenerasi disubkultur pada medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung 0,25 mg/l BAP dan 1% sukrosa.

Rancangan percobaan yang digunakan pada percobaan pertama ialah acak kelompok (RAK) dan ketiga percobaan lainnya menggunakan RAK pola faktorial dengan tiga kali ulangan. Tiap perlakuan terdapat delapan eksplan yang dikultur.

Parameter yang diamati dalam percobaan ini ialah (1) persentase kontaminasi eksplan (%), (2) persentase pencoklatan eksplan, (3) persentase pembentukan kalus (%). Pembentukan kalus dengan skor – sampai dengan ++++, di mana – tidak ada pembentukan kalus, +, pembentukan kalus berkisar antara 1–25% dari total luas eksplan; ++, pembentukan kalus berkisar antara 26–50% dari total luas eksplan; +++, pembentukan kalus berkisar antara 51–75% dari total luas eksplan, dan ++++, pembentukan kalus lebih dari 75% dari total luas eksplan, dan (4) jumlah embrio per eksplan pada tahap globular. Pengamatan secara periodik setiap 1–2 hari sekali dilakukan untuk mengamati perubahan dan pertumbuhan eksplan yang terjadi selama percobaan berlangsung. Semua parameter diamati 2 bulan setelah kultur.

#### **Pengaruh Media terhadap Perkecambah Embrio Klon-klon *Vanda***

Medium KK-4 (1/2 MS yang ditambah dengan 2,5 mg/l 2,4-D, 5 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, dan 1,0 mg/l



IAA) merupakan medium optimal untuk pembentukan embrio. Medium tersebut diperbaiki dengan menurunkan dan menghilangkan konsentrasi beberapa hormon secara bertahap. Media perkecambahan (MK) yang digunakan ialah (1) 1/2 MS yang ditambah dengan 2,5 mg/l 2,4-D, 5 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, dan 1,0 mg/l IAA (MK-1), (2) 1/2 MS yang ditambah dengan 1,25 mg/l 2,4-D, 2,5 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, dan 0,5 mg/l IAA (MK-2), (3) 1/2 MS yang ditambah dengan 0,63 mg/l 2,4-D, 1,25 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, dan 0,25 mg/l IAA (MK-3), 1/2 MS yang ditambah dengan 0,5 mg/l BAP dan 0,13 mg/l IAA (MK-4), dan medium *New Phalaenopsis* (NP) yang ditambah dengan 0,5 mg/l BAP (MK-5). MP-5 diuji karena berhasil digunakan untuk regenerasi embrio yang sulit/lambat berkecambah pada embrio *Phalaenopsis*.

Rancangan percobaan yang digunakan ialah acak lengkap dengan tiga kali ulangan. Tiap perlakuan terdiri dari dua botol. Tiap botol berisi  $\pm$  20 embrio yang berada pada tahap akhir globular atau koleoptilar.

Parameter yang diamati ialah (1) persentase pencoklatan embrio serta (2) persentase perkecambahan embrio dan jumlah kecambah per perlakuan. Pengamatan harian dilakukan untuk mengetahui perubahan-perubahan yang terjadi selama percobaan berlangsung. Pengambilan data akhir dilakukan 3 bulan setelah kultur.

Analisis data yang terkumpul selama percobaan menggunakan analisis varian (ANOVA) dengan pengolah data SAS Release Window 9.1. Jika terdapat perbedaan nyata antarperlakuan, maka nilai rerata perlakuan diuji lanjut menggunakan uji Tukey taraf 5% (Mattjik & Sumertajaya 2006).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Studi Kemampuan Klon-klon *Vanda* Membentuk Kalus Embriogenik

Hasil penelitian menunjukkan bahwa setiap klon hasil persilangan *V. tricolor* x [(*V. Patao* x *V. Jenny*) x *Ascocenda* Peggy Foo] memiliki kemampuan pembentukan kalus yang berbeda. Kemampuan pembentukan kalus dari klon-klon yang diuji berkisar antara 0–38% dengan skor pembentukan kalus dari – sampai dengan ++++. Dari 18 klon yang diuji terlihat bahwa hanya tujuh klon yang mempunyai kemampuan pembentukan kalus yang hampir sama, yaitu klon V2-17, V2-21, V2-43, V2-10-1, V2-10-2, V2-2010-1, dan V2-2010-3 (Gambar 1A-1D). Klon-klon tersebut memiliki persentase pembentukan kalus mencapai 25–38% dengan skor pembentukan kalus +++/++++ (Tabel 1). Pada studi awal pembentukan kalus terjadi

mulai 1,5–2,5 bulan setelah kultur (BSK). Kalus yang terbentuk umumnya tumbuh lambat dan mencapai ukuran 0,3–0,5 cm pada 3–4 BSK dan dominan ialah kalus kompak dan organogenik (Gambar 1A). Klon dengan kemampuan regenerasi yang hampir sama selanjutnya digunakan pada percobaan berikutnya.

### Pengaruh Media dan Teknik Sterilisasi Eksplan dalam Pembentukan Kalus Embriogenik *Vanda*

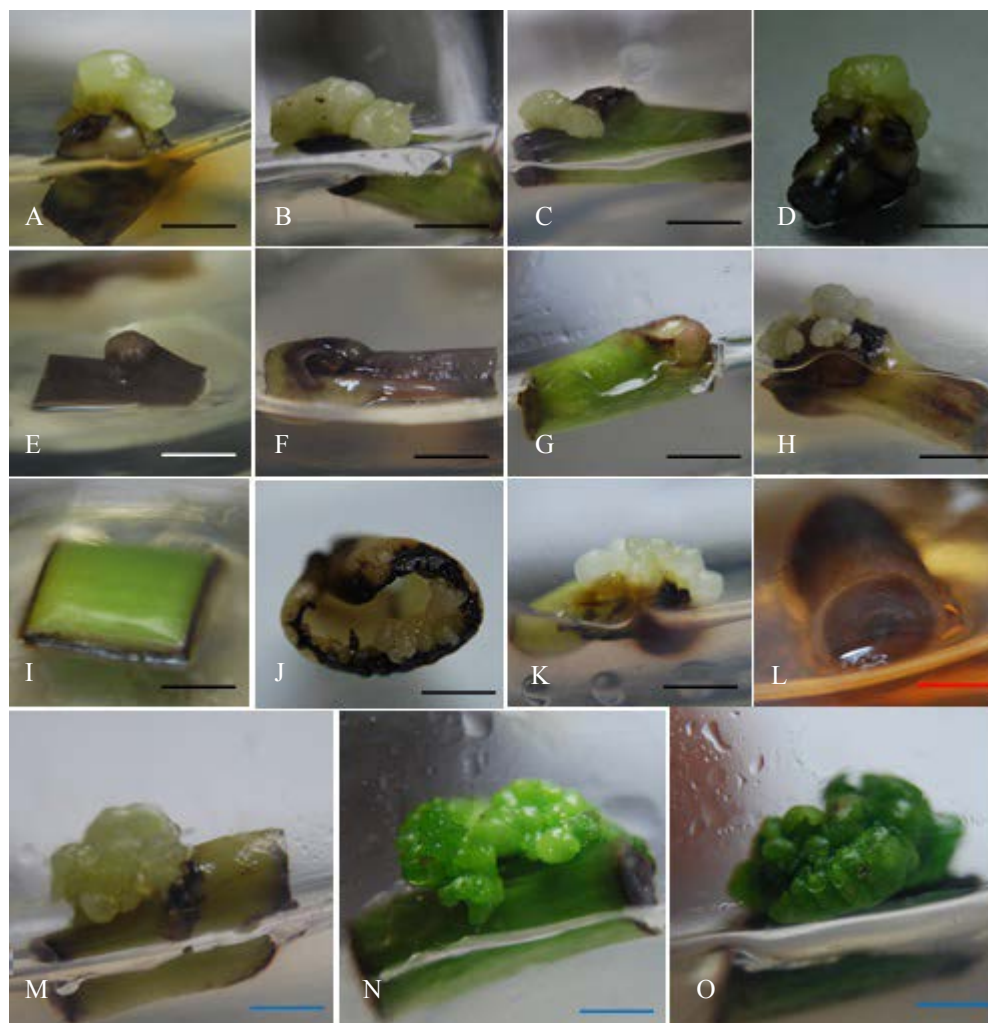
Dari pengamatan selama inkubasi eksplan diketahui eksplan mulai membentuk kalus 1,5–2,0 BSK. Kalus terus tumbuh dan mencapai ukuran 0,3–0,5 cm pada 3,5 BSK. Respons pertumbuhan eksplan terbaik umumnya terlihat pada eksplan yang disterilisasi menggunakan teknik sterilisasi 3 (larutan HgCl<sub>2</sub> 0,05% (10 menit), bilas dengan air steril 5–6 kali masing-masing 5 menit) dan dikultur pada medium MI-5 (medium 1/2 MS yang ditambah dengan 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BA, dan 2% sukrosa). Sementara eksplan yang disterilisasi menggunakan kloroks sebagai desinfektan umumnya mengalami pencoklatan dan mati.

Hasil analisis statistik diketahui bahwa perlakuan media dan teknik sterilisasi eksplan memberi pengaruh yang signifikan terhadap keberhasilan kultur *in vitro* klon-klon *Vanda*, namun kedua perlakuan tersebut tidak menunjukkan pengaruh interaksinya. Pada perlakuan media terlihat bahwa media MI-5 merupakan medium yang paling sesuai untuk menunjang keberhasilan kultur *in vitro* *Vanda*. Medium tersebut memiliki persentase pembentukan kalus eksplan dan jumlah embrio per eksplan tertinggi dan berbeda nyata dengan media yang lain (Tabel 2), sedangkan TS berbasis merkuri klorida (HgCl<sub>2</sub>) merupakan teknik sterilisasi eksplan yang paling optimal dibanding teknik lain. Perlakuan tersebut mampu mereduksi kontaminasi hingga 15% dan pencoklatan eksplan 11%, serta meningkatkan persentase regenerasi hingga 13% dengan jumlah embrio per eksplan mencapai 1,1 (Tabel 3, Gambar 1G, dan 1H). Teknik sterilisasi berbasis NaOCl umumnya menstimulasi kerusakan sel dan jaringan tanaman lebih parah, meningkatkan pencoklatan eksplan dengan kematian eksplan mencapai 100% (Gambar 1E dan 1F).

### Pengaruh Media Perbaikan dan Jenis Eksplan terhadap Keberhasilan Embriogenesis Klon-klon *Vanda*

Perbaikan medium MI-5 (medium 1/2 MS yang ditambah dengan 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BA, dan 2% sukrosa) yang dilakukan dengan mengubah auksin, sukrosa, dan konsentrasinya untuk menguji respons beberapa eksplan yang berbeda memberikan pengaruh yang signifikan dalam embriogenesis klon-klon *Vanda*. Perubahan tersebut menstimulasi pembentukan kalus





**Gambar 1.** Variasi hasil studi embriogenesis klon-klon *Vanda Balithi*, (A-D) kondisi kalus hasil inisiasi pada beberapa klon *Vanda Balithi* (V2-17, V2-10-2, V2-2010-1, dan V2-2010-3) yang memiliki kemampuan pembentukan kalus yang hampir sama, (E) kondisi eksplan pascasterilisasi menggunakan TS-1, (F) kondisi eksplan pascasterilisasi dengan TS-2, (G) kondisi eksplan pascasterilisasi dengan TS-3, (H) kalus embriogenik pada eksplan yang disterilisasi dengan TS-3, (I) eksplan daun dari pucuk tanaman induk, membengkak tetapi tidak membentuk kalus, (J) daun muda dari tunas muda dengan kalus embriogenik/embrio, (K) tangkai bunga dengan kalus embriogenik/embrio, (L) akar yang mengalami pencoklatan dan akhirnya mati, (M) kalus embriogenik dari tangkai bunga yang diinkubasi pada kondisi gelap terus menerus (KI-1), (N) kalus embriogenik dari tangkai bunga yang tumbuh lebih cepat pada kondisi inkubasi cahaya rendah (KI-2), dan (O) kalus embriogenik dari tangkai bunga yang tumbuh pada kondisi inkubasi terang (KI-3). (Result variation of study on embryogenesis of Balithi Vanda clones. (A-D) callus condition resulted from initiation step on several Balithi Vanda clones (V2-17, V2-10-2, V2-2010-1 and V2-2010-3) having almost similar in regeneration capacity, (E) explant condition after sterilization using TS-1, (F) explant condition after sterilization using TS-2, (G) explant condition after sterilization using TS-3, (H) embryogenic calli derived from explant sterilized by TS-3, (I) leaf explant from donor plant tip, swollen but no callus formation, (J) embryogenic calli/embryos derived from young leaf harvested from young lateral shoot, (K) embryogenic calli/embryos derived from inflorescenc node, (L) browning on root explant leading to death of the explant, (M) embryogenic calli from inflorescenc node incubated in dark condition continuously (KK-1), (N) embryogenic calli from inflorescenc node incubated in low light intensity condition (KK-2), and (O) embryogenic calli from inflorescenc node incubated in normal light intensity condition (KK-3)). Bar hitam (black bars) = 0,5 cm, bar putih (white bar) = 0,4 cm, bar merah (red bar) = 0,27 cm, bar biru (blue bars) = 0,62 cm

embriogenik yang lebih cepat, terutama pada eksplan yang berasal dari daun muda yang dipanen dari tunas dan tangkai bunga. Kalus embriogenik mulai terbentuk 25–35 HSK. Kalus terus bertumbuh dan

mencapai ukuran 0,5 cm 2 BSK. Jumlah embrio yang dihasilkan bervariasi dari 1–25 embrio per eksplan. Embrio yang diamati pada tahap ini berada pada tahap globular.



**Tabel 1. Perbedaan kemampuan pembentukan kalus klon-klon *Vanda* hasil persilangan *V. tricolor* x [(*V. Patao* x *V. Jenny Hashimoto*) x *Ascocenda Peggy Foo*] dalam kultur *in vitro* (Different *in vitro* callus formation capacity of *Vanda* clones derived from hybridization of *V. tricolor* x [(*V. Patao* x *V. Jenny Hashimoto*) x *Ascocenda Peggy Foo*])**

Klon <i>Vanda</i> ( <i>Vanda</i> clones)	Persentase pembentukan kalus (Percentage of callus formation), %	Skor pembentukan kalus (Score of callus formation)
V2-8	16,0 cd	+ / ++
V2-12	0 e	-
V2-14	0 e	-
V2-17	24,5 abc	++ / +++
V2-19	0 e	-
V2-21	19,0 bcd	+++
V2-23	0 e	-
V2-35	0 e	-
V2-37	0 e	-
V2-39	0 e	-
V2-43	28,3 abc	++ / +++
V2-44	0 e	-
V2-51	0 e	-
V2-10-1	22,0 abc	+++
V2-10-2	25,3 abc	+++
V2-2010-1	25,0 abc	+++
V2-2010-3	31,5 a	+++ / ++++
V2-2010-4	9,8 de	- / +
KK (CV), %	17,12	

Jumlah eksplan yang dikultur dan diamati rerata ialah delapan eksplan. Dalam pengolahan statistik data ditransformasi menggunakan transformasi akar kuadrat (Gaspersz 1991). Eksplan yang digunakan adalah nodus tangkai bunga, kultur diulang tiga kali. Skor kalus dimulai dari - sampai dengan ++++, di mana - tidak ada pembentukan kalus; +, pembentukan kalus berkisar antara 1–25% dari total luas eksplan; ++, pembentukan kalus berkisar antara 26–50% dari total luas eksplan; +++, pembentukan kalus berkisar antara 51–75% dari total luas eksplan, dan ++++, pembentukan kalus lebih dari 75% dari total luas eksplan. (Number of explants cultured and observed in average was eight explants. Data were transformed using square root, the explant used in the study was flower nodes, the culture was repeated three times. Score of callus formation was - to ++++, where - there was no callus formation, + callus formed was between 1–26% from total area of explant, ++ callus formed was 26–50% from total area of explant, +++ callus formed was 51–75% from total area of explant, and ++++ callus formed was more than 75% from total area of explant). Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji tukey taraf 5% (Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on tukey test (p=0.05))

**Tabel 2. Pengaruh media terhadap keberhasilan induksi kalus embriogenik *Vanda* (Effect of media on success of embryogenic callus induction of *Vanda*)**

Medium (Medium)	Persentase eksplan (Percentage of explant), %			Jumlah embrio per eksplan (Number of embryo per explant)
	Kontaminasi (Contamination)	Pencoklatan (Browning)	Pembentukan kalus (Callus formation)	
M-1	56,3 a	44,0 a	2,2 c	0,0 b
M-2	54,3 a	50,2 a	6,5 bc	0,0 b
M-3	56,5 a	50,3 a	8,7 abc	0,0 b
M-4	48,2 a	39,8 a	15,0 ab	0,6 b
M-5	56,5 a	50,3 a	16,8 a	2,9 a
KK (CV), %	13,59	15,15	16,60	18,55

Embrio yang dihitung berada pada tahap globular. Data yang tidak menyebar normal ditransformasi menggunakan akar kuadrat. MI-1, medium VW ditambah dengan 10% air kelapa (Embryo wick calculate be on globular level. The data wick not normal spread was transformed using square root. MI-1, vw medium added with 10% of coconut water)

Perlakuan media perbaikan dan jenis eksplan memberikan pengaruh yang nyata terhadap keberhasilan embriogenesis klon-klon *Vanda*. Pengaruh interaksi kedua perlakuan juga terlihat nyata pada jumlah embrio yang dihasilkan dimana jenis eksplan memberikan pengaruh yang lebih besar dibanding media perbaikan.

MP-2 (medium ½ MS yang mengandung 10 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l

IAA, dan 3% sukrosa) merupakan medium terbaik dalam embriogenesis klon-klon *Vanda* dan berbeda nyata dengan medium yang lain. Medium tersebut menunjukkan persentase kontaminasi eksplan terendah (6%), dan persentase regenerasi tertinggi (12%) dengan jumlah embrio per eksplan mencapai 7,7 embrio (Tabel 4). Daun yang diambil dari tunas muda merupakan jenis eksplan yang menunjukkan



**Tabel 3. Pengaruh teknik sterilisasi terhadap keberhasilan induksi kalus embriogenik Vanda (Effect of sterilization techniques on success of embryogenic callus induction of Vanda)**

Teknik sterilisasi (Sterilization technique)	Persentase eksplan (Percentage of explant), %			Jumlah embrio per eksplan (Number of embryo per explant)
	Kontaminasi (Contamination)	Pencoklatan (Browning)	Pembentukan kalus (Callus formation)	
TS-1	93,8 a	85,3 a	2,6 b	0,3 a
TS-2	51,6 b	42,3 b	10,9 a	0,7 a
TS-3	14,7 c	11,0 c	13,4 a	1,1 a
KK (CV), %	13,59	15,15	16,60	18,55

**Tabel 4. Pengaruh media terhadap keberhasilan induksi kalus embriogenik Vanda (Effect of media on success of embryogenic callus induction of Vanda)**

Medium perbaikan (Improved-medium) (MP)	Persentase eksplan (Percentage of explant), %			Jumlah embrio per eksplan (Number of embryo per explant)
	Kontaminasi (Contamination)	Pencoklatan (Browning)	Pembentukan kalus (Callus formation)	
MP-1	10,6 a	29,5 a	7,8 ab	2,2 b
MP-2	5,8 a	27,6 a	11,8 a	7,7 a
MP-3	13,8 a	29,3 a	6,3 ab	1,4 bc
MP-4	7,8 a	32,0 a	4,3 b	0,7 bc
MP-5	9,4 a	31,4 a	3,3 b	0,0 c
MP-6	11,4 a	29,4 a	2,1 b	0,0 c
KK (CV), %	19,34	18,01	18,52	15,99

**Tabel 5. Pengaruh jenis eksplan terhadap keberhasilan induksi kalus embriogenik Vanda (Effect of explants types on success of embryogenic callus induction of Vanda)**

Jenis eksplan (Explant types)	Persentase eksplan (Percentage of explant), %			Jumlah embrio per eksplan (Number of embryo per explant)
	Kontaminasi (Contamination)	Pencoklatan (Browning)	Pembentukan kalus (Callus formation)	
JE-1	3,7 b	3,3 b	0,0 b	0,0 b
JE-2	16,7 a	9,2 b	12,5 a	3,4 a
JE-3	11,2 ab	9,0 b	11,2 a	4,6 a
JE-4	7,6 b	98,0 a	0,0 b	0,0 b
KK (CV), %	19,34	18,01	18,52	15,99

Embrio yang dihitung berada pada tahap globular. Data yang tidak menyebar normal ditransformasi menggunakan akar kuadrat. JE-1, daun muda dari tunas pucuk, JE-2, daun muda dari tunas muda, JE-3, nodus tangkai bunga, dan JE-4, akar muda (*Embryos calculated in the stage were in globular stage. Abnormal distribution of data was transformed using square root. JE-1, young leaves from terminal shoots, JE-2, young leaves from lateral shoots, JE-3, nodus from flower stalk, and JE-4, young roots*)

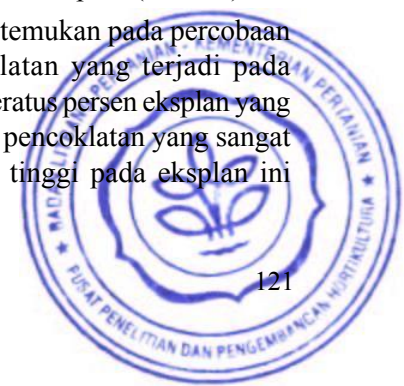
**Tabel 6. Pengaruh interaksi jenis eksplan dan media perbaikan terhadap jumlah embrio per eksplan (Interaction effect of explant types and improved media on number of embryos produced per explant)**

Media perbaikan (Improved-medium) MP	Jenis eksplan (Explant type)			
	JE-1	JE-2	JE-3	JE-4
MP-1	0,0 a	4,3 b	4,5 b	0,0 a
MP-2	0,0 a	12,8 a	18,0 a	0,0 a
MP-3	0,0 a	2,5 bc	3,3 b	0,0 a
MP-4	0,0 a	1,0 c	1,8 b	0,0 a
MP-5	0,0 a	0,0 c	0,0 b	0,0 a
MP-6	0,0 a	0,0 c	0,0 b	0,0 a
KK (CV), %	-	18,81	20,00	-

Data yang tidak menyebar normal ditransformasi menggunakan akar kuadrat (*Abnormal distribution of data was transformed using square root*)

persentase regenerasi tertinggi, namun jumlah embrio per eksplan tertinggi ditunjukkan oleh eksplan yang berasal dari tangkai bunga (Tabel 5, Gambar 1J dan 1K). Daun muda yang dipanen dari tunas pucuk tanaman induk, kontaminasi rendah, membengkak, tetapi tidak membentuk kalus (Gambar 1I), sedangkan tangkai bunga yang dikultur pada MP-2 menunjukkan kombinasi terbaik dalam menghasilkan jumlah embrio tertinggi dengan 18 embrio per eksplan (Tabel 6).

Hal menarik yang juga ditemukan pada percobaan ini ialah tingginya pencoklatan yang terjadi pada eksplan akar (Gambar 1L). Seratus persen eksplan yang berasal dari akar mengalami pencoklatan yang sangat parah. Produksi fenol yang tinggi pada eksplan ini





**Tabel 7. Pengaruh kombinasi konsentrasi 2,4-D-TDZ terhadap keberhasilan induksi kalus embriogenik *Vanda* (Effect of 2.4-D-TDZ combination concentrations on success of embryogenic callus induction of *Vanda*)**

Kombinasi konsentrasi 2,4-D-TDZ (2.4-D-TDZ combination concentration) (KK)	Waktu pembentukan kalus (Time of callus formation) Hari (Days)	Persentase pembentukan kalus (Percentage of callus formation), %	Jumlah embrio per eksplan (Number of embryo per explant)
KK-1	29,2 b	21,1 b	4,3 c
KK-2	36,4 a	14,9 b	2,3 c
KK-3	29,6 b	22,1 b	7,6 b
KK-4	20,5 c	32,6 a	14,0 a
KK (CV), %	11,70	17,83	13,55

**Tabel 8. Pengaruh kondisi inkubasi terhadap keberhasilan induksi kalus embriogenik *Vanda* (Effect of incubation condition on success of embryogenic callus induction of *Vanda*)**

Kondisi inkubasi (Condition of incubation) (KI)	Waktu pembentukan kalus (Time of callus formation) Hari (Days)	Persentase pembentukan kalus (Percentage of callus formation), %	Jumlah embrio per eksplan (Number of embryo per explant)
KI-1	29,1 a	20,6 a	5,9 b
KI-2	29,8 a	22,2 a	9,8 a
KI-3	27,8 a	25,2 a	5,4 b
KK (CV), %	11,70	17,83	13,55

**Tabel 9. Pengaruh interaksi kombinasi konsentrasi 2,4-D-TDZ dan kondisi inkubasi terhadap jumlah embrio per eksplan (Interaction effect of combination concentration of 2.4-D-TDZ and incubation condition on number of embryos produced per explant)**

Kondisi inkubasi (Condition of incubation) (KI)	Kombinasi konsentrasi 2,4-D-TDZ (Combination concentration of 2.4-D-TDZ) (KK)			
	KK-1	KK-2	KK-3	KK-4
KI-1	4,0 b	2,8 a	5,8 b	11,3 b
KI-2	5,8 a	2,8 a	10,8 a	20,0 a
KI-3	3,0 b	1,5 a	6,3 b	10,8 b
KK (CV), %	9,35	21,88	12,73	10,55

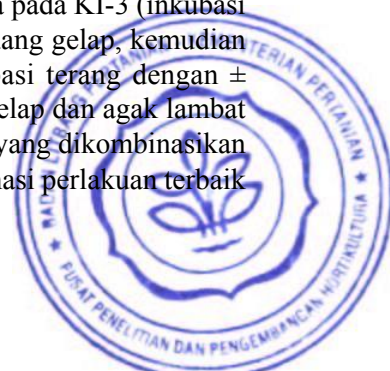
umumnya mulai teramati 2 jam setelah kultur. Produksi fenol yang tinggi dan diikuti oleh pencoklatan yang terjadi pada seluruh bagian eksplan dapat diamati 5 hari setelah kultur (HSK). Fenol yang dihasilkan pada eksplan ini umumnya didifusikan ke dalam medium dan menyebabkan perubahan warna media dari bening ke coklat muda, coklat tua, dan hitam.

**Pengaruh Kombinasi Konsentrasi 2,4-D-TDZ dan Kondisi Inkubasi terhadap Embriogenesis Klon-klon *Vanda***

Optimasi kombinasi konsentrasi 2,4-D-TDZ pada medium MP-2 memberi pengaruh yang besar dalam embriogenesis klon-klon *Vanda*. Pengaruh tersebut terlihat jelas pada perubahan waktu pembentukan kalus dan jumlah embrio yang dihasilkan. Pada percobaan ini kalus embriogenik mulai terbentuk 17–25 HSK. Kalus bertumbuh dalam bentuk dan ukuran dan menghasilkan embrio hingga 25 embrio per eksplan. Embrio yang diamati pada tahap ini berada pada tahap globular.

Kombinasi konsentrasi 2,4-D-TDZ dan kondisi inkubasi memberi pengaruh yang nyata terhadap keberhasilan embriogenesis klon-klon *Vanda*. Kedua

perlakuan tersebut juga memberikan pengaruh interaksi yang nyata pada jumlah embrio yang dihasilkan. KK-4 (2,5 mg/l 2,4-D dan 5 mg/l TDZ) merupakan kombinasi konsentrasi 2,4-D-TDZ yang optimal dalam embriogenesis *Vanda*. Perlakuan tersebut menstimulasi pembentukan kalus embriogenik lebih cepat, persentase regenerasi yang tertinggi dengan jumlah embrio per eksplan terbanyak (Tabel 7). Selanjutnya KI-2 (inkubasi dan subkultur dua kali dalam ruang gelap, subkultur dua kali dalam ruang dengan intensitas cahaya rendah ( $\pm 5 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ), dan ke cahaya normal ( $\pm 25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ )) merupakan kondisi inkubasi yang sesuai untuk pertumbuhan kalus embriogenik dalam membentuk embrio. Perlakuan ini mampu menstimulasi pembentukan embrio hingga 9,8 embrio dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain (Tabel 8). Pertumbuhan kalus embriogenik pada KI-1 (ruang gelap secara terus-menerus) putih pucat dan lambat (Gambar 1M), sementara pada KI-3 (inkubasi dan subkultur satu kali dalam ruang gelap, kemudian disubkultur dalam ruang inkubasi terang dengan  $\pm 25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ) berwarna hijau gelap dan agak lambat (Gambar 10), sedangkan KK-4 yang dikombinasikan dengan KI-2 merupakan kombinasi perlakuan terbaik



**Tabel 10. Pengaruh media terhadap perkecambahan embrio klon Vanda (Effect of medium on germinating embryos of Vanda clones)**

Media (Medium)	Pencoklatan embrio (Embryo browning), %	Perkecambahan embrio (Germinated embryos), %	Jumlah embrio berkecambah (Number of germinated embryos)
MP-1	42,3 a	12,7 d	3,0 d
MP-2	29,7 b	27,7 c	8,3 c
MP-3	18,7 bc	41,7 b	10,7 c
MP-4	11,0 cd	58,3 a	14,0 b
MP-5	1,3 d	68,0 a	17,3 a
KK (CV), %	20,60	11,27	8,02

Keterangan (Notes): ½ MS yang ditambah dengan 2,5 mg/l 2,4-D, 5 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP dan 1,0 mg/l IAA (MP-1), ½ MS yang ditambah dengan 1,25 mg/l 2,4-D, 2,5 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP dan 0,5 mg/l IAA (MP-2), ½ MS yang ditambah dengan 0,63 mg/l 2,4-D, 1,25 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, dan 0,25 mg/l IAA (MP-3), ½ MS yang ditambah dengan 0,5 mg/l BAP dan 0,13 mg/l IAA (MP-4), dan medium *New Phalaenopsis* (NP) yang ditambah dengan 0,5 mg/l BAP (MP-5) (*Half-strength MS supplemented with 2.5 mg/l 2.4-D, 5 mg/l TDZ, 0.5 mg/l BAP and 1.0 mg/l IAA (MP-1), half-strength MS containing 1.25 mg/l 2.4-D, 2.5 mg/l TDZ, 0.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l IAA (MP-2), half-strength MS supplemented with 0.63 mg/l 2.4-D, 1.25 mg/l TDZ, 0.5 mg/l BAP and 0.25 mg/l IAA (MP-3), half-strength MS augmented with 0.5 mg/l BAP and 0.13 mg/l IAA (MP-4), and New Phalaenopsis (NP) containing 0.5 mg/l BAP (MP-5)*)

dengan jumlah embrio per eksplan mencapai 20 embrio (Tabel 9, Gambar 1N).

### Pengaruh Media terhadap Perkecambahan Embrio Klon Vanda

Perkecambahan embrio membentuk tunas berdaun mulai terlihat jelas 20–30 HSK, terutama pada embrio yang dikultur pada medium MP-5 dan MP-4. Embrio yang berkecambah terus bertumbuh hingga membentuk daun sempurna (2–4 daun) 2,5–3,0 BSK. Pencoklatan embrio merupakan hal penting yang diamati dalam percobaan ini. Pencoklatan embrio umumnya ditemukan pada embrio yang dikultur pada medium yang masih mengandung 2,4-D dan TDZ (MP-1, MP-2, dan MP-3). Pencoklatan umumnya mulai diamati 10–15 HSK. yang dimulai dari perubahan warna embrio dari hijau ke hijau kekuningan, hijau kekuningan menjadi kecoklatan, dan kemudian coklat tua/hitam sebagai indikator kematian embrio.

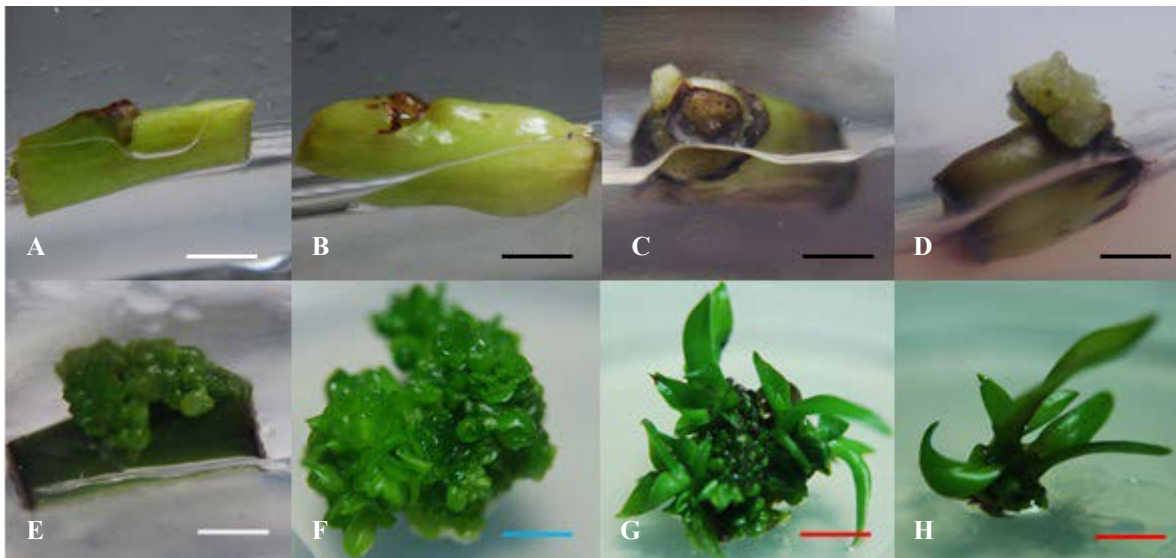
Perlakuan media memberi pengaruh yang nyata terhadap perkecambahan embrio. MP-5 merupakan medium perkecambahan embrio yang paling optimal. Medium tersebut mampu menekan pencoklatan turun hingga 1,3%, meningkatkan perkecambahan hingga 68% dengan jumlah embrio berkecambah mencapai 17,3 (Tabel 10). Medium dengan kemampuan yang hampir sama juga ditunjukkan oleh medium MP-4, sedangkan medium MP-1, MP-2, dan MP-3 yang masih mengandung 2,4-D dan TDZ memiliki pencoklatan eksplan dengan persentase yang tinggi. Perlakuan tersebut juga memiliki persentase perkecambahan dan jumlah embrio berkecambah yang rendah.

Embrio yang berkecambah dengan 2–4 daun selanjutnya disubkultur pada medium ½ MS atau NP yang ditambah dengan 0,25 mg/l BAP, atau medium ½ MS dengan konsentrasi vitamin yang digandakan. Pertumbuhan embrio berkecambah makin bertambah

besar dengan ukuran daun (panjang-lebar) dan tinggi tunas yang makin bertambah. Pertumbuhan tunas klon *Vanda* tergolong lambat. Pada 2 BSK, perubahan tunas hanya terlihat pada perubahan ukuran. Meski lambat, jumlah tunas dengan 2–4 daun makin bertambah. Tumbuhnya akar juga belum dapat diamati hingga tahap pembesaran tunas. Diduga pengakaran terjadi setelah beberapa kali subkultur.

Satu kenyataan bahwa persilangan dua tanaman induk menghasilkan segregasi turunan yang dihasilkan. Segregasi tersebut tidak hanya terlihat pada penampilan fenotip tanaman, pola pertumbuhan, warna, dan kondisi bunga yang dihasilkan, tetapi segregasi tersebut juga ditunjukkan oleh kemampuan regenerasi yang berbeda dari klon-klon *Vanda* hasil persilangan *V. tricolor* x [*V. Patao* x *V. Jenny Hashimoto*] x *Ascocenda Peggy Foo* dalam kultur *in vitro*. Perbedaan tersebut ditunjukkan oleh persentase regenerasi eksplan dan kemampuannya menghasilkan kalus. Variasi respons beberapa tanaman atau varietas dalam kultur *in vitro* banyak dilaporkan pada *Phalaenopsis* (Tokuhara & Mii 2001, 2003, Park et al. 2002, Liu et al. 2006, Chen et al. 2009, Gow et al. 2008, 2009). *Phalaenopsis* Reichentea dilaporkan memiliki kemampuan menghasilkan regeneran lebih tinggi (116 regeneran) dibanding *P. Littke Steve* (41 regeneran), *P. Wedding March* (40 regeneran), *P. Wedding Promenade* (36 regeneran), *P. Snow Parade* (21 regeneran), dan *P. Hanaboushin* (14 regeneran) (Tokuhara & Mii 2001), namun dalam pembentukan plb, *P. Snow Parade* lebih baik dibanding *P. Wedding Promenade* (Tokuhara & Mii 2003), *P. Tinny Sunshine Annie* dibanding *P. Taisuco Hatarot*, *P. Teipei Gold Golden Star*, dan *P. Tinny Galaxy Annie* (Park et al. 2002), *P. Hwa Feng Red Jewel* dibanding *Doritaenopsis Mount Beauty* dan *Dtp. Su's Red Lip* (Liu et al. 2006). Sementara dalam embriogenesis, *P. aphrodite* memiliki kemampuan embriogenesis





**Gambar 2.** Tahapan embriogenesis klon *Vanda Balithi*, (A) eksplan pada awal kultur, (B) eksplan yang membengkak 20–25 HSK, (C) kalus yang terbentuk 35–45 HSK, (D) pertumbuhan kalus embriogenik 50–65 HSK, (E) pertumbuhan kalus embriogenik 1,5–2 bulan pada inkubasi terang, (F) embrio berkecambah pada medium MK-5 1,5 BSK, (G) embrio berkecambah dengan 2–4 daun 3 BSK, dan (H) tunas yang telah disubkultur pada medium NP dengan 0,25 mg/l BAP 1 BSK dan mulai membentuk akar (*Embryogenesis steps of Vanda Balithi clones. (A) explant in initial culture, (B) swollen explant 20–25 days after culture, (C) callus formed 35–45 days after culture, (D) embryogenic callus growth 50–65 days after culture, (E) callus growth 1.5 months after light incubation, (F) germinated embryos 1.5 months after culture in MK-5 medium, (G) germinated-embryos with 2–4 leaves 3 months after culture, and (H) subcultured-shoot individually on NP medium containing 0.25 mg/l BAP 1 month after culture and starting to produce root.* Bar putih (white bars) = 0.5 cm, bar hitam (black bars) = 0.38 cm, bar biru (blue bar) = 0.25 cm, bar merah (red bars) = 0.3 cm

lebih baik dibanding *P. amabilis*, *P. gigantea*, *P. hieroglyphica*, *P. philippinensis*, *P. schilleriana*, *P. stuartiana*, dan *P. bellina* (Chen *et al.* 2009), dan *P. amabilis* lebih baik dibanding *P. nebula* (Gow *et al.* 2008, 2009).

Keberhasilan embriogenesis klon-klon *Vanda Balithi* dipengaruhi oleh teknik sterilisasi, jenis eksplan, kondisi inkubasi, dan jenis media yang digunakan. Aplikasi NaOCl pada konsentrasi 10, 5, dan 2% (formulasi) memberi pengaruh signifikan terhadap persentase kontaminasi, pencoklatan eksplan (nekrosis), dan respons eksplan dalam membentuk kalus embriogenik (Tabel 3). Perlakuan tersebut umumnya menimbulkan kerusakan dan stres eksplan yang lebih besar, namun memiliki kapasitas yang lebih rendah dalam membunuh kontaminan. Akibatnya persentase kontaminasi dan nekrosis lebih tinggi, sementara persentase regenerasi dan jumlah embrio yang dihasilkan lebih rendah dibanding perlakuan HgCl<sub>2</sub>. Hal tersebut menurut Moutia & Dookun (1999) disebabkan efek NaOCl yang bersifat racun terhadap sel tanaman, menyebabkan nekrosis hingga 100%,

dan kematian sel. Efek negatif NaOCl dalam kultur *in vitro* juga dilaporkan pada *Cedrus atlantica* Manetti & *C. libani* A. Rich (Renau-Morata *et al.* 2005), *Scrophularia takesimensis* (Sivanesan *et al.* 2008), dan *Rosa hybrida* (Razavizadeh & Ehsanpour 2008). Sementara 0,05% HgCl<sub>2</sub> merupakan desinfektan yang sesuai dalam embriogenesis klon-klon *Vanda Balithi*. Keberhasilan aplikasi HgCl<sub>2</sub> pada konsentrasi 0,1% juga dilaporkan pada *Renanthera imschootiana* (Seeni & Latha 1992), *V. pteris* (Begum *et al.* 2002), *V. spatulata* (Decruse *et al.* 2003), *V. corulea* (Seeni & Latha 2000, Malabadi *et al.* 2004, Lang & Han 2006), dan hibrida *Aerides vandarum* × *V. stangeana* (Kisor & Devi 2009).

Kontaminasi bakteri merupakan salah satu kendala kritical pada kultur *in vitro* klon-klon *Vanda Balithi*. Menurut Kulkarni *et al.* (2007) kontaminasi oleh bakteri ini merupakan masalah serius dalam kultur *in vitro* tanaman. Bakteri kontaminan dalam kultur *in vitro* umumnya berasal dari famili *Enterobacteriaceae* dan genus *Bacillus* (Moutia & Dookun 1999). Bakteri tersebut ialah bakteri gram negatif pembentuk spora



yang jumlahnya mencapai 60% (Hauwe & Swennen 1999), contohnya ialah *Bacillus circulans* (Morino et al. 2009), sedangkan pencoklatan atau klorosis pada penelitian ini merupakan dampak stres akibat efek racun NaOCl. Stres tersebut menyebabkan produksi senyawa fenolik eksplan meningkat (Tabiyeh et al. 2005), dengan adanya oksigen senyawa tersebut diubah menjadi senyawa quinon (Ozygit et al. 2007, Arnaldos et al. 2008) dengan adanya enzim polifenoloksidase (Laukkanen et al. 1999, Huang et al. 2002) atau fenilalanin amonia lyase (Tabiyeh et al. 2005). *Cathecol* diubah menjadi o-benzoquinon, hidroquinon à p-benzoquinon, tyrosin à melanin, cystein à cystein-quinon dan lain-lain (Marshall et al. 2000). Senyawa-senyawa tersebut bersifat racun dan menyebabkan terhentinya pergerakan protoplasma sel (Stom et al. 2006). Terhentinya pergerakan protoplasma ini berarti terhentinya juga suplai bahan-bahan subseluler penting penunjang aktivitas kehidupan sel, akibatnya sel/jaringan/eksplan mengalami kematian.

Variasi jenis eksplan, variasi respons embriogenesis/morfogenesisnya (Sharma & Rajam 1996, Teng 1999, Leng et al. 2004, Mitchell et al. 2006). Hal ini juga dibuktikan dalam kultur *in vitro* klon-klon *Vanda* Balithi. Tangkai bunga dan daun muda dari tunas merupakan eksplan yang paling potensial dalam embriogenesis klon-klon tersebut dibanding daun muda dari tanaman induk dan akar. Hipokotil lebih baik dibanding kotiledon dan daun dalam kultur *in vitro* *Solanum tuberosum* (Sharma & Rajam 1996). Tangkai bunga lebih baik dibanding daun dan akar dalam kultur *in vitro* *Dionaea muscipula* (Teng 1999). Eksplan nodus tanaman *in vitro* *Spilanthes acmella* lebih baik dibanding tunas pucuk (Leng et al. 2004). Meristem pucuk lebih baik dibanding umbi dan potongan batang dalam kultur *in vitro* *Diocorea cayenensis*, *D. rotundata*, dan *D. trifida* (Mitchell et al. 2006).

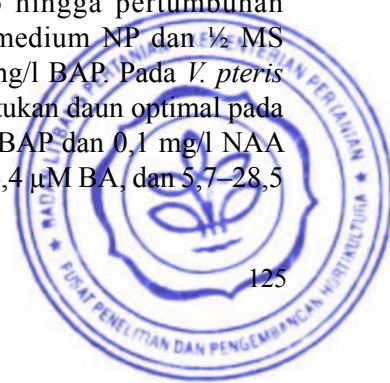
Media kultur yang memiliki peran penting dalam menunjang keberhasilan kultur *in vitro* tanaman juga terbukti dalam studi ini. Medium ½ MS yang ditambah dengan 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BA, dan 2% sukrosa (M-5) merupakan medium potensial dalam embriogenesis klon-klon *Vanda* Balithi. Medium M-5 tersebut diperbaiki kapasitas embriogenesisnya melalui penambahan 10 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l IAA, dan peningkatan konsentrasi sukrosa dari 2% menjadi 3% (MP-2). Perbaikan berikutnya dilakukan dengan mengurangi konsentrasi 2,4-D dari 10 mg/l menjadi 2,5 mg/l dan meningkatkan konsentrasi TDZ dari 1,0 mg/l menjadi 5 mg/l (KK-4). Perubahan tersebut berpengaruh besar terhadap kecepatan dan kemampuan medium dalam menginduksi kalus

embriogenik dan pembentukan embrionya (Tabel 7, 8, dan 9). Modifikasi dan perbaikan medium kultur untuk mendapatkan respons eksplan yang lebih baik juga dilakukan pada kultur *in vitro* *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. dan *Dendrobium nobile* Lindl (Nayak et al. 2002), *D. Chiangmai Pink* (Chung et al. 2005), *D. Sonia* (Martin & Madassery 2006), *V. pteris* (Begum et al. 2002), *V. corulea* (Malabadi et al. 2004), *V. testacea* (Kaur & Bhutani 2009), *Phalaenopsis Little Steve* (Kuo et al. 2005), serta *P. amabilis* dan *P. nebula* (Gow et al. 2008).

Medium ½ MS yang mengandung 2,5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l IAA, 5 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, dan 3% sukrosa merupakan medium optimal untuk embriogenesis klon-klon *Vanda* Balithi. Sementara medium MS yang ditambah 2 mg/l BA, 1 mg/l NAA, dan 3% sukrosa optimal untuk *V. pteris* (Begum et al. 2002), medium Mitra yang ditambah 44,4 µM BA dengan 17,1 atau 28,5 µM IAA dan 2% sukrosa pada *V. spatulata* (Decruse et al. 2003), medium Vacin & Went yang ditambah 11,35 µM TDZ dan 3% sukrosa untuk *V. corulea* (Malabadi et al. 2004), medium Mitra yang ditambah 1 mg/l BAP dengan/atau tanpa ditambah 1 mg/l NAA untuk *V. testacea* (Kaur & Bhutani 2009) dan medium MS yang ditambah 2 mg/l TDZ dan 2% sukrosa untuk hibrida *Aerides vandarum* × *V. stangeana* (Kisor & Devi 2009).

Kondisi inkubasi 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas 25–50 µmol/m<sup>2</sup>/s pada suhu 25±2°C (Seeni & Latha 1992, 2000, Decruse et al. 2003, Kaur & Bhutani 2009) dan 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas 100 µmol/m<sup>2</sup>/s pada suhu 25±2°C dan kelembaban 55–60% (Malabadi et al. 2004) yang berhasil diaplikasikan dalam kultur *in vitro* *V. corulea*, *V. spatulata*, *V. testacea*, dan hibrid *Aerides vandarum* × *V. stangeana* tidak berpengaruh signifikan terhadap embriogenesis klon-klon *Vanda* Balithi. Inkubasi eksplan klon-klon tersebut pada kondisi terang dapat menyebabkan tingginya insiden pencoklatan eksplan, bahkan pada eksplan yang berasal dari akar, pencoklatan mulai terjadi 1–2 jam setelah kultur dan senyawa fenolik yang teroksidasi segera didifusikan ke dalam media kultur. Kondisi inkubasi yang sesuai untuk embriogenesis klon-klon tersebut ialah kondisi gelap (1,5 bulan) pada tahap inisiasi kalus embriogenik dan kondisi dengan intensitas cahaya rendah (1 bulan) untuk regenerasi embrionya (KI-2, Tabel 9).

Perkecambahan embrio hingga pertumbuhan lanjut tunas optimal pada medium NP dan ½ MS yang ditambah dengan 0,5 mg/l BAP. Pada *V. pteris* perkecambahan dan pembentukan daun optimal pada medium MS dengan 2 mg/l BAP dan 0,1 mg/l NAA (Begum et al. 2002), 22,2–44,4 µM BA, dan 5,7–28,5



$\mu\text{M}$  IAA pada medium Mitra sesuai untuk *V. spatulata* dan 1,0 mg/l BAP untuk *V. testacea* (Kaur & Bhutani 2009). Mempertahankan kultur embrio untuk tujuan perkecambah pada medium dengan 2,4-D dan TDZ justru menurunkan persentase perkecambah, jumlah embrio berkecambah, namun meningkatkan persentase pencoklatan dan kematian embrio. Pencoklatan embrio dan tunas pada tahap ini diduga juga disebabkan oleh munculnya senyawa fenolik yang bersifat racun terhadap embrio, seperti yang juga dilaporkan Vendrame *et al.* (2007) pada *Doritaenopsis*. Oksidasi senyawa fenolik tersebut menyebabkan pencoklatan dan kematian eksplan (Mulgund *et al.* 2011). Pengaruh yang sama juga dilaporkan pada *Paphiopedilum philippense* (Chen *et al.* 2004), *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *D. aphyllum* (Roxb.) Fisch. dan *D. moschatum* (Buch-Ham) Sw. (Nayak *et al.* 1997). Pada penelitian Nayak *et al.* (1997) tersebut penggunaan TDZ di atas konsentrasi 4,5  $\mu\text{M}$  menghambat pertumbuhan, perkembangan, dan pencoklatan tunas. Pada *Xenikophyton smeeanum*, konsentrasi TDZ lebih dari 22,7  $\mu\text{M}$  menyebabkan pencoklatan embrio dan kematian embrio hingga 100% (Mulgund *et al.* 2011). Dari penelitian ini aplikasi hormon 2,4-D dan TDZ setelah pembentukan embrio untuk perkecambahan dan regenerasi tunas tidak disarankan.

Subkultur embrio bertunas pada medium NP yang mengandung 0,25 mg/l BAP menstimulasi pertumbuhan tunas dengan penampilan yang lebih baik. Tunas tumbuh baik dengan 3–4 daun. Pembentukan akar mulai terbentuk 1 BSK. Saat ini tunas dengan akar yang terus bertumbuh jumlahnya terus bertambah.

## KESIMPULAN DAN SARAN

1. Embriogenesis klon-klon *Vanda* Balithi nyata dipengaruhi oleh genotip, teknik sterilisasi, jenis eksplan, kombinasi konsentrasi 2,4-DTZ, kondisi inkubasi, dan media kultur.
2. V2-17, V2-21, V2-43, V2-10-1, V2-10-2, V2-2010-1, dan V2-2010-3 merupakan klon-klon *Vanda* Balithi dengan kemampuan regenerasi yang hampir sama dengan rerata persentase regenerasi eksplan mencapai 25% dan skor pembentukan kalus +++.
3. Pada tahap awal medium  $\frac{1}{2}$  Murashige & Skoog (MS) yang ditambah dengan 1 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP dan 2% sukrosa (MI-1) dan 0,05%  $\text{HgCl}_2$  selama 10 menit yang diikuti oleh pembilasan dengan air steril 5–6 kali (masing-masing 5 menit) (TS-3) merupakan medium inisiasi dan teknik sterilisasi yang sesuai untuk embriogenesis klon-klon *Vanda*.

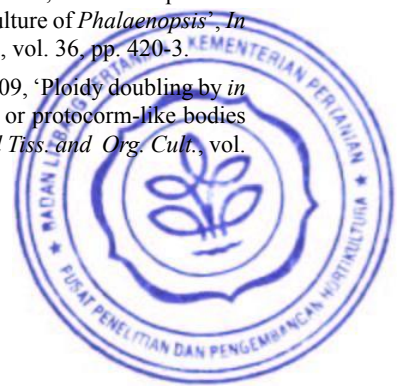
4. Pada tahap perbaikan pertama, medium  $\frac{1}{2}$  MS yang ditambah dengan 10 mg/l asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-D), 1 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 1 mg/l IAA, dan 3% sukrosa (MP-2) mampu menginduksi pembentukan embrio hingga 18 embrio per eksplan pada nodus tangkai bunga (JE-3).
5. Pada tahap perbaikan dua, kombinasi konsentrasi 2,5 mg/l 2,4-D dengan 5 mg/l TDZ (KK-4) pada inkubasi dan subkultur dua kali dalam ruang gelap, subkultur dua kali dalam ruang dengan intensitas cahaya rendah ( $\pm 5 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ) dan ke cahaya normal ( $\pm 25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ) (KI-2) mampu menginduksi pembentukan kalus lebih cepat dengan persentase regenerasi mencapai 32% dan jumlah embrio hingga 20 embrio per eksplan.
6. Embrio berkecambah dengan kualitas pertumbuhan tunas terbaik pada medium *New Phalaenopsis* yang ditambah 0,5 mg/l BAP (MK-5). MK-5 mampu menekan pencoklatan eksplan turun hingga 1,3%, meningkatkan persentase perkecambahan hingga 68% dengan jumlah embrio berkecambah mencapai 17 embrio.
7. Embrio yang berkecambah tumbuh baik membentuk planlet pada medium NP yang ditambah 0,25 mg/l BAP.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Nina Marlina dan Cecep Supriyatna untuk dukungan dan bantuannya dalam penyiapan bahan dan peralatan laboratorium, serta pemeliharaan tanaman induk.

## PUSTAKA

1. Arnaldos, TL, Munoz, R, Ferre, MA & Calderon, AA 2008, 'Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture', *Physiologia Plantarum*, vol. 113, no. 3, pp. 315-22.
2. Begum, F, Islam, D, Paul, RN, Mehedi, M & Mondal, SR 2002, 'In vitro propagation of *Vanda pteris* through axillary bud derived from protocorm culture', *Tropic. Agric. Res. Extent.*, vol. 5, no. 1-2, pp. 75-8.
3. 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. 11-5.
4. Chen, YC, Chang, C & Chang, WC 2000, 'A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*', *In Vitro Cel. and Develop. Biol. Plant.*, vol. 36, pp. 420-3.
5. Chen, WH, Tang, CY & Kao, YL 2009, 'Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species', *Plant Cell Tis. and Org. Cult.*, vol. 98, pp. 229-38.



6. Chung, HH, Chen, JT & Chang, WC 2005, 'Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* 'Chiengmai Pink' and subsequent plant regeneration', *In Vitro Cell. and Develop. Biol. Plant*, vol. 41, pp. 765-9.
7. Decruse, SW, Gangaprasad, A, Seeni, S & Menon, VS 2003, 'Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spatulata*, an exquisite orchid', *Plant Cell. Tiss. and Org. Cult.*, vol. 72, pp. 199-2.
8. Dewanti, M, Widyastoety, D, Pramanik, D, Yulianti, E, Supriyatna, C & Mintarsih, A 2010, 'Perakitan varietas unggul anggrek Vanda melalui hibridisasi dua varietas', Laporan Hasil Penelitian Tahun 2010, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung.
9. Gaspersz, V 1991, *Teknik analisis dalam penelitian percobaan*, Tarsito, Bandung.
10. Goh, CJ 1970, 'Tissue culture of *Vanda Miss Joaquim*', *J. Nat. Acad. Sci.*, vol. 2, pp. 31-3.
11. Goh, CJ 1990, 'Orchids, monopodials', in Ammirato, PV, Evans, DA, Sharp, WR & Bajaj, YPS (eds.), *Handbook of plant cell culture: ornamental species*, vol. 5, McGraw-Hill Publishing Company, New York.
12. Gow, WP, Chen, JT & Chang, WC 2008, 'Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids', *Acta Physiologia Plantarum*, pp. 1-7.
13. Gow, WP, Chen, JT & Chang, WC 2009, 'Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids', *Acta Physiologia Plantarum*, vol. 31, pp. 363-9.
14. Huang, LC, Lee, YL, Huang, BL, Kuo, CI & Shaw, JF 2002, 'High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture', *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant*, vol. 38, no. 4, pp. 358-65.
15. Hauwe, IVd & Swennen, R 1999, 'Characterization and control of bacterial contaminants in *in vitro* cultures of banana (*Musa* spp.)', *ISHA Acta Horticulturae 530: International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation*, viewed 12 December 2009, <www.acthort.org/books/530/530\_6.htm>.
16. Ishii, Y, Takamura, T, Goi, M & Tanaka, M 1998, 'Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*', *Plant Cell Rep.*, vol 17, pp. 446-50.
17. Kaur, S & Bhutani, KK 2009, 'In vitro propagation of *Vanda testacea* (Lindl.) Reichb.f. A rare orchid of high medicinal value', *Plant. Tis. Cult. & Biotechnol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1-7.
18. Kisor, R & Devi, HS 2009, 'Induction of multiple shoots in a monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb.f x *Vanda stangeana* Reichb.f) using thidiazuron and analysis of their genetic stability', *Plant. Cell. Tis. and Org. Cult.*, vol. 97, pp.121-9.
19. Kulkarni, AA, Kelkar, SM, Watve, MG & Krishnamurthy, KV 2007, 'Characterization and control of endophytic bacterial contaminants in *in vitro* cultures of *Piper* spp., *Taxus baccata* subsp. *wallichiana*, and *Withania somnifera*', *Can. J. Microbiol.*, vol. 53, no. 1, pp. 63-74.
20. Kunisaki, JT, Kim, KK & Sagawa, Y 1972, 'Shoot-tip culture of *Vanda*', *Am. Orchid. Soc. Bull.*, vol. 41, pp. 435-9.
21. Kuo, HL, Chen, JT & Chang, WC 2005, 'Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'', *In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant.*, no. 41, pp. 453-6.
22. Lang, NT & Hang, NT 2006, 'Using biotechnological approaches for *Vanda* orchid improvement', *Omonrice*, vol. 14, pp. 140-3.
23. Laukkanen, H, Haggman, H, Kontunen-Soppela, S & Hohtola, A 1999, 'Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase', *Physiologia Plantarum*, vol. 106, pp. 337-43.
24. Leng, TC, Haw, AB & Keng, CL 2004, 'Effect of reduced N6-Benzyladenine, explant type, explant orientation, culture temperature and culture vessel type on regeneration of adventitious shoot and *in vitro* plantlets of *Spilanthes acmella*', *J. Plant. Biol.*, vol. 47, no. 1, pp. 15-20.
25. Liu, THA, Lin, JJ & Wu, RY 2006, 'The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like-bodies', *Plant. Cell. Tis. and Org. Cult.*, vol. 86, pp.125-9.
26. Malabadi, RB, Mulgund, GS & Nataraja, S 2004, 'Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron', *Plant. Cell. Tis. and Org. Cult.*, vol. 76, pp. 289-3.
27. Marino, G, Gaggia, F, Saiano, F, Biavati, B & Marangoni, B 2009, 'Elimination of *in vitro* bacterial contaminants in shoot cultures of 'MRS 2/5' plum hybrid by the use of *Melia azedarach* extracts', *Europ. J. Plant. Pathol.*, vol. 123, no. 2, pp. 195-205.
28. Marshall, MR, Kim, J & Wei, CI 2000, 'Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods', viewed 16 september 2009 at <www.fao.com/browning explant/Enzymatic Browning.html>.
29. Martin, KP & Madassery, J 2006, 'Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies', *Scientia Horticulturae*, vol. 108, pp. 95-9.
30. Mattjik, AA & Sumertajaya, IM 2006, *Perancangan percobaan dengan aplikasi SAS dan Minitab*, IPB Press, Bogor.
31. Mitchell, SA, Asemota, HN & Ahmad, M.H. 2006, 'Effects of explant source, culture medium: Strength and growth regulators on the *in vitro* propagation of three Jamaican yams (*Dioscorea cayenensis*, *D. trifida* and *rotundata*)', *J. Sci. Food. Agric.*, vol 67, no. 2, pp. 173-80.
32. Moutia, M & Dookun, A 1999, 'Evaluation of surface sterilization and hot water treatments on bacterial contaminants in bud culture of sugarcane', *Experiment. Agric.*, vol. 35, pp. 265-74.
33. Mulgund, GS, Nataraja, K, Malabadi, RB & Kumar, SV 2011, 'TDZ induced *in vitro* propagation of an epiphytic orchid *Xenikophyton smeenanum* (Reichb. f.)', *Res. in Plant. Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. 7-15.
34. Nayak, NR, Rath, SP & Patnaik, S 1997, 'In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation', *Sci. Hort.*, vol. 71, no. 3-4, pp. 243-50.
35. Nayak, NR, Sahoo, S, Patnaik, S & Rath, SP 2002, 'Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)', *Scientia Horticulturae*, vol. 94, pp. 107-16.
36. Park, SY, Murthy, HN & Paek, KY 2002, 'Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves', *In vitro Cell. Develop. Biol.-Plant*, vol. 38, pp. 168-72.



37. Ozyigit, II, Kahraman, MV & Ercan, O 2007, 'Relation between explant age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 3-8.
38. Razavizadeh, R & Ehsanpour, AA 2008, 'Optimization of *in vitro* propagation of *Rosa hybrida* L. cultivar Black Red', *Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 96-9.
39. Renau-Morata, B, Ollero, J, Arrillaga, I & Segura, J 2005, 'Factors influencing axillary shoot proliferation and adventitious budding in cedar', *Tree Physiol.*, vol. 25, pp. 477-86.
40. Sagawa, Y. & Kunisaki, J.T. 1982, 'Clonal propagation of orchids by tissue culture', in Fujiwara, A. (ed.) *Plant Tiss. Cult.*, Maruzen, Tokyo pp: 683-4.
41. Seeni, S & Latha, PG 1992, 'Foliar regeneration of the endangered Red *Vanda*, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae)', *Plant. Cell. Tis. and Org. Cult.*, vol. 29, pp. 167-72.
42. Seeni, S & Latha, PG 2000, '*In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue *Vanda*', *Plant. Cell. Tis. and Org. Cult.*, vol. 61, pp. 1-8.
43. Sharma. P & Rajam, MV 1996, 'Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.)', *J. Experimen. Bot.*, vol. 46, no. 282, pp. 135-41.
44. Sivanesan, I, Hwang, SJ & Jeong, BR 2008, 'Influence of plant growth regulators on axillary shoot multiplication and iron source on growth of *Scrophularia takesimensis* Nakai - a rare endemic medicinal plant', *Afri. J. Biotechnol.*, vol. 7, no. 24, pp. 4484-90.
45. Stom, DJ, Ivanova, GG, Bashkatova, GV, Trubina, TP & Kozhova. OM 2006, 'About the role of quinones in the action of some polyphenols on the streaming of protoplasm in *Nitella* sp. Cells', *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, vol. 21, no. 5, pp. 407-12.
46. Tabiyeh, DT, Bernard, F & Shacke, H 2005, *Investigation of glutathione, salicylic acid and GA<sub>3</sub> effects on browning in Pistacia vera shoot tips culture*, viewed 26 December 2008 at <[www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=726\\_31](http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=726_31)>.
47. Teng, WL 1999, 'Source, etiolation and orientation of explants affect *in vitro* regeneration of Venus fly-trap (*Dionaea muscipula*)', *Plant. Cell. Rep.*, vol. 18, pp. 363-8.
48. Teo, KH, Kunisaki, T & Sagawa, Y 1973, 'Clonal propagation of strap-leafed *Vanda* by shoot-tip culture', *Am. Orchid Soc. Bull.*, vol. 42, pp.1022-4.
49. Tokuhara, K & Mii, M 1993, 'Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds', *Plant. Cell. Reports.*, vol. 13, pp.7-11.
50. 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 Cell. Develop. Biol.-Plant.*, vol. 37, pp. 457-61.
51. Tokuhara, K & Mii, M 2003, 'Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources', *In Vitro Cell. Develop. Biol. - Plant*, vol. 39, no. 6, pp. 635-9.
52. Vendrame, WA, Maguine, I & Carvalho, VS 2007, '*In vitro* propagation and plantlet regeneration from *Doritaenopsis* Purple Gem 'Ching Hua' Flower Explants', *HortSci.*, vol. 42, no.5, pp. 1256-8.
53. Widiastoety, D 1985, 'Macam media dan kedudukan mata tunas pada pembentukan *protocorm-like bodies* anggrek', *Penelitian Pertanian*, vol. 5, no. 1, pp. 37-9.
54. Widiastoety, D, Susesno, H, Harran, S & Suseno, R. 1986, 'Perlakuan modifikasi medium terhadap kultur daun anggrek (*Aranda Christine 130*)', *Bul. Penel. Hort.*, vol. 14, no. 2, pp. 33-7

