

# Peningkatan Pertumbuhan dan Regenerasi Eksplan Hasil Kultur Anther *Anthurium* Melalui Perbaikan Media Kultur

Winarto, B.

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

Naskah diterima tanggal 16 September 2010 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 1 November 2010

**ABSTRAK.** Regenerasi kalus merupakan bagian yang paling sulit dalam kultur anther *anthurium* (*Anthurium andraeanum*), karena respons pembentukan tunas yang lambat. Studi pertumbuhan dan regenerasi eksplan hasil kultur anther *anthurium* pada media regenerasi yang berbeda dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias dari bulan Januari sampai Desember 2008. Penelitian bertujuan mengetahui respons pertumbuhan dan regenerasi variasi eksplan hasil kultur anther *anthurium* pada media regenerasi yang berbeda. Penelitian ini menggunakan kalus tumbuh lambat, kalus haploid, daun, dan petiol muda tanaman haploid sebagai eksplan. Medium Winarto (MW) dan Winarto-Rachmawati (MWR) merupakan media dasar yang digunakan dalam penelitian ini. Penelitian terdiri atas tiga percobaan untuk mempelajari pertumbuhan dan regenerasi, yaitu (1) kalus tumbuh lambat, (2) kalus haploid pada media regenerasi yang berbeda (MR-1 s/d MR-6), dan (3) daun dan petiol muda dari tanaman haploid menggunakan medium regenerasi terseleksi. Percobaan pertama dan kedua disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), sementara percobaan ketiga disusun menggunakan RAL pola faktorial masing-masing dengan empat ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan dan kemampuan regenerasi eksplan hasil kultur anther *anthurium* berhasil ditingkatkan melalui perbaikan media kultur. Pertumbuhan kalus terbaik dari eksplan kalus tumbuh lambat ditemukan pada MR-4, sedang kalus haploid pada MR-1. Jumlah bakal tunas per eksplan mencapai sekitar 20 bakal tunas, tetapi pembentukan tunas tertinggi yaitu 4,8 tunas per eksplan ditemukan pada MR-6. Daun muda tanaman haploid no. 400 merupakan jenis eksplan dan tanaman haploid dengan respons pembentukan tunas tertinggi yang mencapai 6,0 tunas per eksplan dibandingkan eksplan dan tanaman haploid yang lain. Media terseleksi hasil penelitian dapat diaplikasikan untuk menyelesaikan masalah regenerasi eksplan pada kultur *in vitro* *anthurium* yang lain.

Katakunci: Pertumbuhan; Regenerasi; Kalus tumbuh lambat; Kalus haploid; Tanaman haploid; Kultur anther *anthurium*.

**ABSTRACT.** Winarto, B. 2010. **Increase of Growth and Explants Regeneration Derived from Anther Culture of *Anthurium* via the Improvement of Culture Medium.** Callus regeneration was an important problem in anther culture of *anthurium* due to slow response in shoot regeneration. A study of growth and regeneration of explants derived from anther culture of *anthurium* in different regeneration media were conducted at Tissue Culture Laboratory of Indonesian Ornamental Crops Research Institute from January to December 2008. The objective of the research was to determine the growth and regeneration of explants on different regeneration media. Slow growth, haploid callus, young leaf, and petiole of different haploid plants were used in the study, while media of MW and MWR were two basic media applied in the experiment. There were three experiments in the research i.e. to study the growth and regeneration of (1) slow growth, (2) haploid callus on different regeneration media, and (3) young leaf and petiole of different haploid plants on selected regeneration medium. The experiment I and II were arranged with a completely randomized design (CRD) and the experiment III used factorial CRD with four replications. Results of the studies indicated that growth and regeneration capacity of explants derived from anther culture of *anthurium* were successfully increased via culture medium improvement. The best growth response of slow growth callus was determined on MR-4, while haploid callus was on MR-1. Initial shoots produced per explant were up to  $\pm 20$  initial shoots, but the highest shoot number up to 4.8 shoots produced per explant was established on MR-6. Young leaves of haploid plant no. 400 were the appropriate explant and the donor plant in obtaining the highest callus formation, growth and regeneration with 6.0 shoots per explant. The selected media established in the study can be applied to overcome explant regeneration problems in *in vitro* culture of other *anthurium*s.

Keywords: Growth; Regeneration; Slow growth callus; Haploid callus; Haploid plant; Anther culture of *anthurium*.

---

Perbanyak tanaman secara *in vitro* dapat dilakukan melalui regenerasi langsung (*direct regeneration*) maupun tak langsung (*indirect regeneration*) melalui pembentukan tunas adventif dan embrio (George *et al.* 2007). Regenerasi secara tak langsung umumnya didahului pembentukan kalus, kemudian kalus diregenerasikan melalui

perlakuan tertentu menghasilkan tunas adventif, embrio, dan akar adventif. Regenerasi kalus menjadi tunas adventif, embrio, maupun akar adventif pada beberapa tanaman mudah dilakukan dengan tingkat keberhasilan yang tinggi. Aswath dan Choudhary (2002) berhasil meregenerasi kalus *Gerbera jamesonii* Bolus menjadi tunas

hingga 83% pada medium MS yang ditambah 2 mg/l *α-naphthalene acetic acid* (NAA) dan 1 mg/l *6-benzylaminopurine* (BAP), sedang Kumar dan Kanwar (2007) berhasil meregenerasi kalus hingga mencapai 80% pada medium MS yang mengandung 1 mg/l *N<sup>6</sup>-benzyladenine* (BA). Pada *Asparagus officinalis* cv. Argenteuil, regenerasi kalus menjadi tunas mencapai 89% terjadi pada medium MS yang mengandung 5 mg/l 2-iP dan 1 mg/l IAA (Pontaroli dan Camadro 2005). Regenerasi tunas dari kalus bawang putih hingga 74% terjadi pada medium MS yang mengandung 1 mg/l NAA dan 1 mg/l BAP (Salam *et al.* 2008), sedang pada lili regenerasi mencapai 80% ditemukan pada medium MS dengan 22 μM BA (Mori *et al.* 2005). Pada *Plumbago zeylanica* regenerasi tunas mencapai 83% pada medium MS yang mengandung 3,5 mg/l BAP dan 0,3 mg/l NAA (Mallikadevi *et al.* 2008), sedang pada anyelir regenerasi tunas dapat mencapai 85% ditemukan pada medium MS tanpa hormon (Karami 2008). Pada *Vigna unguiculata* regenerasi kalus mencapai 87,5% (Odutayo *et al.* 2005), *Oncidium* Gower Ramsey mencapai 94% pada medium MS ditambah 0,1 mg/l NAA dan 3 mg/l thidiazuron (TDZ) (Chen dan Chang 2000).

Regenerasi kalus menjadi tunas atau planlet merupakan tahapan yang sangat sulit dilaksanakan. Pada *Terminalia chebula* Retz, regenerasi kalus menjadi planlet secara maksimal hanya mencapai 46% pada medium MS ditambah 0,5 mg/l BA (Anjaneyulu *et al.* 2004). Pada *Salvia canariensis* persentase pembentukan tunas hingga 48% ditemukan pada medium MS yang mengandung 4,44 μM BAP dan 2,96 μM NAA (Mediros-Molina 2004). Pada *Trapa* sp. tidak hanya konversi kalus menjadi tunas yang menjadi masalah, tetapi induksi kalus juga sulit dilakukan pada kultivar yang digunakan (Hoque *et al.* 2007). Pada stroberi, regenerasi kalus umumnya menghasilkan planlet yang kurang vigor dengan tangkai daun yang lebih pendek dan ukuran daun yang lebih kecil. Sekitar 10% regenerasi yang dihasilkan berkembang menjadi ancaman yang abnormal (*dwarf type variants*) (Nehra *et al.* 1992).

Pada kultur *in vitro* *Anthurium*, tunas adventif dapat diregenerasikan secara tidak langsung melalui pembentukan kalus (Vargas *et al.* 2004, Rachmawati *et al.* 2007, Winarto dan Rachmawati 2007, Viégas *et al.* 2007, Bejov *et*

*al.* 2008). Sementara induksi tunas aksiler dalam perbanyakkan *Anthurium* tidak memberikan hasil maksimal (Winarto 2007). Kalus tumbuh lambat dan kalus haploid hasil kultur anther *Anthurium* juga merupakan tipe kalus yang sulit diregenerasi membentuk tunas (Rachmawati *et al.* 2007, Winarto dan Rachmawati 2007, Winarto 2009). Kalus tersebut juga memiliki pertumbuhan yang lambat dan mudah mengalami pencoklatan.

Perbaikan media merupakan salah satu solusi terbaik dalam mengatasi masalah regenerasi kalus yang lambat, khususnya dari hasil kultur anther *Anthurium*. Hasil perbaikan media yang sesuai untuk kedua kalus tersebut diharapkan bermanfaat juga untuk inisiasi dan regenerasi eksplan tanaman haploid. Medium Winarto (MW) dan medium Winarto-Rachmawati (MWR) merupakan dua komposisi media dasar yang sangat potensial untuk menginduksi kalus pada kultur anther *Anthurium* (Rachmawati *et al.* 2007, Winarto dan Rachmawati 2007, Winarto 2009). MWR yang mengandung 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, dan 20 g/l sukrose merupakan medium optimal untuk meregenerasi kalus tumbuh cepat dalam membentuk tunas (Rachmawati *et al.* 2007). Aplikasi dan optimasi media dasar dan media terseleksi tersebut diharapkan mampu meningkatkan pertumbuhan dan kemampuan regenerasi kalus tumbuh lambat dan haploid serta eksplan tanaman haploid hasil kultur anther. Keberhasilan regenerasi kalus tumbuh lambat, haploid, dan eksplan dari tanaman haploid, hingga membentuk tunas memiliki arti yang sangat penting pada penyiapan planlet berkualitas tinggi terkait dengan pengembangan teknik kultur anther *Anthurium*.

Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh berbagai media regenerasi, jenis kalus, jenis eksplan, dan tanaman haploid hasil kultur anther *Anthurium* terhadap pertumbuhan kalus dan pembentukan tunas. Hipotesis yang diajukan ialah bahwa minimal terdapat satu medium regenerasi yang optimal untuk meregenerasi kalus tumbuh lambat dan haploid, eksplan, dan tanaman haploid hasil kultur anther *Anthurium*.

## BAHAN DAN METODE

### Penyiapan Bahan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias dari bulan

Januari sampai Desember 2008. Bahan penelitian yang digunakan ialah kalus tumbuh lambat, kalus haploid, daun, dan petiol muda tanaman haploid no. 1, 16, 50, 166, 231, 306, 323, 330, dan 400. Medium dasar yang digunakan dalam penelitian ialah medium MWR dan MW (Winarto 2009).

Kalus tumbuh lambat diperoleh dengan menanam setengah anther pada medium regenerasi. Anther diisolasi dari daerah transisi spadik yang 50% stigmanya berada dalam masa reseptif optimal. Medium MWR (komponen makro, mikro, vitamin, dan sumber karbon) mengandung 1,5 mg/l thidiazuron (TDZ), 0,75 mg/l 6 BAP, dan 0,02 mg/l NAA digunakan dalam penelitian ini. Medium dipadatkan dengan 1,8 g/l *gelrite* (Winarto 2009). Media dipersiapkan dalam botol *chicken brand* (diameter 5 cm, tinggi 7 cm) yang diisi 10 ml MWR. Media disterilisasikan pada suhu 121°C, 15 kPa, selama 20 menit (*pressure steam sterilizer vertical cylindrical* LS. 001). Kultur setengah anther selanjutnya diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 24±1°C, selama ± 2 bulan. Kalus yang beregenerasi dipindahkan pada inkubasi terang dengan 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen (TL intensitas cahaya ± 1000 lux, diukur dengan digital lux meter, lutron LX 101) 24±1°C, dan kelembaban 65 ± 2,5% hingga ukuran kalus bertambah besar (diameter ± 3-5 mm). Kalus secara utuh disubkultur hingga ukuran mencapai ± 1,5 cm. Pada ukuran tersebut kalus memiliki warna beragam, antara lain hijau, hijau pucat, kuning, dan kuning kemerahan/merah (Gambar 1). Kalus tersebut diperbanyak secara terpisah dan disubkultur pada botol yang berbeda pada medium dan diinkubasi pada kondisi terang yang sama. Kalus berwarna merah/kuning kemerahan merupakan kalus tipe tumbuh lambat. Kalus hasil perbanyak selanjutnya dipotong-potong dengan ukuran yang hampir seragam (panjang x lebar x tinggi = 0,9 x 0,8 x 0,8 cm). Potongan kalus selanjutnya dikulturkan pada media regenerasi yang berbeda pada percobaan pertama.

Kalus haploid diperoleh dengan mengkultur daun dan batang tunas haploid hasil kultur in vitro pada MWR dan diinkubasikan pada kondisi gelap selama ±2 bulan. Kalus yang tumbuh pada daun dan batang muda selanjutnya diperbanyak dengan cara disubkultur pada MWR dan diinkubasi pada kondisi terang 3-4 kali. Kalus hasil perbanyak inilah yang selanjutnya digunakan dalam percobaan

kedua pada media regenerasi yang berbeda. Kalus dipotong-potong dengan ukuran yang sama dengan kalus tumbuh lambat.

Eksplan daun dan tangkai daun muda dipanen dari tanaman haploid no. 1, 16, 50, 166, 231, 306, 323, 330, dan 400. Eksplan disterilisasi dengan air mengalir selama 1 jam, kemudian digojlok dengan larutan detergen 1% selama 30 menit, 1% benomil dan streptomisin sulfat selama 30-45 menit, selanjutnya dibilas dengan air destilasi hingga 5-6x kali. Eksplan selanjutnya dibawa ke laminar untuk sterilisasi lanjutan. Eksplan direndam dalam 1% larutan natrium hipoklorida (NaOCl) selama 10 menit, 2% NaOCl selama 5 menit, dan alkohol 80% selama 3 menit. Setelah itu eksplan dibilas dengan air destilasi steril 5-6 kali masing-masing 5 menit. Eksplan kemudian dikeringkan pada erlenmeyer besar dengan posisi terbalik untuk mengeringkan eksplan dari pengaruh sisa air steril dengan tisu kering steril. Eksplan selanjutnya dipotong dan dikultur pada medium terseleksi pada percobaan ketiga.

### **Pertumbuhan dan Regenerasi Kalus Tumbuh Lambat dan Haploid**

Pada percobaan pertama, kalus tumbuh lambat dikulturkan pada media regenerasi yang berbeda, yaitu (1) MR-1, MWR yang mengandung 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, dan 20 g/l sukrose (kontrol), (2) MR-2, MWR yang mengandung 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP, dan 0,02 mg/l NAA, dan 60 g/l sukrose, (3) MR-3, MWR yang ditambah dengan 413 mg/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA, dan 60 g/l sukrose, (4) MR-4, MW yang mengandung 0,5 mg/l 2,4-*dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, dan 20 g/l sukrose, (5) MR-5, MW yang mengandung 0,5 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 5,0 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, dan 60 g/l sukrose, dan (6) MR-6, MW yang mengandung 0,5 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 10,0 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, dan 20 g/l sukrose, sedangkan pada percobaan kedua, media regenerasi yang sama digunakan untuk menstimulasi pertumbuhan dan regenerasi kalus haploid.

Percobaan I dan II disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat ulangan. Tiap perlakuan terdiri atas tiga botol pada kalus tumbuh lambat dan dua botol pada kalus haploid. Tiap botol terdiri atas 3-4 kalus yang diamati seluruhnya. Perbedaan unit tersebut disebabkan oleh perbedaan jumlah eksplan yang tersedia.

## Induksi dan Regenerasi Eksplan pada Tanaman Haploid

Pada percobaan III, dua eksplan yang berbeda, yaitu (1) daun dan (2) petiol muda dan tanaman haploid yang berbeda, yaitu no. 1, 16, 166, 231, 306, 323, 330, dan 400 diuji kemampuannya dalam membentuk kalus dan beregenerasi pada medium terseleksi hasil percobaan I dan II. Percobaan III disusun menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial dengan empat ulangan. Tiap ulangan terdiri atas tiga botol. Tiap botol terdapat tiga eksplan yang dikulturkan.

### Parameter

Parameter yang diamati dalam percobaan ini ialah:

- (1) Volume kalus, diukur 2 bulan setelah kultur inisiasi ( $\text{mm}^2$ ),
- (2) Skoring jumlah bakal tunas, dihitung 2 bulan setelah kultur inisiasi (SJBT) – s/d +++++, di mana:
  - = tidak ada bakal tunas yang teramati,
  - + = terdapat 1-5 bakal tunas,
  - ++ = terdapat 6-10 bakal tunas,
  - +++ = terdapat 11-20 bakal tunas, dan
  - +++++ = terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan,
- (3) Jumlah tunas,
- (4) Jumlah akar, dihitung  $\pm$  4 bulan setelah kultur inisiasi. Pengamatan secara periodik dilakukan 1 minggu setelah kultur inisiasi bertujuan mengetahui setiap perubahan eksplan selama masa inkubasi.

### Analisis Data

Data yang dikumpulkan dianalisis menggunakan analisis varian program SAS Release window 6.12 (Westfall *et al.* 1999). Jika terdapat perbedaan nilai rerata perlakuan, maka diuji lanjut menggunakan uji jarak berganda Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan dan Regenerasi Kalus Tumbuh Lambat dan Haploid

Kalus tumbuh lambat hasil kultur anther *Anthurium* ternyata memberi respons yang berbeda

terhadap berbagai media regenerasi. Media regenerasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan, pembentukan bakal tunas, dan tunas. Bakal tunas mulai terbentuk 1,0-1,5 bulan setelah kultur inisiasi (BSKI). Bakal tunas terus tumbuh dan beberapa di antaranya membentuk tunas sempurna. Tunas-tunas tersebut mulai terlihat jelas 2,5-3,0 bulan setelah kultur inisiasi dengan 1-2 daun. Meskipun jumlah bakal tunas yang teregenerasi cukup banyak, tetapi jumlah tunas yang tumbuh normal dan menghasilkan daun sempurna hanya berkisar antara 1-8 tunas.

Pertumbuhan kalus menunjukkan hasil bervariasi. Tingkat pertumbuhan tertinggi dengan volume  $421 \text{ mm}^3$  dicapai pada media tumbuh MR-4. Pertumbuhan kalus tersebut berkorelasi positif dengan jumlah bakal tunas yang dihasilkan (20 bakal tunas per eksplan), tetapi tidak berkorelasi terhadap pembentukan tunasnya (Tabel 1). Berdasarkan jumlah tunas yang dihasilkan per eksplan, medium MR-6 merupakan medium yang terbaik untuk regenerasi tunas. Pembentukan tunas pada medium tersebut berkisar antara 3-8 tunas dengan nilai rerata 4,8 tunas per eksplan.

Media regenerasi juga memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus haploid. Pertumbuhan kalus ditunjukkan oleh adanya penambahan panjang, lebar, dan tinggi kalus. Pertumbuhan kalus selanjutnya diikuti dengan regenerasi bakal tunas, yang mulai terlihat jelas 1,5 BSKI. Bakal tunas pada beberapa media terus tumbuh hingga membentuk tunas dengan 1-3 daun yang membuka sempurna. Jumlah tunas yang teregenerasi berkisar antara 1-10 tunas per eksplan. Jumlah tertinggi (10 tunas per eksplan) ditemukan pada kalus yang ditanam pada media MR-4 dan MR-6.

Pertumbuhan kalus yang baik pada media regenerasi uji tidak selalu diikuti oleh regenerasi bakal tunas dan pembentukan tunas (Tabel 2). Pada medium MR-1 pertumbuhan kalus yang mencapai  $529 \text{ mm}^3$ , dengan jumlah bakal tunas yang lebih banyak (++++/++++), tetapi jumlah tunas yang terbentuk hanya 2,1 tunas per eksplan. Jumlah tunas tertinggi (4,4 tunas per eksplan) ditemukan pada kalus yang dikultur pada MR-4. Hasil terbaik kedua ditunjukkan oleh medium MR-6 dengan 3,3 tunas per eksplan.

**Tabel 1. Respons pertumbuhan dan regenerasi kalus tumbuh lambat pada media regenerasi yang berbeda (*Response of growth and regeneration of slow growth callus on different regeneration media*)**

Medium regenerasi ( <i>Regeneration medium</i> )	Volume kalus ( <i>Callus volume</i> ), m <sup>3</sup>	Skor jumlah bakal tunas ( <i>Score of initial shoot number</i> )	Jumlah tunas per eksplan ( <i>Shoot number per explant</i> )
MR-1	119,9 c <sup>*</sup> )	+++/>++++	0,3 c
MR-2	234,5 c	++/>+++	0,8 c
MR-3	267,1 bc	+++	2,6 b
MR-4	421,3 a	+++/>++++	1,8 bc
MR-5	356,3 ab	++/>++++	1,5 bc
MR-6	400,2 a	+++/>++++	4,8 a
Koefisien variasi ( <i>CV</i> ), %	19,74		18,37

\* -Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 95% (*Mean followed by the same letter in the same column were not significantly different based on Duncan Multiple Range Test (DMRT) at p=0.05*)

Dari dua percobaan tersebut terlihat bahwa medium MR-6 (MW yang mengandung 0,5 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 10,0 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, dan 20 g/l sukrose) dan MR-4 (MW yang mengandung 0,5 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, dan 20 g/l sukrose) merupakan medium yang optimal untuk meregenerasi tunas dari kalus. Hasil ini menunjukkan bahwa regenerasi kalus tumbuh lambat dan haploid hingga membentuk tunas memerlukan medium yang berbeda dengan medium optimal untuk regenerasi kalus tumbuh cepat (Rachmawati *et al.* 2007). MWR dengan 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, dan 30 g/l sukrose yang optimal untuk menstimulasi kecepatan pertumbuhan kalus, pembentukan bakal tunas, dan tunas hingga 18 tunas per eksplan pada kalus tumbuh cepat, tidak mampu menginduksi kalus tumbuh lambat dan kalus haploid dalam membentuk tunas (Tabel 1 dan 2).

Pada studi kultur *in vitro* *Anthurium* yang lain, dilaporkan bahwa regenerasi kalus hingga membentuk tunas secara maksimal ditemukan

pada medium MS ditambah dengan 0,54 µM NAA (Joseph *et al.* 2003), medium M4 yang mengandung 0,1 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l kinetin, dan 0,5 mg/l TDZ (Winarto 2007), medium MS yang mengandung 0,5 mg/l BAP (Viégas *et al.* 2007), MS ditambah dengan 0,1 mg/l NAA dan 0,25 mg/l BAP (Gantait *et al.* 2008), ½ MS dengan NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> yang diturunkan hingga 250 mg/l, 0,1 mg/l 2,4-D, dan 1,0 mg/l BA (Atak dan Çelik 2009), ¼ MS ditambah dengan 1,0 mg/l BAP (Jahan *et al.* 2009). Pada penelitian Yu *et al.* (2009) regenerasi kalus membentuk embrio pada *Anthurium* mudah dilakukan pada medium ½ MS tanpa hormon setelah kalus disubkultur secara berulang pada medium ½ MS yang mengandung 0,9 µM 2,4-D dan 4,44 µM BAP.

Perbaikan media untuk meningkatkan kecepatan pertumbuhan dan kemampuan morfogenesis eksplan tanaman dalam kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan mengubah, mengurangi, menambah, dan menurunkan beberapa komponen penting yang ada dalam media (Niedz dan Evens 2007). Pada penelitian ini perbaikan medium MW dilakukan dengan

**Tabel 2. Pengaruh media regenerasi terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus haploid (*Effect of regeneration media on growth and regeneration of haploid callus*)**

Medium regenerasi ( <i>Regeneration medium</i> )	Volume kalus ( <i>Callus volume</i> ) m <sup>3</sup>	Skor jumlah bakal tunas ( <i>Score of initial shoot number</i> )	Jumlah tunas per eksplan ( <i>Shoot number per explant</i> )
MR-1	529,0 a <sup>*</sup> )	+++/>++++	2,1 b
MR-2	115,3 c	+/>++	0,8 c
MR-3	460,3 ab	+/>++	0,4 c
MR-4	443,4 ab	+++	4,4 a
MR-5	455,0 ab	+/>++	1,4 bc
MR-6	337,5 b	+++	3,3 a
Koefisien variasi ( <i>CV</i> ), %	19,59		14,07

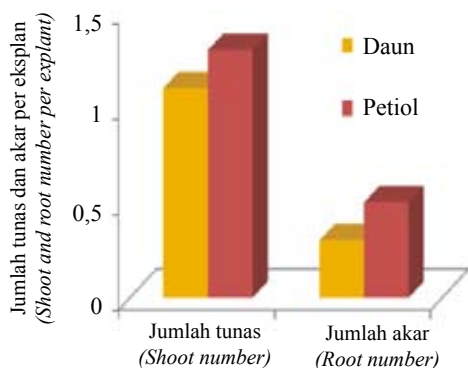
menambahkan 0,5 mg/l 2,4-D, meningkatkan konsentrasi TDZ dari 0,5 menjadi 1,0 mg/l, menurunkan konsentrasi BAP dari 0,75 menjadi 0,5 mg/l, dan mereduksi sukrose dari 30 g/l menjadi 20 g/l (MR-4) atau meningkatkan konsentrasi BAP MR-4 hingga mencapai 10,0 mg/l (MR-6). Perbaikan komposisi media tersebut berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus tumbuh lambat dan haploid. Perbaikan medium dengan cara mengubah konsentrasi beberapa komponen penting medium untuk meningkatkan kapasitas regenerasi eksplan juga dilaporkan pada kultur anther lili (Han *et al.* 1997), kultur *in vitro* *G. jamesonii* (Aswath dan Choudhary 2002), *Glycine max* (Radhakrishnan dan Ranjithakumari 2007), dan *Viola wittrockiana* (Wang dan Bao 2007).

Perbaikan media berhasil meningkatkan pertumbuhan dan regenerasi eksplan dalam membentuk tunas, di antaranya merubah 2 mg/l

pikloram dan 2 mg/l zeatin pada medium MS dengan 0,1 atau 0,5 mg/l pikloram dan 0,01 mg/l BA merupakan medium regenerasi yang sesuai untuk kultur anther lili (Han *et al.* 1997). Pada *G. jamesonii*, peningkatan konsentrasi BAP dari 0,4 menjadi 1,0 mg/l, penurunan konsentrasi NAA dari 4,0 menjadi 2,0 mg/l, dan 3% (w/v) sukrose pada medium MS mampu meningkatkan kemampuan organogenesis kalus hingga 83,3% (Aswath dan Choudhary 2002). Penghilangan 13,5 mg/l 2,4-D pada medium B5 yang mengandung 13,3  $\mu$ M BAP menjadi medium yang optimal untuk regenerasi tunas kedelai (Radhakrishnan dan Ranjithakumari 2007). Peningkatan kekuatan medium dari setengah kekuatan menjadi kekuatan penuh, penggantian peran 2,4-D dan BAP dengan 2,9  $\mu$ mol/l GA<sub>3</sub>, 23,6  $\mu$ mol/l AgNO<sub>3</sub>, 0,02% arang aktif, dan 4,5  $\mu$ mol/l TDZ pada medium MS sesuai untuk regenerasi tunas *V. wittrockiana* (Wang dan Bao 2007).



**Gambar 1.** Respons pertumbuhan dan regenerasi daun dan petiol pada MR-6. A-B, Kalus dari daun sampel tanaman haploid no. 400 dan hasil regenerasinya, C-D, kalus dari petiol sampel tanaman haploid no. 16 dan hasil regenerasinya (*Response of growth and regeneration of young leaf and petiole on MR-6 medium. A-B, callus from leaf of haploid plant no. 400 and its regeneration result, C-D, callus from petiole of haploid plant no. 16 and its regeneration result*)



**Gambar 2. Respons pembentukan tunas dan akar pada eksplan yang berbeda (Response of shoot and root formation in different types of explant)**

**Induksi dan Regenerasi Kalus pada Tanaman Haploid**

Jenis eksplan dan tanaman haploid yang berbeda juga memberikan respons pertumbuhan yang berbeda. Kedua perlakuan menunjukkan pengaruh yang nyata hingga sangat nyata terhadap jumlah tunas dan jumlah akar per eksplan. Pengaruh interaksi kedua perlakuan tersebut juga nyata pada kedua parameter dan respons jenis tanaman memberikan pengaruh yang lebih besar dibandingkan jenis eksplan. Kedua perlakuan ini mampu menstimulasi pertumbuhan kalus tinggi pada eksplan daun (+++ s.d. +++) dan lebih rendah pada petiol ( ++ s.d. +++) , tetapi skor pertumbuhan tunasnya berkisar antara 0-10 (- s.d. ++ ) tunas.

Pada percobaan ini inisiasi kalus mulai terlihat 25-30 hari setelah kultur inisiasi. Kalus

terus tumbuh dan berkembang dalam bentuk maupun ukuran. Lebih kurang 2 BSKI kalus mulai membentuk bakal tunas. Pembentukan bakal tunas makin terlihat jelas pada 2,5 BSKI. Bakal tunas terus tumbuh dan beberapa tunas dengan 1-2 daun terlihat jelas pada 3,5 BSKI. Jumlah tunas yang dihasilkan berkisar antara 1-10 tunas per eksplan. Pembentukan, pertumbuhan, dan regenerasi kalus terbaik terlihat pada eksplan daun tanaman haploid no. 400 dan petiol tanaman haploid no. 16 (Gambar 1).

Petiol muda merupakan jenis eksplan yang lebih responsif dalam pembentukan tunas dan akar, meskipun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Eksplan ini mampu membentuk jumlah tunas hingga 1,3 tunas per eksplan dengan 0,5 akar per eksplan (Gambar 2). Tanaman haploid no. 400 merupakan tanaman yang memiliki kemampuan regenerasi tunas dan akar yang tertinggi hingga 4,1 tunas per eksplan dan 1,3 akar per eksplan (Tabel 3), diikuti pembentukan pada tunas sampel no. 16. Secara statistik regenerasi tunas dan akar pada tanaman tersebut berbeda nyata dengan yang lain. Namun secara keseluruhan tanaman haploid membentuk tunas dan akar sangat lambat.

Daun muda yang diambil dari tanaman haploid no. 400 (S-400) merupakan jenis eksplan dan tanaman haploid dengan respons pembentukan tunas tertinggi mencapai 6,0 tunas per eksplan (Tabel 4). Hasil ini secara statistik berbeda nyata dengan petiolnya, sedangkan petiol yang diambil dari tanaman haploid no. 16 (S-16) merupakan jenis eksplan yang sesuai

**Tabel 3. Respons pembentukan tunas dan akar pada sampel tanaman haploid yang berbeda (Response of shoot and root formation in different haploid plant samples)**

Sampel tanaman haploid (Sample of haploid plant)	Parameter yang diamati (Parameter observed)	
	Jumlah tunas per eksplan (Number of shoot per explant)	Jumlah akar per eksplan (Number of root per explant)
S-1	0,4 c <sup>*</sup> )	0,0 c
S-16	2,2 b	0,0 c
S-166	0,7 c	0,4 bc
S-231	0,2 c	0,8 ab
S-306	0,7 c	0,0 c
S-323	0,5 c	0,8 ab
S-330	0,5 c	0,0 c
S-400	4,1 a	1,3 a

Koefisien variasi (CV), %

**Tabel 4. Interaksi jenis eksplan dan tanaman haploid yang berbeda terhadap jumlah tunas yang teregenerasi (*Interaction of different types of explant and haploid plant on number of shoots regenerated*)**

Jenis eksplan ( <i>Explant type</i> )	Jumlah tunas ( <i>Shoot number</i> )							
	S-1	S-16	S-166	S-231	S-306	S-323	S-330	S-400
Daun ( <i>leaf</i> )	0,0 a <sup>1)</sup>	0,3 b	1,3 a	0,3 a	0,0 b	0,8 a	0,5 a	6,0 a
Petiol ( <i>Petiole</i> )	0,8 a	4,0 a	0,3 a	0,3 a	1,5 a	0,8 a	0,8 a	2,3 b
Koefisien variasi ( <i>CV</i> ), %	10,93	9,08	1,66	8,76	5,72	12,24	12,46	13,80

untuk pembentukan tunas dibandingkan eksplan daun. Berdasarkan jumlah akar yang teregenerasi, jumlah akar yang terbentuk berkisar antara 1- 4 akar per eksplan dengan hasil tertinggi 1,8 akar per eksplan juga ditemukan pada petiol tanaman haploid no. 231, sedang pada eksplan daun ditemukan pada sampel no. 323 (Tabel 5). Pada tanaman yang lain akar sulit teregenerasi. Hasil ini membuktikan bahwa regenerasi tunas dan akar pada kalus hasil regenerasi tanaman haploid berlangsung lambat dengan jumlah yang terbatas. Hasil ini juga menguatkan hasil penelitian sebelumnya (Rachmawati *et al.* 2007, Winarto dan Rachmawati 2007, Winarto 2009).

Dari studi ini terungkap bahwa tiap jenis eksplan dan tanaman haploid yang berbeda memiliki respons pertumbuhan yang berbeda pula, baik dalam pembentukan kalus, bakal tunas, tunas, dan akar yang dihasilkan. Eksplan daun dari tanaman haploid no. 400 memiliki respons pertumbuhan dan kemampuan regenerasi tertinggi, sedang tanaman no. 1, 231, dan 306 memiliki respons yang rendah. Pengaruh signifikan jenis eksplan dan genotip dalam kultur *in vitro* *Anthurium* juga dilaporkan oleh Rachmawati *et al.* (2007), Winarto (2007), Atak dan Çelik (2009), Jahan *et al.* (2009). Perbedaan respons jenis eksplan dan genotip tanaman donor dalam kultur *in vitro* ini juga dilaporkan pada kultur anther bunga matahari (Thangene *et al.*

1994), *Trapa* sp. (Hoque *et al.* 2007), kentang (Chani *et al.* 2000, Omidi dan Shahpiri 2002), kultur *in vitro* *Salvia canariensis* (Mederos-Molina 2004), *G. jamesonii* (Nhut *et al.* 2008), dan *Phalaenopsis* (Gow *et al.* 2008).

Pada kultur anther *Anthurium*, respons pertumbuhan dan regenerasi kalus yang lambat dan rendah juga dibuktikan oleh Rachmawati (2005). Anther yang diisolasi dari daerah transisi tiga kultivar *Anthurium* (Tropical, Carnival, dan Amigo) diuji respons pembentukan dan pertumbuhan kalus pada medium MW dan hasilnya menunjukkan bahwa pembentukan dan pertumbuhan kalus terbaik hingga terendah berturut-turut Tropical, Carnival, dan Amigo. Kemampuan induksi dan regenerasi kalus pada eksplan berturut-turut untuk daun muda, hipokotil, dan akar (Winarto 2007). Atak dan Çelik (2009) menemukan bahwa kultivar Arizona lebih responsif dibandingkan kultivar Sumi. Potongan daun muda lebih mudah diregenerasi dibanding spadik (Jahan *et al.* 2009). Kapasitas regenerasi kalus hijau > kalus hijau muda/pucat > kuning > kuning kemerahan/merah (Winarto *et al.* 2010).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pertumbuhan dan regenerasi kalus hasil kultur anther *Anthurium* sangat dipengaruhi oleh genotip tanaman (Joseph *et al.* 2003, Rachwamati 2005, Winarto 2007, Atak dan Çelik 2009), jenis eksplan/kalus

**Tabel 5. Interaksi jenis eksplan dan sampel tanaman haploid terhadap jumlah akar yang teregenerasi (*Interaction of explant types and haploid plant samples on number of roots regenerated*)**

Jenis eksplan ( <i>Explant type</i> )	Jumlah tunas ( <i>Shoot number</i> )							
	S-1	S-16	S-166	S-231	S-306	S-323	S-330	S-400
Daun ( <i>Leaf</i> )	0,0	0,0	0,0 b*	0,0 b	0,0	1,8 b	0,0	1,0 a
Petiol ( <i>Petiole</i> )	0,0	0,0	0,8 a	1,8 a	0,0	0,0 a	0,0	1,5 a
Koefisien variasi ( <i>CV</i> ), %	-	-	6,06	14,72	-	14,72	-	9,67



(Jahan *et al.* 2009, Winarto *et al.* 2010), dan medium regenerasi (Rachmawati *et al.* 2007, Winarto dan Rachmawati 2007, Viégas *et al.* 2007, Bejov *et al.* 2009, Winarto dan Mattjik, 2009). Pada penelitian lain dilaporkan bahwa pembentukan dan regenerasi kalus dipengaruhi oleh umur eksplan (Niederwieser dan van Staden 1990, Summer *et al.* 1992 Joseph *et al.* 2003, Hoque dan Mansfield 2004), posisi dan orientasi eksplan (Sharma dan Rajam 1996, Joseph *et al.* 2003, Gow *et al.* 2008).

### KESIMPULAN

1. Pertumbuhan dan kemampuan regenerasi eksplan hasil kultur anther *Anthurium* berhasil ditingkatkan melalui perbaikan media kultur.
2. Pertumbuhan kalus tumbuh lambat terbaik ditemukan pada MR-4, sedang kalus haploid pada MR-1.
3. Jumlah bakal tunas mencapai  $\pm 20$  bakal tunas per eksplan, tetapi pembentukan tunas tertinggi (4,8 tunas per eksplan) ditemukan pada MR-6.
4. Daun muda tanaman haploid no. 400 merupakan jenis eksplan dan tanaman haploid terbaik dalam pembentukan tunas (6,0 tunas per eksplan).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Budi Marwoto, MS yang telah mereview, memberikan kritik, saran, dan masukan yang sangat berguna bagi perbaikan naskah ini.

### PUSTAKA

1. Anjaneyulu, C., B. Shyamkumar, and C. Giri. 2004. Somatic Embryogenesis from Callus Cultures of *Terminalia chebula* Retz.: An Important Medicinal Tree. *Trees*. 18(5):547-552.
2. Aswath, C.R. and M. L. Choudhary. 2002. Rapid Plant Regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus Callus Cultures. *Acta Bot. Croat.* 61(2):125-134.
3. Atak, Ç. and Ö. Çelik. 2009. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from Leaf Explants. *Pak. J. Bot.* 41(3):1155-1161.
4. Bejov, M., V.R. Sumitha, and N.P. Anish. 2008. Foliar Regeneration in *Anthurium andraeanum* Hort. Cv. Agnihothri. *Biotech.* 7(1):134-138.

5. Chani, E., R.E Veilleux, and T. Boluarte-Medina. 2000. Improved Androgenesis of Interspecific Potato and Efficiency of SSR Markers to Identify Homozygous Regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 60:101-112.
6. Chen, J.T. and W.C. Chang. 2000. Efficient Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis from Callus Cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Sci.* 160:87-93.
7. Gantait, S., N. Mandal, S. Bhattacharyyal, and P.K. Das. 2008. In Vitro Mass Multiplication with Pure Genetic Identity in *Anthurium andraeanum* Lind. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 18(2):113-122.
8. George, E.F., M.A. Hall, and G.J. De Klerk. 2007. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition: Volume 1. The Background.* Exegetic Basingstone. UK. 508 p.
9. Gow, W.P., J.T. Chen, and W.C. Chang. 2008. Effects of Genotype, Light Regime, Explant Position and Orientation on Direct Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of Phalaenopsis Orchids. *Acta Physiol. Plant.* p.1-7.
10. Han, D.S., Y. Niimi, and M. Nakano. 1997. Regeneration of Haploid Plants from Anther Cultures of the Asiatic Irbid lily Connecticut King. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 47:153-158.
11. Hoque, M. and J. Mansfield. 2004. Effect of Genotype and Explant Age on Callus Induction and Subsequent Plant Regeneration from Root-derived Callus of Indica Rice Genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 78(3): 217-223.
12. Hoque, A., M. K. Biswas, and S. Alam. 2007. Variation of Callus Induction through Anther Culture in Water Chestnut (*Trapa* sp.). *Turk J. Biol.* 31:41-45.
13. Jahan, M.T., M.R. Islam, R. Khan, A.N.K. Mamun, G. Ahmed, and L. Hakim. 2009. In Vitro Clonal Propagation of *Anthurium (Anthurium andraeanum L.)* using Callus Culture. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 19(1):61-69.
14. Joseph, D., K.P. Martin, J. Madassery, and V.J. Philip. 2003. In Vitro Propagation of Three Commercial Cut Flower Cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *Indian J. Exp Biol.* 41(2):154-9.
15. Karami, O. 2008. Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus L.*). *J. Biol. Sci.* 8(4):62-72.
16. Kumar, S and J.K. Kanwar. 2007. Plant Regeneration from Cell Suspensions in *Gerbera jamesonii* Bolus. *J. Fruit and Ornamental Plant Res.* 15:157-166.
17. Mallikadevi, T., P. Senthilkumar, and S. Paulsamy. 2008. In Vitro Regeneration of the Medicinal Plant, *Plumbago zeylanica L.* with Reference to A Unique Population in Maruthamalai, The Western Ghats, India. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 18(2):173-179.
18. Mederos-Molina, S. 2004. In Vitro Callus Induction and Plants from Stem and Petiole Explants of *Salvia canariensis L.* *Plant Tissue Cult.* 14(2) : 167-172.
19. Mori, S., Y. Adach, S. Horimoto, S. Suzuki, and M. Nakano. 2005. Callus Formation and Plant Regeneration in Various *Lilium* Species and Cultivars. In Vitro Cell. *Dev. Biol. Plant.* p. 783-788.

20. Nehra N. S., K.K. Kartha, C. Stushnoff, and K.L.Giles. 1992. The Influence of Plant Growth Regulator Concentrations and Callus Age on Somaclonal Variation in Callus Culture Regenerants of Strawberry. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 29(3):257-268.
21. Nhut, D.T., T.T.T. An, N.T.D. Huong, N.T. Don, N.T. Hai, N.Q. Thien, and N.H. Vu. 2008. Effect of Genotype, Explant Size, Position, and Culture Medium On Shoot Generation of *Gerbera jamesonii* by Receptacle Transverse Thin Cell Layer Culture. *Sci. Hort.* 111(2):146-151
22. Niederwieser L, J.G. and J. van Staden I. 1990. The Relationship Between Genotype, Tissue Age, and Endogenous Cytokinin Levels on Adventitious Bud Formation on Leaves of *Lachenalia*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 22:223-228.
23. Niedz, R.P. and T.J. Evens. 2007. Regulating Plant Tissue Growth by Mineral Nutrition. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 43:370-381.
24. Odotayo, O., F.B. Akinrimisi, I. Ogunbosoye, and R.T. Oso. 2005. Multiple Shoot Induction from Embryo Derived Callus Cultures of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Walp. *Afr. J. Biotech.* 4(11):1214-1216.
25. Omid, M and A. Shahpiri. 2002. Callus Induction and Plant Regeneration In Vitro in Potato ISHS *Acta Hort.* 619: XXVI International Horticultural Congress: Potatoes, Healthy Food for Humanity: International Developments in Breeding, Production, Protection and Utilization. [www.actahort.org/members/showpdf?booknr=619\\_36](http://www.actahort.org/members/showpdf?booknr=619_36). [12 Juli 2009]
26. Pontaroli, A.C. and E.L. Camadro. 2005. Plant Regeneration after Long Term Callus Culture in Clones of *Asparagus officinalis* L. *Biocell.* 29(3):313-317.
27. Radhakrishnan, R. and Ranjithakumari, B.D. 2007. Callus Induction and Plant Regeneration of Indian Soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3) via Half Seed Explant Culture. *J. Agric. Tech.* 3(2):287-297.
28. Rachmawati, F. 2005. Kultur Anther pada *Anthurium* (*Anthurium andraeanum* Linden ex Andre). *Thesis*. Departemen Agronomi dan Hortikultura. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. 146 Hlm.
29. Rachmawati, F., B. Winarto, dan A. Purwito. 2007. Induksi Regenerasi Tunas dari Kalus Hasil Kultur Anther *Anthurium andraeanum* Linden ex André Kultivar Tropical. *J. Hort. (Edisi Khusus)* 17(2):107-117.
30. Salam, M.A., M.R. Ali, Md. E. Ali, K.A. Alam, M.S.H. Reza, S. Islam and S.M.M. Rahman 2008. Callus Induction and Regeneration of Indigenous Garlic (*Allium sativum* L.). *Am. J. Plant Physiol.* 3(1):33-39.
31. Sharma. P. and M.V. Rajam. 1996. Genotype, Explant, and Position Effects on Organogenesis and Somatic Embryogenesis in Eggplant (*Solanum melongena* L.). *J. Exp. Bot.* 46(282): 135-141.
32. Summers, W.L., J. Jaramillo, and T. Bailey. 1992. Microspore Developmental Stage and Anther Length Influence the Induction of Tomato Anther Callus. *HortSci.* 27:718-856.
33. Thangene, S.R., M.S. Joshi, S.S. Khuspe, and A. E Mascarenhas. 1994. Anther Culture in *Helianthus annuus* L., Influence of Genotype and Culture Conditions on Embryo Induction and Plant Regeneration. *Plant Cell Repts.* 13:222-226.
34. Vargas, T.E., A. Mejias, M. Oropeza and E. de Garcia. 2004. Plant Regeneration of *Anthurium andraeanum* L. cv. Rubrun. *E. J. Biotech.* 7(3)5p.
35. Viégas, J., M.T.R. da Rocha, I. Ferreira-Moura, M.G.S. Corrêa, J.B. da Silva, N.C. dos Santos, J.A. Teixeira da Silva, . 2007. *Anthurium andraeanum* (Linden ex André) Culture: In Vitro and Ex Vitro. *Floricult. Ornament. Biotech.* 1(1):61-65.
36. Wang, J. and M.Z. Bao 2007. Plant Regeneration of Pansy (*Viola wittrockiana*) 'Caidie' via Petiole-derived Callus. *Sci Hort.* 111(3):266-270.
37. Westfall, P.H., R.D. Tobias, D. Rom, R.D. Wolfinger, and Y. Hochberg. 1999. *Multiple Comparisons and Multiple Tests: using the SAS System*. SAS Publishing, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 397 p.
38. Winarto. B. 2007. Respons Pembentukan Tunas Aksiler dan Adventif pada Kultur Anthurium secara In Vitro. *J. Hort.* 17(1):17-25.
39. \_\_\_\_\_ dan F. Rachmawati. 2007. Teknik Kultur Anther pada Pemuliaan Anthurium. *J. Hort.* 17(2):127-137.
40. \_\_\_\_\_. 2009. Androgenesis: A Breakthrough Effort for Preparing Haploid or Double-haploid Plants in Anthurium. *Dissertation*. Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture. Bogor Agriculture Institute. 235 p.
41. \_\_\_\_\_ dan N.A. Mattjik. 2009. Respons Anthera *Anthurium andraeanum* Linden ex André Kultivar Carnival pada Medium dengan Berbagai Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh. *J. Agron. Indonesia* 37(2):138-144.
42. \_\_\_\_\_, F. Rachmawati, D. Pramanik, and J.A. Teixeira da Silva. 2010. Morphological and Cytological Diversity of Regenerants Derived from Anthurium Anther Culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* Published online 18 November 2010.
43. Yu, Y.X., L. Liu, J.X., Liu, and J. Wang. 2009. Plant Regeneration by Callus-Mediated Protocorm-Like Body Induction of *Anthurium andraeanum* Hort. *Agric. Sci. China.* 8(5):572-577.