

Perbanyak Massa Anggrek *Dendrobium Gradita* 10 Secara *In Vitro* Melalui Embriogenesis Somatik (*In Vitro Mass Propagation of Dendrobium Gradita* 10 Orchids Via Somatic Embryogenesis)

Rachmawati, F¹⁾, Purwito, A²⁾, Wiendi, NMA²⁾, Mattjik, NA²⁾, dan Winarto, B¹⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang-Pacet, Cianjur 43253

²⁾Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

E-mail: balithi@litbang.pertanian.go.id

Naskah diterima tanggal 7 April 2014 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 12 September 2014

ABSTRAK. Ketersediaan protokol perbanyak massa anggrek *Dendrobium* secara *in vitro* memiliki peranan penting dalam mendukung pengembangan industri benih di dalam negeri. Penelitian ini bertujuan mendapatkan teknologi perbanyak massa *Dendrobium Gradita* 10 melalui embriogenesis somatik. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca Anggrek Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung, Pacet, Cianjur, mulai bulan Maret sampai dengan Desember 2012. Penelitian disusun menggunakan rancangan acak kelompok dengan lima ulangan. Jenis eksplan, media, periode subkultur, dan kepadatan kalus diujicobakan dalam penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun planlet dan media $\frac{1}{2}$ Murashige & Skoog (MS) + 1 mg/l Thidiazuron (TDZ) + 0,5 mg/l N6-benzyladenine (BA) merupakan jenis eksplan dan media terbaik untuk induksi kalus embriogenik hingga 80% dengan waktu pembentukan kalus tercepat (26,3 hari setelah kultur). Proliferasi kalus embriogenik terbaik terdapat pada media $\frac{1}{2}$ MS + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l α -naphthalene acetic acid (NAA) dengan kepadatan kalus 2–3 g kalus/25 ml medium. Pertumbuhan kalus embriogenik teroptimal terdapat pada periode subkultur yang ke-2. Konversi kalus embriogenik menjadi embrio somatik mencapai 79% pada subkultur ke-3 ditemukan pada media $\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l BA. Perkecambahan embrio maksimal dengan 21,7 planlet per gerombol embrio ditemukan pada media $\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l BA. Keberhasilan pengembangan teknologi perbanyak massa anggrek *Dendrobium Gradita* 10 secara *in vitro* melalui embriogenesis somatik diharapkan memiliki dampak besar terhadap pengembangan teknologi perbanyak massa benih untuk jenis *Dendrobium* yang lain.

Katakunci: *Dendrobium Gradita* 10; Embriogenesis somatik; Eksplan; Kepadatan kalus; Media dan periode subkultur

ABSTRACT. The existence *in vitro* propagation protocol on *Dendrobium* have important role in supporting the development of the seed industry in the country. The objective of this research to get mass propagation technology of *Dendrobium Gradita* 10 via somatic embryogenesis. The experiment was conducted at Tissue Culture Laboratory and Orchid Screen House of Indonesian Ornamental Plant Research Institute from March to Desember 2012. The experiments were arranged using randomized completely block design with five replications. Explant types, media, subculture period, and callus densities were tested in the experiment. The results showed that leaf plantlets and half-strength Murashige & Skoog (MS) containing 1 mg/l thidiazuron (TDZ) and 0.5 mg/l N6-benzyladenine (BA) were the most suitable explant sources and medium to induce high embryogenic callus up to 80% with shorter callus initiation period (26.3 days after culture). Callus proliferation was significantly recorded on half-strength MS augmented with 0.3 mg/l TDZ and 0.1 mg/l α -naphthalene acetic acid (NAA) with callus density at 2–3 g callus per 25 ml of medium. Growth and development of embryogenic callus of *Dendrobium Gradita* 10 was recorded in the second subculture period. Embryogenic callus conversion to somatic embryos up to 79% at the third subculture period was significantly measured on half-strength MS containing 0.05 mg/l BA. Optimal embryos germination with 21.7 planlet per clump was noted on half-strength MS augmented with 0.05 mg/l BA. The successful results on establishing *in vitro* mass propagation of *Dendrobium Gradita* 10 via somatic embryogenesis expected has implication on establishing the technology for other *Dendrobium*.

Keywords: *Dendrobium Gradita* 10; Somatic embryogenesis; Explants; Callus density; Media and subculture periode

Potensi ekonomi *Dendrobium* telah dimanfaatkan dan dikembangkan oleh banyak negara. Di negara tropis seperti Thailand, Singapura, Malaysia, termasuk Indonesia, *Dendrobium* dimanfaatkan sebagai tanaman hias pot maupun bunga potong utama (Sim *et al.* 2006). Di Indonesia *Dendrobium* mulai dibudidayakan secara luas dan menguasai lebih dari 50% bisnis anggrek secara umum. Total luas lahannya mencapai \pm 1.209.938 m² dengan produktivitas \pm 15.490.256 tangkai/tahun (BPS 2012).

Permintaan dan nilai ekonomi *Dendrobium* yang terus meningkat berdampak langsung pada peningkatan kebutuhan benih. Ketersediaan benih bermutu memiliki kontribusi yang sangat besar dan strategis dalam

industri anggrek ini. Hingga saat ini pengembangan agribisnis anggrek *Dendrobium* di Indonesia masih dihadapkan pada masalah terbatasnya ketersediaan benih bermutu. Benih umumnya berasal dari hasil sebar biji yang secara genetik beragam dengan kualitas yang rendah (Anonim 2005). Kondisi ini menyebabkan sebagian besar produsen *Dendrobium* di Indonesia menggunakan produk-produk impor terutama dari Thailand. Untuk menekan laju impor dan meningkatkan peluang ekspor bunga *Dendrobium* maka perlu upaya untuk mengembangkan perbenihan nasional yang dapat mendukung ketersediaan benih bermutu sesuai permintaan pasar secara berkesinambungan. Perakitan kultivar unggul *Dendrobium* yang memiliki nilai

ekonomi tinggi dan penyiapan teknologi perbanyakan massanya yang efektif dan efisien perlu dilanjutkan.

Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik kultur jaringan yang paling potensial dikembangkan untuk meningkatkan ketersediaan benih bermutu anggrek *Dendrobium* di Indonesia. Teknologi ini telah banyak diaplikasikan di negara-negara maju, tetapi masih sangat terbatas dikembangkan dan diaplikasikan di Indonesia. Oleh karena itu di dalam penelitian ini dilakukan inisiasi perbanyakan massa anggrek *Dendrobium* melalui teknik embriogenesis somatik.

Beberapa hasil penelitian menginformasikan bahwa genotip, eksplan, media, kondisi inkubasi, kepadatan inokulum, dan periode subkultur berpengaruh terhadap embriogenesis somatik *Dendrobium*. Eksplan yang digunakan ialah kuncup bunga, daun, segmen plb, tunas aksilar, dan tunas pucuk. Media yang banyak digunakan ialah Vacin & Went, $\frac{1}{2}$ MS, dan Knudson C yang dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh (ZPT) seperti TDZ, BAP, Kinetin, dan NAA dengan penambahan vitamin dan air kelapa. Kultur umumnya menggunakan sistem kultur cair dan diinkubasi dalam kondisi terang (Meesawat & Kanchanapoom 2002, Roy & Banerjee 2003, Chung et al. 2005, 2007, Luo et al. 2003, Wei et al. 2007, Utami & Ginting 2007, Khasrovi et al. 2008, Song et al. 2007, Zha et al. 2007, Hoesen et al. 2008, Zhao et al. 2008, Winarto 2012, Winarto et al. 2013).

Penelitian ini bertujuan mendapatkan teknologi perbanyakan massa *Dendrobium* Gradita 10 melalui embriogenesis somatik. Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah bahwa diduga terdapat pengaruh jenis eksplan, komposisi media, periode subkultur, dan kepadatan kalus terhadap keberhasilan embriogenesis somatik *Dendrobium* Gradita 10. Melalui penelitian ini diharapkan teknologi perbanyakan massa *Dendrobium* Gradita 10 berhasil ditemukan.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca Anggrek Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung, Pacet, Cianjur, mulai bulan Maret sampai dengan Desember 2012.

Bahan Penelitian dan Pemeliharaan Tanaman Donor

Tanaman donor yang digunakan ialah *Dendrobium* Gradita 10 (*Dendrobium* Sonia Deep Pink x *Dendrobium* aksesori 1265) (umur 18 bulan), diperoleh dari pemulia anggrek Balai Penelitian Tanaman Hias.

Tanaman dipelihara dalam pot kecil (diameter 15 cm) berisi campuran arang sekam dan pakis (1:1, v/v) dan ditempatkan di rumah kaca dengan suhu siang 30–37°C dan suhu malam 15–21°C, kelembaban relatif (RH) 60–90% pada siang hari dan 75–90% pada malam hari yang diukur menggunakan thermo-hygrometer (Haar-Synth-Hygro, Germany), dan pencahayaan 12 jam fotoperiode dengan intensitas cahaya 175–350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama musim kemarau (April-Oktober) dan 30–100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (November-Maret) yang diukur menggunakan digital lux meter (Lutron LX 101, Taiwan).

Tanaman donor dipelihara dengan cara penyiraman tiap hari dan pemupukan tiap 2 minggu menggunakan pupuk cair yang mengandung 2 g/l NPK 20:20:20 (Nusa Tani, Ltd., Jakarta) dan 2 ml/l Bio Sugih Tani (PT. Sugih Cipta Santosa, Jakarta, Indonesia). Tunas yang vigor dengan pertumbuhan vegetatif yang optimal dipilih sebagai sumber eksplan.

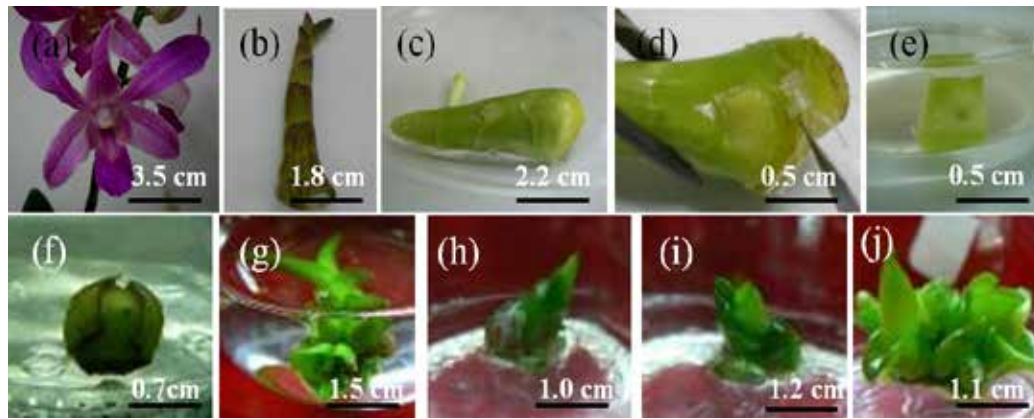
Bahan kimia yang digunakan ialah komponen media Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog 1962), Knudson C, dan Vacin & Went (VW) (Vacin & Went 1949) (Merck, Germany), ZPT [thidiazuron (1-Phenyl-3-[1,2,3-thidiazol-5-yl] urea, TDZ), N⁶-benzyladenine (BA), α -naphthaleneacetic acid (NAA), kinetin (Kin)] (Phytotech, USA), gelrite (Duchefa-Biochemie, Netherland), sukrosa (Merck, Germany), vitamin (niacin, pyridoxine HCl, thiamin) (Phytotech, USA), pepton (Phytotech, USA), arang aktif (Merck, Germany), (alkohol 96 %, natrium klorida (NaOCl) (Bayclin-Johnson Home Hygiene Products Ltd, Indonesia), dan air destilasi.

Sterilisasi dan Isolasi Eksplan

Tunas dari lapangan (\pm 7–10 cm) disterilisasi menggunakan 10, 5, dan 1% NaOCl (Bayclin-Johnson Home Hygiene Products Ltd, Indonesia) masing-masing selama 10, 5, dan 1 menit dan dibilas menggunakan akuades steril. Mata tunas dan daun dipotong berbentuk kubus (0,5–1,00 cm) dan dikultur pada media Winarto-Teixeira (WT) (Winarto et al. 2011) yang mengandung 2 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BA, dan 0,02 mg/l NAA baik cair maupun padat. Tunas baru terbentuk \pm 2 bulan setelah kultur dan selanjutnya dipanen daunnya sebagai sumber eksplan. Proses inisiasi tunas dapat dilihat pada Gambar 1.

Inkubasi dan Pemeliharaan Kultur

Semua kultur pada penelitian ini diinkubasi pada kondisi fotoperiode terang 16 jam dengan intensitas cahaya 13 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (SL-Shinyoku, 23 watt, Lutron LX 101, Taiwan) pada suhu 24 \pm 2°C dengan kelembaban 60–70% (Haar-Synth-Hygro, Germany) hingga terbentuk kalus/plbs/tunas/planlet. Khusus



Gambar 1. Pembentukan tunas dari segmen tunas sebagai sumber eksplan untuk induksi kalus *Dendrobium Gradita 10*. (a) bunga *Dendrobium Gradita 10*, (b-d) isolasi mata tunas, (e-g) tahap pembentukan tunas pada media cair dan (h-j) tahap pembentukan tunas pada media padat. [Development of shoot from pseudobulb as explant sources for *Dendrobium Gradita 10* callus induction. (a) *D. Gradita 10* flowers, (b-d) shoot segment isolation, (e-g) shoot development on liquid media, and (h-j) shoot development on solid media]

untuk kultur cair dikocok di atas *orbital shaker* (GFL 3017, Germany) dengan kecepatan 100–110 rpm.

Prosedur Penelitian

Induksi Kalus Embriogenik

Pengaruh jenis eksplan dan komposisi media terhadap induksi kalus

Tiga jenis eksplan yang diuji ialah (1) daun lapangan, (2) mata tunas, dan (3) daun planlet, sedangkan tujuh komposisi media yang diuji ialah: ID-1 = VW + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BA + 2 g/l pepton (Meesawat & Kanchanapoom 2002), ID-2 = Knudson's + 0,5 mg/l niacin + 0,5 mg/l pyridoxine HCl + 0,1 mg/l thiamin HCl + 0,5 mg/l NAA + 1 mg/l BAP + 10% air kelapa (Roy & Banerjee 2003), ID-3 = MS (unsur makro setengah konsentrasi dan unsur mikro dengan konsentrasi penuh) + 2,0 mg/l BAP (Zhao *et al.* 2008), ID-4 = VW cair + 1 mg/l NAA + 1.5 mg/l BAP + 15% air kelapa (Utami & Ginting 2007); ID-5 = ½ MS + 1 mg/l TDZ (Chung *et al.* 2007), ID-6 = 1/2 MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA (Kuo *et al.* 2005), dan ID-7 = ½ MS + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 mg/l TDZ + 2 g/l pepton + 100 ml/l air kelapa (Kurniati 2006). Tiap perlakuan terdiri atas lima ulangan dan setiap ulangan terdiri atas 1–2 eksplan sehingga terdapat 210 satuan percobaan. Pada semua media perlakuan dilakukan penambahan 20 g/l sukrosa. Media diatur pada pH 5,8 menggunakan pH meter (Model 420A Thermo Orion, USA). Eksplan dikultur pada Erlenmeyer 100 ml (Pyrex, IWAKI TE-32, Indonesia) yang berisi 25 ml media dan dikocok di atas *orbital shaker* dengan kecepatan 100–110 rpm.

Peubah yang diamati ialah (1) waktu inisiasi kalus (hari setelah kultur/HSK), diamati sejak

eksplan dikultur hingga waktu terbentuknya kalus, (2) kemampuan regenerasi eksplan (%), diamati ± 2 bulan setelah inkubasi eksplan dan menghitung jumlah eksplan yang beregenerasi dibagi dengan total eksplan yang diamati dikalikan dengan 100%, (3) skor kalus, diamati ± 2 bulan setelah inkubasi eksplan (0=tidak ada kalus; 1=≤ 25%, 2 = > 25-50%, 3 = >50-75 %, 4 = > 75-100% kalus yang terbentuk pada permukaan eksplan), dan (4) arah morfogenesis eksplan (kalus/embrio/tunas), diamati ± 2 bulan setelah inkubasi eksplan.

Proliferasi Kalus Embriogenik

Pengaruh komposisi media terhadap proliferasi awal kalus menggunakan *thin cell layer* (TCL) kalus

Proliferasi awal kalus embriogenik dilakukan dengan menggunakan TCL kalus. Kalus dipotong secara longitudinal/melintang dengan ukuran ketebalan 0,5–1,0 mm. Potongan tersebut kemudian dikultur pada tujuh komposisi media yang sama dengan percobaan 1, yaitu: ID-1 s/d ID-7. Pada semua media ditambahkan 2 g/l gelrite (Duchefa-Biochemie, Netherland) dan pH media diatur pada 5,8. Kultur diinkubasi selama ±1–2 bulan. Percobaan disusun menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan lima ulangan dan tiap ulangan terdiri atas satu botol percobaan yang berisi 2–3 TCL kalus sehingga total satuan percobaan berjumlah 115 satuan percobaan.

Peubah yang diamati ialah (1) pencokelatan eksplan (%), diamati ± 1–2 minggu setelah eksplan dikultur dan diinkubasi gelap dan data diperoleh dengan menghitung jumlah eksplan yang mengalami pencokelatan dibagi dengan total eksplan yang diamati dikalikan 100%,

(2) waktu inisiasi kalus (HSK), diamati sejak eksplan dikultur hingga waktu terbentuknya kalus, (3) eksplan berkalus (%), diamati \pm 2 bulan setelah inkubasi eksplan pada kondisi gelap dan data diperoleh dengan menghitung jumlah eksplan yang membentuk kalus dibagi dengan total eksplan yang diamati dikalikan 100%, (4) volume kalus (mm^3), diamati \pm 2 bulan, setelah inkubasi eksplan pada kondisi gelap dan data diperoleh dengan mengukur panjang, lebar, dan tinggi kalus, (5) skor kalus, diamati \pm 2 bulan setelah inkubasi eksplan, (0=tidak ada kalus; 1= \leq 25%; 2 = > 25-50%, 3 = >50-75 %, 4 = > 75-100% kalus yang terbentuk pada permukaan eksplan), dan (6) warna kalus, diamati pada awal pembentukan kalus hingga \pm 1 bulan setelah pembentukan kalus (putih, kuning, atau hijau).

Pengaruh media dan periode subkultur terhadap proliferasi kalus embriogenik

Proliferasi kalus dilakukan pada enam komposisi media, yaitu Pro-D1 (ID-1 + 10% air kelapa) (Meesawat & Kanchanapoom 2002), Pro-D2 (ID-2 tanpa ZPT) (Roy & Banerjee 2003), Pro-D3 (ID-3 tanpa ZPT) (Zhao *et al.* 2008), Pro-D4 (ID-4) (Utami & Ginting 2007), Pro-D5 (ID-5 + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA) (Chung *et al.* 2007), dan Pro-D6 (1/2 MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA) (Kuo *et al.* 2005). Kalus diproliferasi dalam erlenmeyer 100 ml (Pyrex IWAKI TE-32, Indonesia) dengan kepadatan 1 g kalus/25 ml media. Kalus embriogenik disubkultur sebanyak tiga kali dengan periode subkultur 1 bulan. Percobaan disusun menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan lima ulangan. Tiap ulangan terdiri atas satu botol percobaan sehingga total terdapat 90 satuan percobaan.

Pengaruh media dan kepadatan kalus terhadap proliferasi kalus embriogenik

Proliferasi kalus dilakukan pada enam komposisi media cair (Pro-D1 s/d Pro-D6). Kepadatan kalus yang diuji ialah 1, 2, dan 3 g kalus/25 ml media. Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dua faktor dengan tiga ulangan. Tiap ulangan terdiri atas satu botol percobaan sehingga total terdapat 63 satuan percobaan.

Peubah yang diamati ialah (1) bobot basah kalus (g), diperoleh dengan cara menimbang bobot basah kalus setelah 1 bulan subkultur, (2) pertambahan bobot kalus (g/bulan), diukur dengan membandingkan bobot basah kalus setelah 1 bulan subkultur dikurangi dengan bobot awal kalus, dan (3) kualitas kalus dan embrio (kondisi, jenis, dan warna), diamati setelah 1 bulan subkultur.

Konversi Kalus Embriogenik Menjadi Embrio Somatik/Plbs

Konversi kalus dilakukan pada 10 komposisi media cair, yaitu KD1 = 1/2 MS tanpa ZPT, KD2 = VW tanpa

ZPT, KD3 = 1/4 MS + 0,05 mg/l BAP + 0,01 mg/l NAA, KD4 = VW + 0,05 mg/l BAP + 0,01 mg/l NAA, KD5 = 1/4 MS + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA, KD6 = VW + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA, KD7 = 1/4 MS + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, dan KD8 = VW + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, KD9 = 1/2 MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA dan KD10 = 1/2 MS + 0,05 mg/l BA. Kalus dikultur dalam erlenmeyer 100 ml (Pyrex IWAKI TE-32, Indonesia) dengan kepadatan 2 g kalus/25 ml media. Kalus embriogenik disubkultur sebanyak tiga kali dengan periode subkultur 1 bulan sekali. Percobaan disusun menggunakan RAL pola faktorial dua faktor dengan tiga ulangan. Tiap ulangan terdiri atas satu botol percobaan sehingga total terdapat 90 satuan percobaan.

Pengamatan dilakukan secara periodik setiap 1 bulan. Peubah yang diamati ialah (1) bobot ES setiap periode subkultur (subkultur 1, 2, dan 3) (g), diperoleh dengan cara menimbang bobot basah kalus setiap periode subkultur (subkultur 1, 2, dan 3), (2) konversi kalus menjadi ES (%), dilakukan dengan cara mengambil \pm 1 g sampel kemudian diamati dibawah mikroskop dan dihitung jumlah ES yang terbentuk kemudian dikonversikan terhadap bobot total kultur, dan (3) kualitas ES (kondisi, jenis, dan warna), dinilai dari tingkat kesegaran ES (vigor), warna, dan keseragaman ES yang dihasilkan.

Perkecambahan Embrio Somatik/Plbs

Perkecambahan embrio somatik dilakukan pada enam komposisi media, yaitu RD-1 = 1/2 MS tanpa ZPT, RD-2 = 1/2 MS + 0,05 mg/l BA, RD-3 = 1/2 MS + 150 ml air kelapa, RD-4 = VW tanpa ZPT, RD-5 = VW + 0,05 mg/l BA, dan RD-6 = VW + 150 ml air kelapa. Pada semua media perlakuan ditambahkan 20 g/l sukrosa dan pH media diatur pada 5,8. Pembesaran planlet dilakukan pada media VW + 100 g/l pisang + 100 g/l kentang + 1 g/l charcoal. Percobaan disusun menggunakan RAL dengan lima ulangan. Tiap ulangan terdiri atas tiga botol percobaan sehingga total terdapat 90 satuan percobaan.

Peubah yang diamati ialah (1) jumlah bakal tunas per gerombol ES dan (2) jumlah tunas per gerombol ES. Satu gerombol terdapat rerata 20 ES. Pengamatan rutin tiap hari dilakukan untuk mengetahui setiap perubahan yang terjadi, sementara pengambilan data dilakukan 1 bulan setelah kultur (BSK) inisiasi tunas.

Analisis Data

Data yang terkumpul selama percobaan berlangsung dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) menggunakan program SAS Release Window 9.13. Adanya perbedaan nyata nilai rerata perlakuan akan diuji lebih lanjut menggunakan Uji Wilayah Berganda

Duncan pada taraf kepercayaan 95% (Mattjik & Sumertajaya 2006).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa embriogenesis somatik *Dendrobium* Gradita 10 terjadi secara tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*) melalui pembentukan kalus pada media ID-6 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA). Inisiasinya diawali dengan pembengkakan dan pecahnya mata tunas dan inisiasi kalus pada bagian daun yang dilukai 3–4 BSK. Proliferasi kalus embriogenik ini optimal pada medium cair Pro-D5 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l BA). Kalus dikultur pada kepadatan 2–3 g/25 ml media dan diinkubasi pada kondisi terang selama 1–3 bulan. Konversi kalus menjadi embrio somatik (plbs) pada media KD-10 (½ MS + 0,05 mg/l BA) secara bertahap melalui 1–3 kali subkultur (periode subkultur 1 bulan). Regenerasi awal embrio somatik menjadi planlet terjadi 2–4 minggu pada media RD2 (½ MS +

0,05 mg/l BA) dan RD3 (½ MS + 150 ml/l air kelapa). Planlet disubkultur sebanyak tiga kali dengan periode subkultur 1 bulan. Planlet siap diaklimatisasi setelah terbentuk 2–3 daun dan akar.

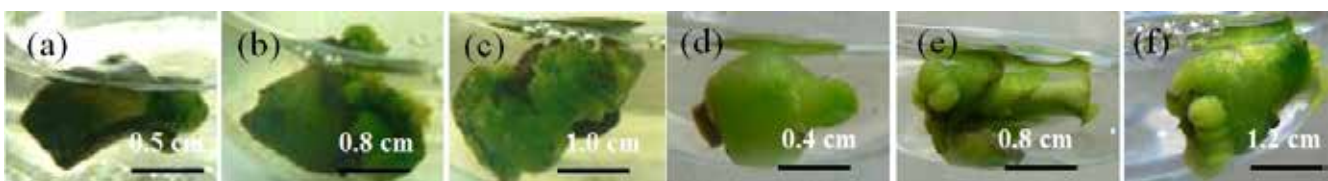
Induksi Kalus Embriogenik

Media dan jenis eksplan ternyata memberikan pengaruh yang bervariasi terhadap induksi kalus embriogenik *Dendrobium* Gradita 10. Daun planlet merupakan eksplan yang paling responsif dalam membentuk kalus hingga 80% pada medium ID-6 (½ MS + 1,0 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA) dengan rerata waktu pembentukan kalus tercepat 26,3 HSK. Skor pembentukan plbs hingga 60% dengan rerata waktu pembentukan plbs 26,6 HSK ditemukan pada medium ID-4 (VW + 1 mg/l NAA + 1,5 mg/l BA + 150 mg/l air kelapa) (Tabel 1). Proses pembentukan kalus dari daun planlet dapat dilihat pada Gambar 2a-c, sedangkan pembentukan kalus pada mata tunas lateral didahului oleh pembengkakan dan pecahnya mata tunas dan selanjutnya kalus terbentuk di bagian pangkal mata tunas (Gambar 2c-f). Kalus yang terinisiasi lebih sedikit dan pada tahap awal pertumbuhannya lebih lambat dibandingkan dengan

Tabel 1. Respons jenis eksplan dan media pada morfogenesis dari kalus/ plbs/tunas (*Response of explants and media on morphogenesis of callus/plbs/shoot*)

Media (Media)	Respon eksplan (Explant response)								
	Mata tunas (Buds)			Daun dari lapang (Plant leaf)			Daun planlet (Plantlet leaf)		
	Tunas (Shoot)	Kalus (Callus)	Plbs (Plbs)	Tunas (Shoot)	Kalus (Callus)	Plbs (Plbs)	Tunas (Shoot)	Kalus (Callus)	Plbs (Plbs)
ID-1	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ID-2	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ID-3	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ID-4	-	+	-	-	-	-	-	-	++
ID-5	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ID-6	+	-	-	-	-	-	-	+++	-
ID-7	+	-	-	-	-	-	-	++	-

ID-1 (VW + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BA + 2 g/l pepton), ID-2 (Knudson's + 0,5 mg/l niacin + 0,5 mg/l pyridoxine HCl + 0,1 mg/l thiamin HCl + 0,5 mg/l NAA + 1 mg/l BAP + 10% air kelapa), ID-3 (MS [unsur makro setengah konsentrasi dan unsur mikro dengan konsentrasi penuh] + 2,0 mg/l BAP), ID-4 (VW cair + 1 mg/l NAA + 1,5 mg/l BAP + 15% air kelapa), ID-5 (½ MS + 1 mg/l TDZ, ID-6 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA), dan ID-7 (½ MS + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 mg/l TDZ + 2 g/l pepton + 100 ml/l air kelapa). (-) tidak terjadi morfogenesis, (+) sedikit kalus/plbs terbentuk (< 25% dari total eksplan), (++) cukup banyak kalus/plbs terbentuk (25–50% dari total eksplan), (+++) banyak kalus/plbs terbentuk (> 50% dari total eksplan) [(-) no morphogenesis, (+) less callus/plbs formation (< 25% of total explant), (++) moderate callus/plbs formation (25-50% of total explant), (+++) abundant callus/plbs formation (>50% of total explant)]



Gambar 2. Pembentukan kalus: (a-c) kalus dari potongan daun planlet, (d-f) kalus dari mata tunas [*Development of callus: (a-c) callus from a piece of plantlet's leaf, (d-f) callus from lateral buds*]

Tabel 2. Pengaruh jenis eksplan dan komposisi media terhadap waktu induksi (HSK) dan keberhasilan pembentukan kalus/plbs (*Effect of explants and medium compositions on induction time (DAC) and success on formation of callus/plbs*)

Media (Media)	Waktu induksi kalus/plbs (<i>Induction time of callus/plbs, HSK (DAC)</i>)				Keberhasilan pembentukan kalus/plbs (<i>Succes on formation of callus/plbs</i>)			
	Mata tunas (<i>Buds</i>)		Daun planlet (<i>Plantlet leaf</i>)		Mata tunas (<i>Buds</i>)		Daun planlet (<i>Plantlet leaf</i>)	
	Kalus (<i>Callus</i>)	Plbs (<i>Plbs</i>)	Kalus (<i>Callus</i>)	Plbs (<i>Plbs</i>)	Kalus (<i>Callus</i>)	Plbs (<i>Plbs</i>)	Kalus (<i>Callus</i>)	Plbs (<i>Plbs</i>)
ID-1	91,4±2,30	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	30,6±6,68	80,0±0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	40,0± 0,00
ID-2	106,0±6,04	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	30,1±4,56	60,0±0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	40,0± 0,00
ID-3	114,4±5,68	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	32,6±3,43	60,0±0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	40,0± 0,00
ID-4	99,4±3,21	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	26,6±5,08	80,0±0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	60,0± 0,00
ID-5	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	31,3 ±4,65	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	60,0± 0,00	0,0 ± 0,00
ID-6	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	26,3±5,58	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	80,0± 0,00	0,0 ± 0,00
ID-7	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	28,7±5,72	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	40,0± 0,00	0,0 ± 0,00

HSK (hari setelah kultur), DAC (*Days after culture*) keberhasilan pembentukan kalus/plbs dihitung dari jumlah eksplan yang terinduksi membentuk kalus terhadap jumlah total eksplan yang dikultur (*Success on formation of callus/plbs were counted from number of inducted-explants forming callus compared to number of total explants cultured*)

jumlah dan pertumbuhan kalus asal eksplan daun planlet (Tabel 1 dan Gambar 2).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa media ID-6 yang mengandung 0,5 mg/l BAP dan 1 mg/l TDZ mampu merangsang pembentukan kalus maupun embrio somatik meskipun tanpa auksin. Hasil yang sama dalam embriogenesis juga diperoleh Kuo *et al.* (2005) yang mengkultur eksplan daun pada medium ½ MS yang ditambah dengan 0,5–3,0 mg/l BA dan 0,5–3,0 mg/l TDZ pada *Phalaenopsis* dan Winarto *et al.* (2013) yang mengkultur segmen tunas *Dendrobium* Zahra FR-62 pada medium ½ MS yang ditambah dengan 1 mg/l TDZ dan 0,5 mg/l BA. Potensi embriogenesis yang cukup tinggi tersebut diduga dipengaruhi oleh kehadiran TDZ dalam media kultur. TDZ berperan dalam mentranslokasi BA ke bagian-bagian jaringan eksplan yang dilukai dan sebagai inhibitor sitokin oksidase yang mencegah terjadinya degradasi sitokin tipe Adenin. Peningkatan akumulasi BA pada bagian sel tersebut akan meningkatkan aktivitas pembelahan sel menjadi lebih aktif (Mok & Mok 2001, Gaba 2005, Tefera & Wannakrairoj 2005, Sadik *et al.* 2006). –

Pada eksplan mata tunas media ID-4 (VW cair + 1 mg/l NAA + 1.5 mg/l BAP + 15% air kelapa) memberikan respons terbaik dengan keberhasilan pembentukan kalus tertinggi (80%) dengan waktu pembentukan kalus tercepat (91,4 HSK). Proses pembentukan kalus dari eksplan mata tunas dapat dilihat pada Gambar 2d-f, sedangkan eksplan daun dari lapangan merupakan eksplan dengan respons terendah meski tidak terdapat kontaminasi, eksplan tidak mampu tumbuh dan berkembang membentuk tunas,

kalus maupun plbs. Eksplan umumnya mengalami pencokelatan dan akhirnya mati.

Perbedaan respons ketiga eksplan yang digunakan dalam penelitian ini dipengaruhi oleh kemampuan regenerasi eksplan. Eksplan yang tidak responsif diduga disebabkan karena eksplan terlalu tua untuk terinduksi membentuk kalus/plbs. Menurut Park *et al.* (2002) dan Chen *et al.* (2004), eksplan yang berumur muda memiliki banyak sel yang bersifat meristematik dan kompeten sehingga dapat membentuk kalus/plbs lebih mudah dan lebih banyak.

Proliferasi Kalus Embriogenik

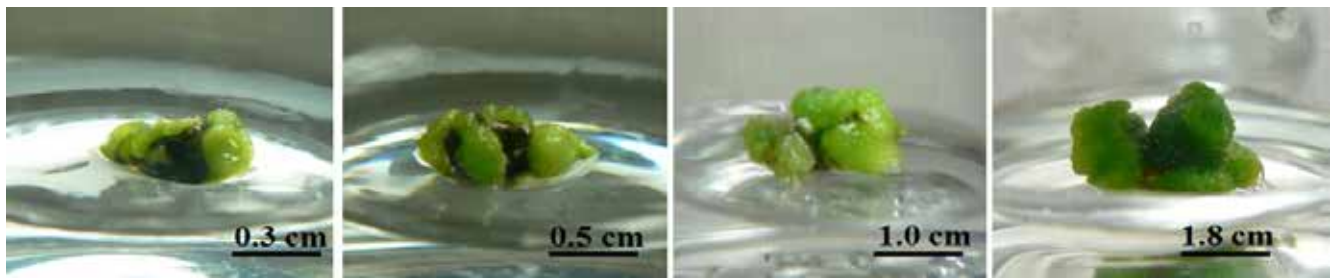
Pengaruh komposisi media terhadap proliferasi awal kalus menggunakan *thin cell layer* (TCL) kalus.

TCL kalus *Dendrobium* Gradita-10 pada media ID-1 s/d ID-7 ternyata juga memberikan variasi respons pada semua peubah yang diamati, termasuk persentase pencokelatan eksplan, waktu pembentukan kalus, skor kalus, volume kalus, jumlah bakal tunas, dan warna kalus. Pada semua media, inisiasi kalus mulai terbentuk 21 HSK. Media ID-6 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA) merupakan media yang paling sesuai untuk proliferasi awal kalus *Dendrobium* Gradita 10. Lebih dari 90% eksplan tetap tumbuh dan tidak mengalami pencokelatan. Kalus yang terbentuk sangat banyak, terbentuk relatif lebih cepat, dengan pertumbuhan kalus yang maksimal. Kalus berwarna hijau dan menghasilkan jumlah bakal tunas yang banyak, sedangkan media berbasis VW dan Knudson (ID-1, ID-2 dan ID-4) tidak memberikan pengaruh

Tabel 3. Pengaruh media terhadap induksi kalus menggunakan TCL kalus sebagai sumber eksplan (Effect of media on callus induction using callus TCL as explant sources)

Media (Media)	Persentase pencokelatan (Browning percentage)	Waktu pembentukan kalus (Time of callus induction), HSK	Skor kalus (Callus scores)	Volume kalus (Callus volumes), mm ³	Jumlah bakal tunas (Number of buds)	Warna kalus (Callus color)
ID-1	100%	0,0 ± 0,00	-	0,0 c	-	-
ID-2	33,3%	28,7±5,72	+	7,9 c	-	Hijau kuning (Green yellow)
ID-3	33,3%	30,6±6,68	++	26,2 bc	+	Hijau kuning (Yellow green)
ID-4	58,3%	32,6±3,43	+	2,0 c	-	Kuning (Yellow)
ID-5	41,7%	26,3±5,58	++	49,4 b	+	Hijau (Green)
ID-6	8,3%	30,1±4,56	+++	184,8 a	++	Hijau (Green)
ID-7	66,7%	26,6±5,08	+	4,1 c	-	Kuning (Yellow)
KK (CV), %	19,75					

(-) tidak terjadi morfogenesis; (+) sedikit kalus/plbs terbentuk (< 25% dari total eksplan); (++) cukup banyak kalus/plbs terbentuk (25–50% dari total eksplan); (+++) banyak kalus/plbs terbentuk (> 50% dari total eksplan). Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf 5% [(-) no morphogenesis; (+) less callus/plbs formation (< 25% of total explant); (++) moderate callus/plbs formation (25–50% of total explant); (+++) abundant callus/plbs formation (>50% of total explant). Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on DMRT, p=0.05]



Gambar 3. Proliferasi dan pertumbuhan kalus dari TCL kalus *Dendrobium Gradita 10* pada media ID-6 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA) (Proliferation and growth of callus derived from TCL of *D. Gradita 10* callus/plbs on ID-6 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA) medium)

positif terhadap keberhasilan induksi kalus. Eksplan umumnya mengalami pencokelatan yang kemudian diikuti dengan kematian eksplan. Pencokelatan mulai terlihat 5 HSK inisiasi. Pencokelatan terus meluas dan seluruh eksplan menjadi coklat kehitaman 10–15 HSK. Hasil tersebut memberikan bukti bahwa media dasar berpengaruh terhadap respons pertumbuhan dan perkembangan eksplan secara *in vitro* (Tabel 3, Gambar 3).

Pencokelatan eksplan ternyata juga merupakan masalah yang ditemukan pada studi ini. Pencokelatan terjadi sebagai akibat stress jaringan dampak dari pengirisan eksplan atau kalus/plbs. Pelukaan yang menyebabkan pecahnya vakuola yang merangsang munculnya senyawa fenol yang akan segera bereaksi dengan oksigen dengan enzim fenol oksidase membentuk senyawa kuinon yang bersifat racun dan

menyebabkan kematian sel (Hartmant 2002, Pirtila *et al.* 2008).

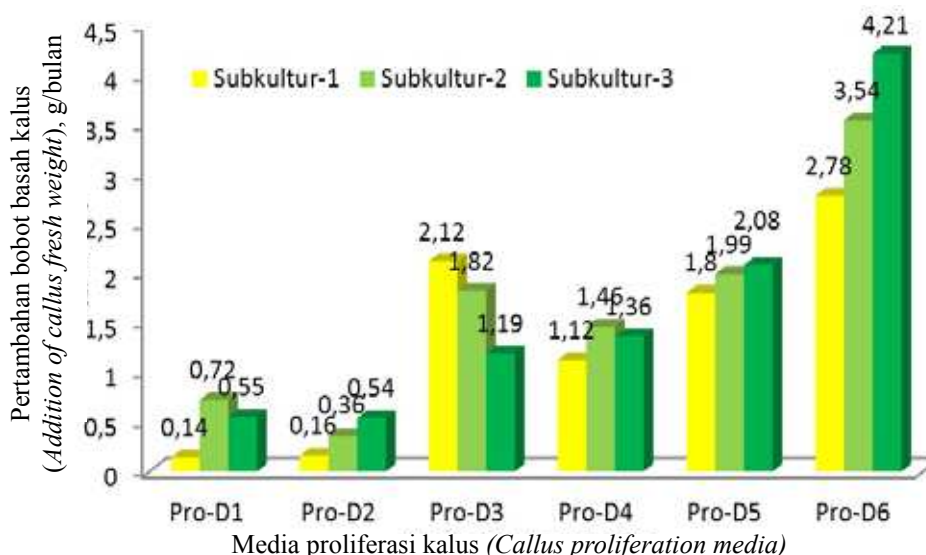
Pengaruh media dan periode subkultur terhadap proliferasi kalus embriogenik

Variasi media memberikan pengaruh yang berbeda terhadap perbanyakannya kalus *Dendrobium Gradita 10*. Hasil pengukuran kalus tercatat bahwa bobot basah, penambahan bobot basah dan laju pertumbuhan kalus tertinggi terdapat pada media Pro-D6 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA) baik pada subkultur I, II, maupun III, diikuti oleh media Pro-D3, Pro-D4, dan Pro-D5. Pada medium ini kecepatan pertumbuhan kalus mencapai 3,51 g/bulan, tetapi kalus yang dihasilkan berjenis kalus nonembriogenik, sedangkan kalus embriogenik ditemukan pada media Pro-D5 (½ MS + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA) (Tabel 4, 5, dan Gambar 4). Kehadiran TDZ dalam konsentrasi

Tabel 4. Pengaruh media proliferasi terhadap bobot basah dan pertambahan bobot basah kalus per periode subkultur (Effect of proliferation media on fresh weight and fresh weight addition of callus per period of subculture)

Media (Media)	Bobot kalus (Callus weight), g					
	Subkultur-I		Subkultur-II		Subkultur-III	
	Bobot basah (Fresh weight)	*Pertambahan bobot (Addition of weight)	Bobot Basah (fresh weight)	*Pertambahan bobot (Addition of weight)	Bobot basah (Fresh weight)	*Pertambahan bobot (Addition of weight)
Pro-D1	1,14 e	0,14 e	1,86 d	0,72 d	2,41 e	0,55 d
Pro-D2	1,16 e	0,16 e	1,52 e	0,36 d	2,06 f	0,54 d
Pro-D3	3,12 b	2,12 b	4,94 b	1,82 bc	6,13 c	1,19 c
Pro-D4	2,12 d	1,12 d	3,58 c	1,46 c	4,94 d	1,36 cd
Pro-D5	2,80 c	1,80 c	4,79 b	1,99 b	6,87 b	2,08 b
Pro-D6	3,78 a	2,78 a	7,32 a	3,54 a	11,53 a	4,21 a
KK (CV), %	4,61	8,01	2,62	12,55	2,57	18,87

Pro-D1 (ID-1 + 10% air kelapa); Pro-D2 (ID-2 tanpa ZPT), Pro-D3 (ID-3 tanpa ZPT), Pro-D4 (ID-4), (5) Pro-D5 (ID-5 + 0.3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA), dan Pro-D6 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA). 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 DMRT at $p=0.05$)

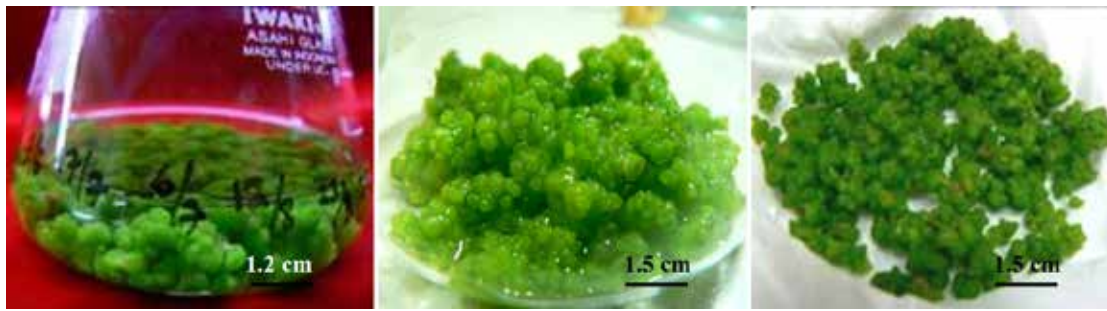


Gambar 4. Pertambahan bobot basah kalus per periode subkultur pada berbagai komposisi media proliferasi (Addition of callus fresh weight on different proliferation medium compositions per subculture period)

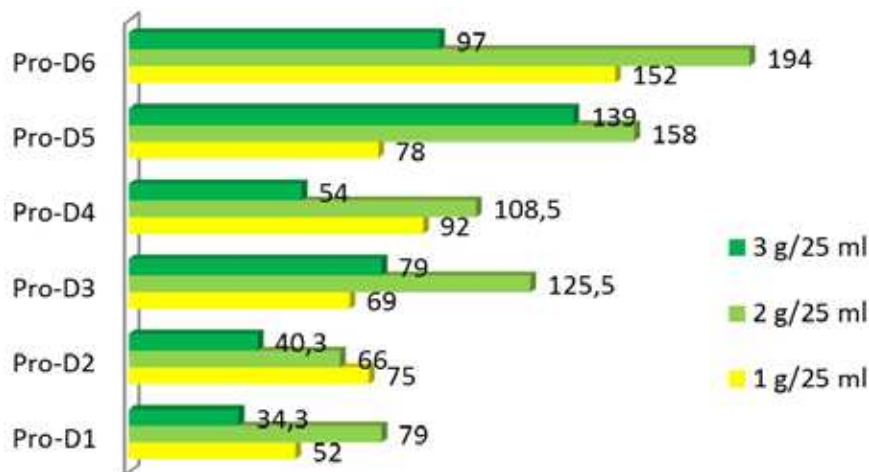
Tabel 5. Rerata laju pertumbuhan kalus pada media proliferasi kalus yang berbeda (The average of callus growth rate on different callus proliferation media)

Media (Media)	Rerata laju pertumbuhan kalus (Average of callus growth rate), g/bulan (month)	Kualitas kalus (Callus quality)
Pro-D1	0,47 ± 0,298 e	Cokelat, masif (Brown, massife)
Pro-D2	0,35 ± 0,191 e	Kecokelatan, masif (Brownish, massife)
Pro-D3	1,71 ± 0,475 c	Hijau, masif (Green, massife)
Pro-D4	1,31 ± 0,175 d	Hijau muda, remah (Light green, crumbs)
Pro-D5	1,96 ± 0,143 b	Hijau, remah (Green, crumb)
Pro-D6	3,51 ± 0,715 a	Hijau tua, masif (Dark green, massife)
KK (CV), %	5,79	

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 DMRT at $p=0.05$).



Gambar 5. Proliferasi kalus pada media Pro-D5 (½ MS + 0.3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA) (*Callus proliferation on Pro-D5 (½ MS + 0.3 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA) medium*)



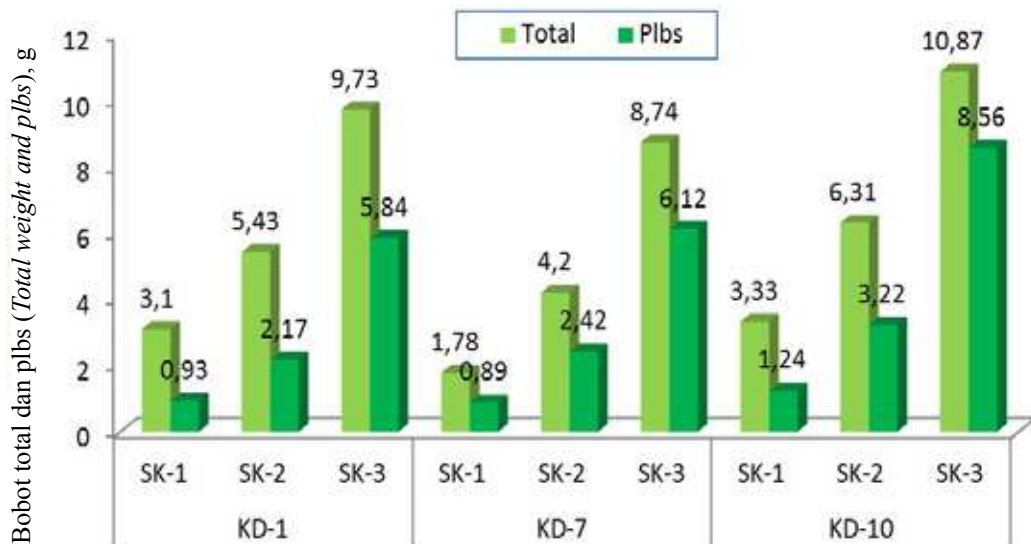
Pertambahan bobot kalus (*Callus weight addition*), %

Gambar 6. Pengaruh komposisi media dan kepadatan kalus terhadap pertambahan bobot kalus (*Effect of medium compositions and callus densities on addition fresh weight of callus*)

Tabel 6. Pengaruh media dan kepadatan kalus terhadap pertambahan bobot kalus (g) per periode subkultur (*Effect of media and callus density on addition of callus weight (g) per subculture period*)

Media (Media)	Kepadatan kalus (<i>Callus density</i>)			KK (CV) eksplan (Explant)	Kondisi kalus (<i>Callus condition</i>)
	1 g/25 ml	2 g/25 ml	3 g/25 ml		
..... g.....					
Pro-D1	0,52 b C	1,58 bc A	1,03 d B	3,92	Masif, hijau kusam (<i>Massife, dull green</i>)
Pro-D2	0,75 b B	1,32 c A	1,21 cd A	7,07	Masif, hijau segar (<i>Massife, fresh green</i>)
Pro-D3	0,76 b B	2,51 b A	2,37 bc A	23,77	Remah, hijau segar (<i>Crumb, fresh green</i>)
Pro-D4	0,92 a C	2,17 bc A	1,62 cd B	4,49	Masif, hijau kusam (<i>Massife, dull green</i>)
Pro-D5	0,78 b C	3,16 a B	4,17 a A	2,06	Remah, hijau segar (<i>Crumb, fresh green</i>)
Pro-D6	1,69 a C	3,88 a A	2,91 b B	3,69	Masif, hijau segar (<i>Massife, fresh green</i>)
KK (CV), %	14,29	9,21	10,83		

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom atau baris 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 DMRT at p=0.05*)



Media konversi dan periode subkultur (*Conversion medium and subculture periode*), Bulan (*Month*)

Gambar 7. Perbandingan bobot total kultur dan bobot embrio somatik/plbs pada tiga media konversi terbaik (KD-1, KD-7, dan KD-10) (*Comparison of total and embryo somatic/plbs weight on the best three medium conversions*)

Tabel 7. Tingkat keberhasilan konversi kalus menjadi embrio somatik/plbs (% per periode subkultur) pada berbagai komposisi media (*The success degree of callus conversion to somatic embryos/plbs (% per period of subculture) on the different medium compositions*)

Media konversi (<i>Conversion medium</i>)	Konversi kalus menjadi plbs (<i>Callus conversion to plbs</i>), %			CV media (<i>CV of media</i>)	Kualitas plbs (<i>Plbs quality</i>)
	Subkultur-I (<i>Subculture-I</i>)	Subkultur-II (<i>Subculture-II</i>)	Subkultur-III (<i>Subculture-III</i>)		
KD1	30,0 c C	39,9 c B	60,0 c A	8,75	Hijau segar (<i>Fresh green</i>)
KD2	20,7 e B	37,2 c A	38,4 d A	8,23	Hijau segar (<i>Fresh green</i>)
KD3	26,0 d B	32,3 d A	32,2 ef A	7,22	Hijau segar (<i>Fresh green</i>)
KD4	27,1 cd A	26,8 e A	25,6 g A	7,91	Hijau kusam (<i>Dull green</i>)
KD5	29,8 cd B	27,8 e B	36,8 de A	5,37	Hijau segar (<i>Fresh green</i>)
KD6	21,7 e A	19,3 f A	23,1 g A	10,79	Hijau kusam (<i>Dull green</i>)
KD7	50,0 a C	57,6 a B	70,0 b A	4,03	Hijau segar (<i>Fresh green</i>)
KD8	42,9 b A	31,3 d C	36,2 de B	5,06	Hijau segar (<i>Fresh green</i>)
KD9	26,8 d B	31,7 d A	27,4 fg B	4,74	Hijau tua segar (<i>Fresh dark green</i>)
KD10	45,3 b C	51,0 b B	78,8 a A	4,68	Hijau segar (<i>Fresh green</i>)
KK (CV), %	6,57	5,583	6,92		

KD1= ½ MS tanpa ZPT, KD2 = VW tanpa ZPT, KD3 = ¼ MS + 0,05 mg/l BAP + 0,01 mg/l NAA, KD4 = VW + 0,05 mg/l BAP + 0,01 mg/l NAA, KD5 = ¼ MS + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA, KD6 = VW + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA, KD7 = ¼ MS + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, dan KD8 = VW + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, KD9 = ½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA dan KD10 = ½ MS + 0,05 mg/l BA. Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom atau baris 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 DMRT at p=0.05*)

rendah masih diperlukan pada tahap proliferasi, terkait dengan percepatan pembelahan selnya (Mok & Mok 1987, Huetman & Preece 1993). Kondisi yang hampir sama dengan yang dilakukan Chung *et al.* (2005) yang mengkombinasikan TDZ (0, 0,3, 1, dan 3 mg/l) dengan NAA (0, 0,1 dan 1 mg/l) untuk proliferasi embrio, sedangkan pada media Pro-D1 dan Pro-D2 proliferasi kalus sangat lambat dan kalus mengalami pencokelatan.

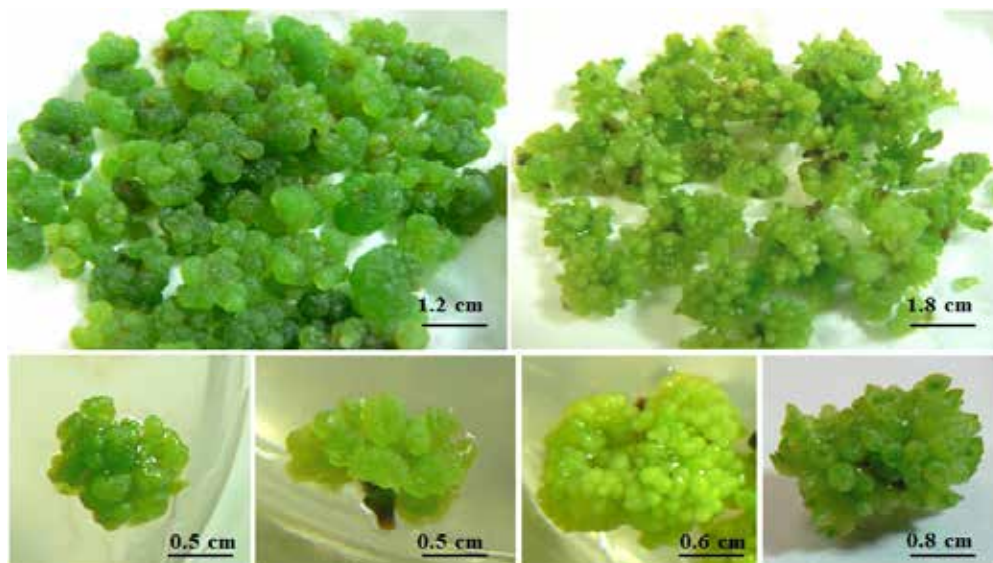
Pengaruh media dan kepadatan kalus terhadap proliferasi kalus embriogenik

Komposisi media dan kepadatan kalus juga berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus. Media Pro-D5 (ID-5 + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA) dan kepadatan kalus 3 g/25 ml merupakan kombinasi perlakuan yang optimal mendukung proliferasi kalus. Kombinasi tersebut menstimulasi pertumbuhan bobot kalus mencapai 4,2 g/bulan dengan kualitas kalus yang baik, remah, dan hijau segar dengan laju pertumbuhan kalus mencapai 194% per subkultur. Kombinasi perlakuan terbaik selanjutnya adalah media Pro-D6 dan Pro-D5 dengan kepadatan kalus 2 g/ 25 ml. Sementara kepadatan kalus 1 g /25 ml tidak sesuai untuk mendukung proliferasi kalus (Tabel 6, Gambar 5 dan 6). Ini menunjukkan bahwa kesesuaian kepadatan kalus dan media juga memengaruhi kemampuan pertumbuhan dan perkembangan sel-sel tanaman. Hasil yang sama diperoleh dari penelitian Winarto *et al.* (2013) bahwa kepadatan kalus 2 g/l dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml media ½ MS dengan penambahan 0,3 mg/l TDZ dan 0,1 mg/l NAA memberikan kemampuan proliferasi dan pertumbuhan kalus *Dendrobium* Zahra FR 62 yang optimal.

Konversi Kalus Menjadi Embrio Somatik/Plbs

Konversi kalus (prapendewasaan embrio somatik) merupakan tahap transisi dari proembrio menjadi embrio somatik. Konversi optimal kalus menjadi embrio somatik/plbs pada *Dendrobium* Gradita 10 ditemukan pada medium KD-1, KD-7, dan KD-10 pada semua periode subkultur (Tabel 7). Pada medium KD-10 (½ MS + 0,05 mg/l BA) konversi kalus menjadi embrio somatik mencapai 79% pada subkultur ke-3 diikuti oleh medium KD-7 (¼ MS + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA) dan KD-1 (½ MS tanpa zat pengatur tumbuh). Medium KD-9 (½ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/lBA, kontrol) meski menunjukkan kemampuan dalam mempercepat pertumbuhan kalus, tetapi tidak mampu mengkonversi kalus embriogenik menjadi embrio somatik/plbs (Tabel 9 dan 10, Gambar 7 dan 8).

Pada tahap konversi (prapendewasaan embrio somatik) kalus umumnya disubkultur pada media tanpa ZPT atau media yang mengandung sitokinin seperti BAP tanpa kehadiran auksin. Pemberian TDZ juga sudah tidak diperlukan pada tahap konversi kalus menjadi embrio somatik/plbs, pemberiannya justru menyebabkan terhambatnya proses konversi. Penurunan dan penghilangan TDZ dalam medium akan menstimulasi pembelahan yang normal dan sempurna hingga pembentukan embrio (Mok & Mok 1987, Huetman & Preece 1993). Pada krisan pra pendewasaan embrio somatik dilakukan pada media MS + 1 mg/l BAP (Manil & Senthil 2011), sedangkan Gow *et al.* (2009) melaporkan bahwa untuk pra pendewasaan embrio pada *Phalaenopsis* dilakukan pada media ½ MS + 0,5 mg/l BAP. Konversi kalus embriogenik



Gambar 8. Tahapan konversi kalus menjadi embrio somatik/plbs (*Conversion stage of callus to somatic embryos/plbs*)

Tabel 8. Kemampuan berkecambah embrio somatik/plbs *Dendrobium Gradita* 10 pada berbagai komposisi media (*Somatic embryos/plbs Dendrobium Gradita 10 germination capacity on different medium compositions*)

Media (Media)	Rerata jumlah embrio berkecambah per gerombol plbs (<i>The average number of plb germination per plbs clump</i>)			Rerata jumlah planlet dengan 1–3 daun per gerombol plbs (<i>The average number of germinated-plbs with 1–3 leaves per plbs clump</i>)		
	4 MSS*	8 MSS	12 MSS	4 MSS	8 MSS	12 MSS
RD-1	13,3 bcd	18,9 b	20,7 ab	5,67 a	14,0 ab	19,3 b
RD-2	14,7 abc	18,3 b	21,3 ab	6,33 a	15,3 a	21,7 a
RD-3	16,0 a	20,7 a	22,3 a	6,33 a	14,0 ab	20,0 b
RD-4	12,3 d	17,7 b	19,3 b	4,67 a	11,7 bc	16,3 c
RD-5	12,7 cd	18,3 b	20,7 ab	4,67 a	11,3 c	15,7 c
RD-6	15,0 ab	18,7 b	22,0 a	5,33 a	10,0 c	14,3 d
KK (CV), %	8,25	5,13	5,86	15,92	9,89	3,48

RD-1 = ½ MS tanpa zpt; RD-2 = ½ MS + 0.05 mg/l BA; RD-3 = ½ MS + 150 ml air kelapa; RD-4 = VW tanpa zpt; RD-5= VW + 0.05 mg/l BA; dan RD-6 = VW + 150 ml air kelapa * MSS (minggu setelah subkultur). Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom atau baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf 5%. (MSS: *weeks after subculture*). (*Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on DMRT at p=0.05*)

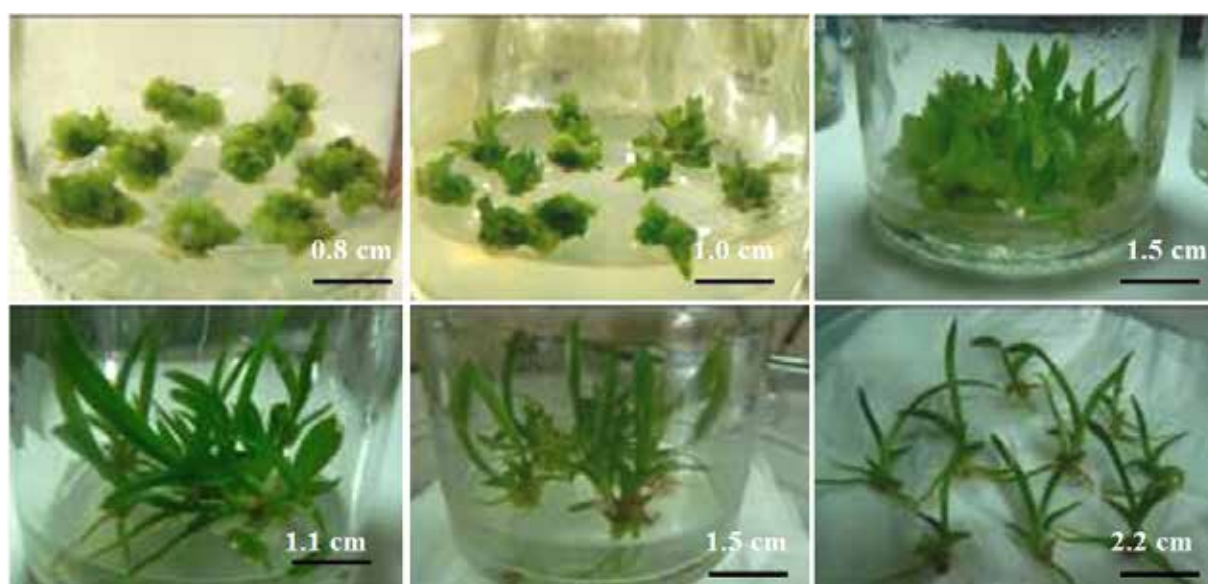
menjadi embrio somatik pada *Dendrobium Zahra* FR 62 dilakukan pada media ½ MS yang mengandung 0,05 mg/l BA (Winarto *et al.* 2013).

Perkecambahan Embrio Somatik/Plbs

Perkecambahan embrio merupakan tahap transisi dari tahap embrionik menjadi pascaembrionik dengan membentuk tunas dan akar. Tahap ini umumnya dilakukan pada media dengan kandungan ZPT yang sangat rendah atau bahkan pada media tanpa ZPT (Arnold *et al.* 2002, Purnamaningsih 2002). Pada penelitian ini kemampuan berkecambah embrio *Dendrobium Gradita* 10 bervariasi pada tiap media perlakuan (Tabel 8). Media RD-3 (½ MS + 150

ml/l air kelapa) memiliki kemampuan terbaik dalam menginduksi perkecambahan embrio somatik dengan rerata jumlah embrio berkecambah per gerombol embrio terbanyak pada semua periode subkultur (4, 8, 12 MSS) (16, 20,7, dan 22,3 embrio berkecambah per gerombol). Namun pada 12 MSS rerata jumlah embrio berkecambah pada media RD-3 tidak berbeda nyata dengan rerata jumlah embrio berkecambah pada lima komposisi media lainnya. Hasil ini membuktikan bahwa konversi dari embrio menjadi kecambah dapat dilakukan pada medium ½ MS tanpa ZPT.

Media terbaik yang mampu mendorong pertumbuhan kecambah hingga membentuk planlet (1–3 daun) ialah media RD-2 (½ MS + 0,05 mg/l BA) (6,3, 15,3,



Gambar 9. Tahapan perkecambahan embrio somatik/plbs *Dendrobium Gradita* 10 (*Somatic embryos/plbs germination stage on Dendrobium Gradita 10*)

dan 21,7 planlet per gerombol) dan berbeda nyata dengan lima komposisi media lainnya. Media terbaik berikutnya adalah RD-3 ($\frac{1}{2}$ MS + 150 ml/l air kelapa) dan RD-1 ($\frac{1}{2}$ MS tanpa ZPT). Jumlah planlet paling sedikit ditemukan pada media RD-6 (VW tanpa ZPT). Hasil ini membuktikan bahwa jenis media dasar dan kehadiran ZPT dalam konsentrasi rendah berpengaruh terhadap kualitas maupun kuantitas pertumbuhan kecambah menjadi planlet.

Dari hasil penelitian ini terlihat bahwa media $\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l BA adalah media terbaik untuk perkecambahan embrio. Media ini menghasilkan planlet lebih segar, vigor, dan berwarna hijau tua (Gambar 9). Hasil yang sama diperoleh pada penelitian Winarto *et al.* (2013) yang menggunakan media $\frac{1}{2}$ MS tanpa ZPT untuk konversi embrio menjadi inisiasi kecambah dan $\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l BA untuk pertumbuhan kecambah menjadi planlet *Dendrobium* Zahra FR 62 dan Chung *et al.* (2007) menggunakan medium $\frac{1}{2}$ MS tanpa ZPT untuk perkecambahan plbs *Dendrobium* Chiengmai Pink.

KESIMPULAN DAN SARAN

Teknologi perbanyak massa *Dendrobium* Gradita 10 melalui embriogenesis somatik berhasil dikembangkan dengan memperhatikan berbagai faktor, seperti jenis eksplan, komposisi media, periode subkultur, dan kepadatan eksplan.

1. Jenis eksplan terbaik untuk induksi kalus embriogenik adalah daun planlet.
2. Induksi kalus terbaik ditemukan pada media ID-6 ($\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA), sementara proliferasi lanjut kalus embriogenik pada media Pro-D5 ($\frac{1}{2}$ MS + 0,3 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA).
3. Kepadatan 2–3 g kalus /25 ml media merupakan kepadatan yang optimal untuk mendukung pertumbuhan kalus embriogenik. Pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dan plbs teroptimal terdapat periode subkultur-2.
4. Konversi kalus embriogenik menjadi embrio somatik (plbs) pada media KD-10 ($\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l BA).
5. Perkecambahan embrio terbaik pada media RD-2 ($\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg/l BA).
6. Keberhasilan pengembangan teknologi perbanyak massa *Dendrobium* Gradita 10 secara *in vitro* melalui embriogenesis somatik diharapkan memiliki dampak besar terhadap pengembangan

teknologi perbanyak massa benih untuk jenis *Dendrobium* yang lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian yang telah membiayai pelaksanaan kegiatan penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Nina Marlina dan Resa Wjaya Putra yang telah membantu selama pelaksanaan kegiatan penelitian berlangsung.

PUSTAKA

1. Anonim 2005, 'Anggrek *Dendrobium*', Trubus Info Kit I, Trubus Swadaya, Cimanggis Depok, vol. 01, hlm. 218.
2. Arnold, SV, Sabala, I, Bozhlov, P, Dyachok, J & Filonova, L 2002, 'Developmental pathway of somatic embryogenesis', *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, vol. 69, pp. 233-49.
3. Badan Pusat Statistik 2012, 'Luas panen, produksi, dan produktivitas tanaman anggrek 2009-2011', diunduh 9 Januari 2013, <www.bps.co.id>.
4. Chen, LR, Chen, JT & Chang, WC 2004, 'Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids', *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, vol. 76, pp. 11-5.
5. Chung, HH, Chen, JT & Chang, WC 2005, 'Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai Pink and subsequent plant regeneration', *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, vol. 41, no. 4, pp. 765-9.
6. Chung, HH, Chen, JT & Chang, WC 2007, 'Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*', *Biol. Plantarum*, vol. 51, no. 2, pp. 346-50.
7. Hartmant, HT, Kesler, DE, Davies, FT & Geneva, RL 2002, *Plant propagation, principles, and practices*, Pearson Education, Inc., New Jersey.
8. Huetteman, CA & Preece, JE 1993, 'Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture', *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, vol. 38, pp.105-19.
9. Hoesen, DSH, Witjaksono & Sukamto, LA 2008, 'Induksi kalus dan organogenesis kultur *in vitro* *Dendrobium lineale* Rolfe', *Berita Biologi*, vol. 9, hlm. 333-41.
10. Gaba, VP 2005, 'Plant growth regulators in plant tissue culture and development', in Trigiano, RN & Gray, DJ (eds.), *Plant Development and Biotechnology*, CRC Press., New York. pp. 87-100.
11. Gow, WP, Chen, JT & Chang, WC 2009, 'Effects of genotype, light regime, explants position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids', *Acta Physiol. Plant*, vol. 31, pp. 363-9.
12. Khosravi, AR, Kadir, MA, Kazemin, SB, Zaman, FQ & De Silva, AE 2008, 'Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv Serdang Beauty', *Afr. J. Biotech.*, vol. 7, pp. 4093-9.
13. Kuo, HL, Chen, JT & Chang, WC 2005, 'Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* Little Steve', *In Vitro Cel. Dev. Biol. Plant.*, vol. 41, no. 4, pp. 453-6.

14. Kurniati, R 2006, 'Perbanyakan anggrek *Phalaenopsis* melalui kultur tangkai', Makalah disampaikan pada Pelatihan Budidaya Anggrek di Balai Benih Induk, Jakarta.
15. Luo, JP, Zha, XQ & Jiang, ST 2003, 'Suspension culture of protocorm-like bodies from the endangered medical plant *Dendrobium huoshanense*', *J. Chin. Mat. Med.*, vol. 28, pp. 20-3.
16. Manil, T & Senthil, K 2011, 'Multiplication of *Chrysanthemum* through somatic embryogenesis', *Asian J. Pharm. Tech.*, vol. 1, pp. 13-6.
17. Mattjik, AA & Sumertajaya, IM 2006, 'Perancangan percobaan dengan aplikasi SAS dan minitab', IPB Press, Bogor.
18. Meesawat, U & Kanchanapoom, K 2002, 'In vitro plant regeneration through embryogenesis and organogenesis from callus culture of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.)', *Thamasat Int. J. Sc. Tech.*, vol. 7, no. 2, pp. 9-17.
19. Mok, MC & Mok, DW 1987, 'Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenilurea derivates in tissue culture system', *Hort.Sci.*, vol. 22, no. 6, pp.1194-201.
20. Mok, DWS & Mok, MC 2001, 'Cytokinin metabolism and action', *Annu. Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 52, pp. 69-118.
21. Murashige, T & Skoog, F 1962, 'A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures', *Physiol. Plant*, vol. 15, pp. 473-97.
22. Park, SY, Yeung, EC, Chakrabarty, D & Paek, KY 2002, 'An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture', *Plant Cell Report*, vol. 22, pp. 46-51.
23. Pirttila, AM, Podolich, O, Koskimaki, JJ, Hohtola, E & Hohtola, A 2008, 'Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of scots pine (*Pinus sylvestris* L.)', *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, vol. 95, pp. 47-55.
24. Purnamaningsih, R 2002, 'Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya', *Bul. Agro Bio.*, vol. 5, hlm. 51-8.
25. Roy, J & Banerjee, N 2003, 'Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. F', *Sci. Hort.*, vol. 97, pp 333-40.
26. Sadik, K, Rubahayo, PR, Magambo, MJS & Pilay, M 2006, 'Generation of cell suspensions of East African highland bananas through scalps', *Afr. J. Biotech.*, vol. 6, no.11, pp. 1352-7.
27. Sim, GE, Loh, CS & Goh, CJ 2006, 'High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* Maclame thong-in (*Orchidaceae*)', *Plant Biotechnol. Agro. Technol. Section*, Singapore.
28. Song, C, Kang, J, Ji, X, Fu, C, Wen, X, Yu, L & Qiao, G 2007, 'Efficient plant regeneration and genetic fidelity assessment of *in vitro*-derivated plants of *Dendrobium nobile* Endangered medical and ornamental Herb', in Teixeira da Silva, JA & Shima, K, (eds.), *Orchid Science and Biotechnology*, Japan: Global Science Books Ltd., pp. 51-5.
29. Tefera, W & Wannakrairoj, S 2006, 'Synergistic effects of some plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen)', *Afr. J. Biotech.*, vol.5, no. 10, pp. 1894-901.
30. Utami, PK & Ginting, B 2007, 'Media untuk meningkatkan induksi dan pertumbuhan plbs anggrek *Dendrobium*', *J. Hort. Edisi Khusus*, vol.1, hlm. 32-7.
31. Vacin, EF & Went, EW 1949, 'Some pH changes in nutrient solution', *Bot. Gaz.*, vol. 110, pp. 605-13.
32. Wei, M, Jiang, ST & Luo, JP 2007, 'Enhancement of growth and polysaccharide production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* by the addition of putrescine', *Biotechnol. Letter*, vol. 29, pp. 495-9.
33. 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, no.3, pp.513-29.
34. Winarto, B 2012, 'In vitro proliferation study of three Indonesian *Dendrobium*'s protocorm-like bodies (plbs) on different fertilizer media', *Prosiding Seminar Nasional Anggrek*, Medan-Sumatera Utara, hlm. 154-68.
35. Winarto, B, Rachmawati, F, Setyawati, AS & Teixeira da Silva, JA 2013, 'Mass propagation of *Dendrobium* Zahra FR 62, A new hybrid used for cut flowers, using bioreactor culture', *Sci. Hort.*, vol. 161, pp. 70-180.
36. Zha, XQ, Luo, JP & Jiang, ST 2007, 'Induction of immunomodulating cytokines by polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*', *Pharm. Biol.*, vol. 45, pp. 71-6.
37. Zhao, P, Wu, F, Feng, FS & Wang, WJ 2008, 'Protocorm-like body (plbs) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lind', *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, vol. 44, no. 3, pp. 178-85.