



GRAHA ILMU

Seri Monograf

Popy Hartatie Hardjo

KULTUR JARINGAN ANGGREK

Embriogenesis somatik Vanda tricolor (Lindl.) var. pallida



KULTUR JARINGAN ANGGREK

Embriogenesis somatik *Vanda tricolor* (Lindl.) var. *pallida*

KULTUR JARINGAN ANGGREK

Embriogenesis somatik *Vanda tricolor* (Lindl.) var. *pallida*

Popy Hartatie Hardjo



GRAHA ILMU

Seri Monograf

KULTUR JARINGAN ANGGREK; Embriogenesis somatik *Vanda tricolor* (Lindl.) var. pallida

oleh Popy Hartatie Hardjo

Editor: Wina Dian Savitri

Hak Cipta © 2018 pada penulis



GRAHA ILMU

Ruko Jambusari 7A Yogyakarta 55283

Telp: 0274-889398; Fax: 0274-889057; E-mail: info@grahailmu.co.id

Hak Cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apa pun, secara elektronik maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya, tanpa izin tertulis dari penerbit.

Tajuk Entri Utama: Hardjo, Popy Hartatie

KULTUR JARINGAN ANGGREK; Embriogenesis somatik *Vanda tricolor* (Lindl.) var. pallida/Popy Hartatie Hardjo

- Edisi Pertama. Cet. Ke-1. - Yogyakarta: Graha Ilmu, 2018
xii + 60 hlm.; 23 cm

Bibliografi: 51 - 59

ISBN : 978-602-262-801-9

E-ISBN : 978-602-262-802-6

1. Anggrek

I. Judul

584.4

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan atas karunia rahmat-Nya sehingga buku monograf ini dapat diselesaikan.

Anggrek merupakan salah satu komoditas hortikultura unggulan Republik Indonesia. *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* merupakan spesies lokal endemik yang terancam punah keberadaannya di Hutan Amerta Jati, Taman Wisata Alam (TWA) Buyan Tamblingan, Buleleng, Bali. Oleh karena itu perlu dilestarikan dengan perbanyakan cepat menggunakan teknik kultur jaringan. Buku ini membahas cara perbanyakan *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* menggunakan teknik embriogenesis somatik secara tidak langsung membentuk embrio somatik sebagai bibit. Bahasan materi ini merupakan hasil beberapa penelitian yang telah dilakukan melalui bantuan hibah yang diberikan DRPM Ristekdikti dan LPPM Ubaya.

Ucapan terima kasih ditujukan kepada berbagai pihak yang telah berkontribusi dalam penerbitan buku ini. Semoga karya ini berguna bagi masyarakat yang membutuhkan dan berkepentingan di bidang perbanyakan tanaman anggrek, serta bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan ke depan.

Buku ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu segala saran, kritik dan arahan dari segenap pembaca sangat diharapkan untuk penyempurnaan buku ini.

Surabaya, September 2018

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 KULTUR JARINGAN TANAMAN	7
2.1 Pengertian dan bidang aplikasi	7
2.2 Media kultur jaringan	17
2.3 Teknik mikropropagasi	21
2.4 Kultur jaringan anggrek <i>Vanda</i>	24
BAB 3 IMPLEMENTASI	29
3.1 Embriogenesis somatik	
<i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i>	29
3.2 Induksi kalus embriogenik	
<i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i>	32

3.3	Pembentukan embrio somatik	
	<i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. pallida	40
3.4	Regenerasi embrio somatik	
	<i>Vanda tricolor</i> Lind. Var. pallida	44
BAB 4	KESIMPULAN	49
DAFTAR PUSTAKA		51



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Beberapa Spesies Anggrek <i>Vanda</i>	3
Gambar 2.	Anggrek <i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i>	25
Gambar 3.	Inisiasi kalus embriogenik dan pembentukan embriosomatik <i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i> .	41
Gambar 4.	Histologis perkembangan embrio somatik <i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i> .	43
Gambar 5.	Regenerasi embrio somatik <i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i> membentuk planlet.	47



DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Induksi kalus <i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i> dari eksplan daun, basal daun dan ujung akar pada berbagai media dan ZPT	33
Tabel 2.	Waktu terbentuk kalus, morfologi kalus dan persentase eksplan berkalus <i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i> 120 hari masa kultur	40
Tabel 3.	Lama waktu dan persentase embrio somatik yang terbentuk setelah 30 hari masa kultur <i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i>	42
Tabel 4.	Regenerasi embrio somatik <i>Vanda tricolor</i> Lindl. var. <i>pallida</i> membentuk planlet pada beberapa komposisi media dan ZPT setelah 30 hari masa kultur	46



1

PENDAHULUAN

Salah satu faktor penting penentu keberhasilan program pertanian adalah pengadaan bibit bermutu, seragam, dan tersedia sewaktu-waktu dalam jumlah banyak. Kebutuhan yang demikian sulit terpenuhi bila pengadaan bibit dilakukan secara konvensional. Teknik kultur jaringan yang dikenal juga dengan kultur *in vitro* telah terbukti dapat memperbanyak tanaman secara cepat dalam jumlah banyak serta identik dengan induknya di industri pembibitan komersial. Kultur *in vitro* berperan penting untuk memperoleh hasil yang tidak bisa dicapai melalui kultur *ex vitro*.

Perbanyakan secara *in vitro* dilakukan antara lain melalui multiplikasi tunas, jalur embriogenesis somatik dan organogenesis baik langsung maupun tidak langsung melalui fase kalus. Banyak tanaman memiliki kemampuan untuk membentuk embrio non seksual dari jaringan *ovule*

tanpa terjadi fusi sel gamet membentuk zigot, dan dikenal sebagai embrio somatik atau apomiksis. Pembentukan embrio somatik secara alamiah dapat terjadi pada sel-sel somatik dalam kantung embrio dan dari sel-sel nuselus (Sahijram and Bahadur, 2015). Secara *in vitro*, embrio somatik dapat terjadi dari sel-sel somatik eksplan tanaman yang dikulturkan. Eksplan adalah bagian kecil dari tanaman (sel, jaringan, atau organ) yang digunakan untuk memulai suatu kultur.

Keunggulan embriogenesis somatik secara tidak langsung melalui kalus adalah karena embrio somatik berasal dari satu sel somatik. Embrio somatik ideal untuk penyimpanan jangka pendek maupun jangka panjang karena bila diregenerasikan kembali dapat langsung membentuk tanaman utuh (planlet) (Guan *et al.*, 2016).

Pada umumnya perbanyakan anggrek dilakukan dengan cara mengecambahkan biji secara *in vitro*, sehingga diperoleh hasil yang beragam. Agar memperoleh hasil yang seragam dan jumlah banyak secara cepat, maka dilakukan upaya perbanyakan secara *in vitro* dengan teknik embriogenesis somatik baik secara langsung maupun tidak langsung, dan akan dihasilkan embrio somatik yang dikenal juga dengan nama *protocorm-like bodies* (PLBs). Menurut Teixeira da Silva (2012) multiplikasi PLBs merupakan salah satu metode perbanyakan anggrek secara cepat.

Keberhasilan induksi dan multiplikasi PLBs tergantung dari jenis eksplan (Juntada *et al.*, 2015), media kultur (Samala *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015) dan genotip tanaman (Soe *et al.*, 2014). Induksi dan multiplikasi PLBs memerlukan media dan juga jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang tepat.

Anggrek *Vanda* merupakan salah satu spesies tanaman hias anggrek yang populer dan disukai masyarakat pencinta anggrek. Ada berbagai spesies *Vanda* antara lain: *V. brunnea*, *V. dearei*, *V. lamellata*, *V. hookeriana*, *V. coerulea*, *V. limbata*, *V. teres*, *V. tricolor* (Gambar 1).



V. limbata dari Flores



V. tricolor var. *suavis* dari Bali



V. dearei dari Borneo



V. hookeriana dari Bengkulu

(sumber: <https://goo.gl/G1LpeF>; <https://goo.gl/MAe8AF> ; <https://goo.gl/dA7xXR>; <https://goo.gl/RRygpP>)

Gambar 1. Beberapa Spesies Anggrek *Vanda*

Anggrek *Vanda tricolor* merupakan spesies endemik di kawasan lereng Gunung Merapi. *Vanda tricolor* Indonesia tumbuh baik pada ketinggian 800-1700 m dpl, dan terdapat di Jawa Barat hingga Pulau Bali (Purwanto dan Semiarti, 2009).

Anggrek *Vanda tricolor* memiliki morfologi batang bulat, panjang dan kokoh, dengan tinggi tanaman dapat mencapai 2 m, daun berbentuk pita agak melengkung. Sesuai dengan namanya, anggrek *Vanda tricolor* memiliki tiga jenis warna bunga, dengan variasi warna putih, totol coklat pada bagian kelopak bunga, sedangkan pada bagian labellum (ujung bunga yang muncul di tengah kelopak) berwarna ungu. *Vanda tricolor* berbunga umumnya bulan September-Oktober. Rangkaian bunga bisa mencapai 50 cm yang menyangga 10-20 kuntum bunga yang muncul dari ketiak daun dan mampu bertahan hingga 20-25 hari. Bunga anggrek *Vanda tricolor* mengeluarkan aroma harum biasanya pada pagi hari, dan sangat dipengaruhi oleh ketinggian tempat hidupnya. Di dataran tinggi aroma bunga sangat kuat, sebaliknya di dataran rendah aroma bunga berkurang (Purwanto dan Semiarti, 2009).

Vanda tricolor banyak digunakan sebagai tetua dalam persilangan, terutama untuk menghasilkan totol-totol berwarna ungu, ungu kemerahan pada labellum, rangkaian bunga yang panjang, hibrid keturunan memiliki kuntum

yang banyak, serta aroma yang harum. Hal ini menjadikan anggrek ini sering diburu dan diambil dari habitat aslinya di hutan-hutan, dan berakibat keberadaannya menjadi langka.

Perbanyakan *Vanda tricolor* dibedakan menjadi dua cara, yaitu perbanyakan vegetatif dan perbanyakan generatif. Perbanyakan vegetatif dilakukan antara lain dengan cara memisahkan rumpun, menggunakan keiki (anakan yang tumbuh liar di ujung umbi), dan menggunakan stek batang. Sedangkan perbanyakan generatif menggunakan biji. Penanaman biji anggrek secara *in vitro* dilakukan di laboratorium kultur jaringan.

Penelitian embriogenesis somatik anggrek *Vanda* sp. (Jawan *et al.*, 2010, Tee *et al.*, 2010, Sebastinraj *et al.*, 2014, Hardjo dkk., 2016, Hardjo dan Savitri, 2017, Bhattacharjee and Islam, 2017) sudah banyak, namun sangat bervariasi komposisi media dan ZPT serta jenis eksplan yang digunakan, demikian pula persentase keberhasilan regenerasi dan kecepatan multiplikasi masih rendah.

Penelitian embriogenesis somatik secara tak langsung anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* yang merupakan spesies endemik yang terancam punah di Hutan Amerta Jati, Taman Wisata Alam (TWA) Buyan Tamblingan, Buleleng, Bali belum pernah dilakukan, oleh karena itu ditulis

dalam bentuk monograf dengan membahas penggunaan eksplan basal daun yang diinduksi dengan berbagai jenis dan konsentrasi ZPT agar membentuk kalus embriogenik, lebih lanjut membentuk embrio somatik, dan akhirnya di-regenerasikan membentuk planlet.



2

KULTUR JARINGAN TANAMAN

2.1 Pengertian dan Bidang Aplikasi

Kultur jaringan adalah teknik untuk mengisolasi bagian tanaman seperti sel, jaringan atau organ, serta membudidayakannya dalam lingkungan yang terkendali (secara *in vitro*) dan aseptik, sehingga bagian tanaman tersebut dapat beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali (Bhojwani dan Razdan, 1996). Berbeda dengan perbanyakan tumbuhan secara konvensional, kultur jaringan berada dalam kondisi aseptik dalam wadah transparan berisi medium nutrisi dan ditempatkan dalam lingkungan cahaya, temperatur, maupun kelembaban yang terkendali. Oleh sebab itu, teknik ini disebut juga kultur *in vitro*, berasal dari bahasa Latin yang artinya 'di dalam kaca'.

Teknik kultur jaringan berkembang dari teori totipotensi sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden

tahun 1938. Teori tersebut menyatakan bahwa setiap sel mengandung informasi genetik dan sarana fisiologis tertentu yang mampu membentuk tanaman lengkap bila ditempatkan dalam lingkungan yang sesuai. Dengan demikian sel, jaringan, dan organ tumbuhan mampu tumbuh membentuk individu baru karena memiliki sifat totipoten. (Bhojwani dan Razdan, 1996).

Skoog dan Miller tahun 1957 mengemukakan bahwa hormon auksin dan sitokinin mengatur regenerasi tunas dan akar *in vitro*. Rasio sitokinin dan auksin tinggi mendorong pembentukan tunas, sebaliknya rasio sitokinin dan auksin rendah mendorong pembentukan akar. Bila rasio sitokinin dan auksin seimbang maka akan mendorong pembentukan kalus. Sitokinin merangsang multiplikasi tunas aksilar seperti pada meristem nodus hibrid *Saccharum* spp. yang diinduksi dengan BAP $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Hardjo, 2015) maupun pembentukan tunas adventif dari kalus padi merah Barak Cenana yang diinduksi dengan BAP 3 mg.L^{-1} (Artadana *et al.* 2017), sedangkan auksin merangsang pembentukan kalus seperti pada eksplan *leaf roll* pucuk hibrid *Saccharum* spp. yang diinduksi dengan 2,4-D 3 mg.L^{-1} (Hardjo, 2013) dan pembentukan akar adventif seperti pada tunas *in vitro* *Rauvolfia serpentina* Benth. yang diinduksi dengan penambahan IBA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Rijanto dan Hardjo, 2002).

Penerapan teknik kultur jaringan pada berbagai bidang antara lain:

- a. Bidang pemuliaan tanaman. Kultur jaringan digunakan untuk meningkatkan keragaman genetik, seperti induksi variasi somaklonal, induksi mutasi, kultur haploid, dan fusi protoplas.
- b. Bidang industri. Kultur jaringan digunakan untuk produksi metabolit sekunder yang merupakan bahan baku fitofarmasi.
- c. Bidang pengendalian penyakit tanaman. Kultur jaringan digunakan untuk menghasilkan tanaman bebas patogen seperti virus, bakteri atau mikoplasma melalui kultur meristem.
- d. Bidang konservasi. Kultur jaringan digunakan untuk memperbanyak tanaman langka atau untuk penyimpanan plasma nutfah yang dilakukan dengan cara penyimpanan beku atau *cryopreservation*.
- e. Bidang bioteknologi tanaman. Kultur jaringan sangat diperlukan untuk meregenerasikan sel tanaman yang telah direayasa genetiknya menjadi tanaman transgenik.

Teknik kultur jaringan juga mempunyai kelemahan antara lain: (1) dibutuhkan biaya awal yang relatif tinggi untuk laboratorium dan bahan kimia, (2) dibutuhkan keahlian khusus untuk melaksanakannya, dan (3) tanaman

yang dihasilkan berukuran kecil, aseptik, dan terbiasa hidup dalam kondisi kelembaban tinggi sehingga memerlukan aklimatisasi ke lingkungan eksternal.

Teknik kultur jaringan umumnya dikembangkan untuk memperbanyak bibit tanaman, khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangbiakkan secara generatif. Dibandingkan dengan memperbanyak bibit secara konvensional seperti dari biji, stek, atau cangkok, memperbanyak klonal secara kultur jaringan memiliki beberapa keunggulan, antara lain: (1) memperbanyak bibit dapat dilakukan dengan cepat dan dalam skala besar, (2) kontinuitas ketersediaan bibit akan terjaga setiap saat tanpa harus menunggu musim berbuah, (3) bibit yang dihasilkan identik secara genetik dengan induknya, sehingga tingkat keseragaman pertumbuhan bibit di lapangan sangat tinggi, dan (4) memungkinkan dilakukannya manipulasi genetik.

Perbanyak bibit menggunakan kultur jaringan dikenal juga dengan istilah mikropropagasi. Mikropropagasi dikenal juga sebagai memperbanyak tanaman genotip unggul menggunakan teknik kultur *in vitro*. Tahapan yang dilakukan dalam memperbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan adalah: 1) tahap persiapan sumber eksplan, 2) inisiasi kultur *in vitro*, 3) memperbanyak kultur *in vitro*, 4) persiapan aklimatisasi/perakaran, dan 5) aklimatisasi.

Setiap tahapan membutuhkan faktor dan keadaan tertentu untuk menginduksi pertumbuhan eksplan yang diinginkan.

2.1.1 Persiapan sumber eksplan

Persiapan yang dilakukan adalah menyangkut tanaman induk, yaitu seleksi tanaman, siklus pertumbuhan, dan kondisi pertumbuhan. Beberapa faktor yang harus dipertimbangkan dalam seleksi tanaman induk yaitu:

1. Genotip. Setiap spesies tanaman, bahkan individu tanaman dari spesies yang sama, seringkali memperlihatkan respon yang berbeda satu sama lain pada kondisi kultur yang sama. Oleh karena itu, sebaiknya dimanfaatkan eksplan dari beberapa tanaman induk untuk memperoleh eksplan dengan karakter yang diharapkan.
2. Kondisi tanaman. Tanaman yang sehat dengan vigor yang kuat mempunyai peluang keberhasilan kultur yang lebih besar.
3. Bagian organ tanaman. Tunas pucuk atau buku merupakan bagian organ yang sering digunakan sebagai eksplan.
4. Ukuran eksplan. Semakin besar ukuran eksplan maka semakin besar kemungkinan mengandung mikroorganisme kontaminan, ataupun kemungkinan terjadinya keragaman akibat kimera (seandainya ada), namun keberhasilan eksplan hidup besar.

5. Kimera. Sejumlah tanaman memiliki kecenderungan mengalami mutasi genetik lokal yang dikenal dengan nama kimera, misalnya terdapat bentuk daun yang berbeda dalam satu tanaman. Sifat kimera akan diwariskan ke generasi berikutnya.
6. Kemudahan kultur. Beberapa spesies tanaman yang secara konvensional mudah diperbanyak secara vegetatif, maka akan lebih mudah pula dikulturkan dan tumbuh dengan cepat.
7. Posisi eksplan pada tanaman. Bagian ujung tunas-tunas pucuk merupakan bagian yang lebih sedikit mengandung mikroorganisme kontaminan, sehingga lebih mudah disterilisasi permukaan dan juga dikulturkan karena terdiri dari sel-sel yang masih muda dan sangat respon terhadap nutrisi di media tumbuh. Sebaiknya dihindari penggunaan bagian tanaman yang mendekati atau kontak dengan tanah, karena besar kemungkinannya terkontaminasi oleh mikroorganisme.
8. Kesehatan jaringan. Selain mengandung mikroorganisme kontaminan, jaringan internal tanaman juga mungkin mengandung mikroorganisme patogen. Oleh karena itu sedapat mungkin digunakan jaringan yang sehat terutama yang posisinya di bagian tunas pucuk karena cenderung mengandung sedikit mikroorganisme patogen.

Ada 2 hal yang terkait dengan siklus pertumbuhan, yaitu umur jaringan muda/dewasa dan fase vegetatif/generatif.

1. Jaringan muda (*juvenile*) mengacu kepada umur perkembangan jaringan. Jaringan dewasa dihasilkan sesudah melewati sejumlah siklus pertumbuhan, sebaliknya jaringan muda dihasilkan dari bagian yang muda. Pada individu tanaman yang sudah sangat tua juga ada jaringan muda. Jaringan muda dan jaringan dewasa pada individu tanaman yang tua memiliki sifat fisiologis yang berbeda dan dapat memengaruhi kebutuhan kultur.
2. Tunas vegetatif lebih sering digunakan sebagai eksplan dalam kultur jaringan. Kondisi fisiologis jaringan pucuk tidak selalu sama selama periode pembungaan, sehingga hal ini dapat memengaruhi respon tunas vegetatif yang diambil pada periode pembungaan.

2.1.2 Inisiasi kultur *in vitro*

Salah satu faktor pembatas dalam keberhasilan kultur jaringan adalah kontaminasi yang terjadi saat masa kultur. Sumber kontaminasi antara lain: eksplan baik eksternal maupun internal, media kultur, peralatan yang proses sterilisasi kurang sempurna, lingkungan kerja dan ruang kultur yang kotor, dan kecerobohan saat transfer kultur.

Kontaminasi yang terjadi kadang ditemukan setelah beberapa kali sub kultur, hal ini kemungkinan disebabkan kontaminan bersifat dorman di dalam jaringan hingga kondisi yang menguntungkan untuk pertumbuhan kontaminan. Kontaminasi permukaan dapat diatasi dengan pencucian dan perendaman dalam larutan bahan sterilisasi seperti natrium hipoklorit, alkohol 70%, antibiotik, HgCl_2 0.1-0.2% selama beberapa menit dengan memerhatikan bahwa konsentrasi yang digunakan ataupun lamanya perendaman/ pencucian tidak sampai merusak jaringan eksplan, namun cukup untuk mematikan mikroorganisme kontaminan. Konsentrasi dan lama waktu sterilisasi bervariasi tergantung jenis eksplan dan lingkungan tumbuh tanaman induk. Tidak ada metode sterilisasi eksplan yang baku untuk semua tanaman. Untuk agen kontaminan yang berada pada jaringan organ di dalam tanah, umumnya sterilisasi menggunakan cara fisik yaitu dengan membakar permukaan eksplan, setelah sebelumnya organ dibersihkan di air mengalir dan detergen. Mikroorganisme kontaminan internal dalam jaringan tanaman lebih sulit menghilangkannya, namun bisa dicoba diatasi dengan menggunakan pestisida sistemik yang diberikan pada tanaman induk sebelum pengambilan eksplan, atau langsung diberikan dalam media kultur. Semua bahan sterilan toksik terhadap eksplan sehingga perlu dilakukan

pencucian berulang kali menggunakan akuades steril agar tidak ada sisa-sisa bahan pensteril pada eksplan.

2.1.3 Perbanyak kultur *in vitro*

Setelah kultur aksenik diperoleh, tahap selanjutnya adalah menginduksi pertumbuhan sel-sel eksplan, dengan memilih jalur regenerasi yang diinginkan dan disesuaikan dengan tujuan akhir kultur yang ingin dicapai. Sistem regenerasi tumbuhan sangat ditentukan oleh keberadaan zat pengatur tumbuh (ZPT) dalam jaringan, dan bisa diubah konsentrasinya dengan penambahan ZPT secara eksogen pada media tumbuh.

2.1.4 Perakaran

Setelah sekumpulan tunas pucuk diperoleh, maka dilanjutkan tahap inisiasi akar. Pada spesies yang mudah berakar, perakaran tunas pucuk bisa dilakukan di luar kultur dengan menciptakan kelembaban yang tinggi dan ditutup plastik, dan bagian pangkal batang diberi ZPT auksin untuk merangsang pembentukan akar. Pada beberapa spesies tanaman sering kali sulit membentuk akar, maka diupayakan antara lain: dengan pemberian hormon auksin IBA atau IAA, penurunan konsentrasi mineral makro dan mikro hingga $\frac{1}{2}$ bahkan $\frac{1}{4}$ resep media dasar Murashige-Skoog (MS) dilaporkan oleh Bhattacharjee and Islam (2017), dan pemberian arang aktif 0,5-5%.

2.1.5 Aklimatisasi

Aklimatisasi adalah proses pengkondisian planlet atau tunas mikro (bila pengakaran dilakukan *ex vitro*) di lingkungan baru di luar botol, dengan media tanah sehingga planlet mampu bertahan hidup dan siap ditanam di lapangan. Prosedur pembiakan tanaman secara *in vitro* baru bisa dikatakan berhasil bila planlet dapat diaklimatisasi ke kondisi eksternal.

Dalam proses perbanyakan tanaman secara *in vitro*, tahap aklimatisasi planlet merupakan salah satu tahap kritis yang sering menjadi kendala dalam produksi bibit. Kondisi iklim mikro di luar botol sangat jauh berbeda dengan kondisi di dalam botol. Planlet *in vitro* lebih bersifat heterotrofik karena terbiasa pada kondisi kelembaban tinggi, suplai hara mineral dan sumber energi tersedia, serta aseptik. Sebaliknya kondisi di luar botol kelembaban nisbi lebih rendah, tingkat intensitas cahaya lebih tinggi dan tidak aseptik. Pada kondisi *in vitro*, sering kali kultur memperlihatkan gejala lapisan kutikula tipis dan jaringan cenderung sukulen, jaringan vaskuler belum berkembang sempurna, stomata belum berfungsi sempurna, dan aktivitas fotosintesis rendah. Akibatnya dengan karakteristik tersebut, planlet atau tunas mikro mudah menjadi layu jika dipindahkan secara tiba-tiba ke kondisi eksternal, sehingga planlet perlu diaklimatisasi.

Planlet yang dikeluarkan dari botol harus dicuci bersih, dan tidak boleh ada sisa-sisa media yang menempel di planlet, kemudian sebagian daun dihilangkan, lalu ditanam pada bak aklimatisasi yang berisi campuran kompos, pasir dan tanah, disemprot air, selanjutnya ditutup plastik. Setelah \pm 2 minggu, sungkup plastik dibuka bertahap hingga terbuka tanpa sungkup. Setelah bibit kuat, maka dipindahkan ke polibag untuk ditanam secara individu, dan ditempatkan pada kondisi intensitas cahaya yang lebih tinggi. Pemeliharaan di polibag dilakukan hingga bibit cukup besar dan kuat untuk ditanam di lapang.

2.2 Media Kultur Jaringan

2.2.1 Komponen media kultur

Salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tanaman dengan teknik *in vitro* adalah media kultur. Saat ini banyak tersedia berbagai komposisi media dasar kultur yang sudah diformulasi untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan kultur. Di antaranya media Murashige-Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962), Linsmaier-Skoog (LS), media B5 Gamborg, Woody Plant Medium (WPM), Knudson, Vacin and Went (VW). Fisik media tersebut dapat berbentuk cair atau padat dengan menambahkan bahan pematik seperti agar atau gelrite.

Kebutuhan nutrisi untuk setiap jenis tanaman berbeda, sehingga saat mengkulturkan jenis tanaman baru, perlu dilakukan percobaan empiris untuk memperoleh komposisi media yang optimal. Media MS merupakan media dasar yang umum digunakan untuk mengkulturkan sebagian besar jenis tanaman.

Komponen media kultur mengandung: 1) hara makro dan mikro, 2) vitamin, asam amino, dan bahan organik, 3) karbohidrat umumnya sukrosa sebagai sumber energi, 4) zat pengatur tumbuh (ZPT), 5) air destilata sebagai pelarut.

1. Hara makro dan mikro

Hara makro merupakan hara yang dibutuhkan dalam jumlah banyak, sebaliknya hara mikro dalam jumlah sedikit. Hara Makro yaitu N, P, K, Ca, Mg, dan S. Hara mikro yaitu Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, dan Co. Hara Makro dan mikro tersebut dalam bentuk garam agar dapat larut dalam air.

2. Vitamin, asam amino, dan bahan organik

Vitamin yang sering digunakan adalah vitamin B, seperti tiamin-HCl (vit. B1), piridoksin-HCl (vit. B6), asam nikotinat, riboflavin (vit. B2). Asam amino sebagai sumber nitrogen organik yang sering digunakan L-glutamin, L-arginin, asam aspartat, dan glisin. Senyawa lain sebagai sumber nitrogen tambahan dalam media antara lain kasein hidrolisat dan pepton.

Myo-inositol (gula alkohol berkarbon enam) sering digunakan sebagai salah satu komponen media yang penting karena dapat merangsang pertumbuhan jaringan. Senyawa organik kompleks alami seperti air kelapa, jus tomat, ekstrak pisang, ekstrak kentang terkadang ditambahkan dalam media. Senyawa organik tersebut merupakan sumber berbagai asam amino, vitamin, dan ZPT alami.

3. Karbohidrat

Sumber energi dalam media kultur yaitu karbohidrat sukrosa umum digunakan karena eksplan tidak autotrof dan memiliki laju fotosintesis sangat rendah. Konsentrasi sukrosa dalam media berkisar antara 2-3%.

4. Zat pengatur tumbuh (ZPT)

Keberhasilan kultur jaringan juga ditentukan oleh salah satu komponen media yaitu jenis dan konsentrasi ZPT dalam media. Jenis dan konsentrasi yang digunakan tergantung pada tujuan dan tahap pengkulturan. ZPT adalah senyawa organik dalam konsentrasi yang rendah yang mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Apabila disintesis alami oleh jaringan tanaman maka disebut juga fitohormon. Fitohormon disintesis pada bagian tertentu tanaman, kemudian ditranslokasi ke bagian lain tanaman di mana zat tersebut menimbulkan respon morfologi dan

fisiologi dan zat tersebut aktif dalam konsentrasi yang sangat rendah (Wattimena, 1987). Pada saat ini, ZPT alami maupun sintetik sudah banyak tersedia untuk digunakan dalam media kultur jaringan tanaman.

Ada lima golongan zat pengatur tumbuh, yaitu auksin, sitokinin, gibberelin, *abscisic acid* (ABA), dan etilen. Namun, yang umum digunakan dan sangat berperan dalam mengatur pertumbuhan dan perkembangan kultur adalah auksin dan sitokinin. Interaksi antara konsentrasi auksin dan sitokinin sangat memengaruhi banyak aspek diferensiasi sel dan morfogenesis dalam sistem kultur jaringan (Bhojwani dan Razdan, 1996).

Kebutuhan ZPT yang ditambahkan dalam media kultur bervariasi pada setiap jenis tanaman. Dalam menentukan rancangan percobaan untuk memperoleh konsentrasi ZPT yang optimal, pertama dipelajari dulu sifat dan peran ZPT yang akan digunakan, kemudian dipelajari penggunaan ZPT tersebut pada tanaman satu genus atau satu familia dengan tanaman yang akan diteliti melalui studi literatur, selanjutnya baru ditentukan jenis dan rentang konsentrasi ZPT yang akan diuji coba.

Auksin dalam sistem kultur jaringan berperan dalam pembelahan dan pemanjangan sel, pertumbuhan kalus, suspensi sel, diferensiasi sel dan inisiasi pembentukan akar lateral, bersama dengan sitokinin dapat mengatur

morfogenesis yang diinginkan. Pemilihan jenis dan konsentrasi auksin ditentukan beberapa faktor antara lain: 1) tipe pertumbuhan yang diinginkan (kalus, akar, tunas); 2) level auksin endogen jaringan saat eksplan diambil; 3) kemampuan jaringan eksplan untuk mensintesis auksin secara alamiah; 4) interaksi antara auksin endogen (asam indolasetat /IAA) dan eksogen.

Sitokinin dalam sistem kultur jaringan berperan antara lain merangsang pembelahan sel secara mitosis, multiplikasi tunas aksilar, dan penghambatan pertumbuhan akar (Gutierrez-Mora *et al.*, 2012). Meskipun auksin berperan utama dalam pembentukan kalus, namun sitokinin pada beberapa jenis tanaman juga diperlukan untuk proliferasi kalus bersama-sama dengan auksin, seperti induksi kalus organogenik pada eksplan tanaman hibrid *spindle leaf roll Saccharum* spp. (Hardjo, 2013), induksi dan pertumbuhan kalus pada eksplan basal daun *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* (Hardjo and Savitri, 2017).

2.3 Teknik Mikropropagasi

Ada berbagai teknik mikropropagasi tanaman, tetapi teknik yang sering digunakan untuk produksi bibit tanaman ada tiga yaitu: multiplikasi tunas aksilar atau tunas apikal, embriogenesis dan organogenesis secara langsung dan tidak langsung melalui kalus.

Induksi tunas aksilar atau tunas apikal pada umumnya dilakukan dengan pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) sitokinin pada eksplan yang mengandung buku (*single node culture*) atau tunas pucuk (*shoot-tip culture*). Penambahan ZPT sitokinin ke dalam medium dapat menghilangkan pengaruh dominansi apikal meristem apikal, dan memunculkan tunas-tunas baru dari meristem lateral. Benih tanaman juga dapat diinduksi membentuk tunas dalam jumlah banyak dengan cara mengkulturkan benih steril pada medium yang mengandung ZPT sitokinin. Selanjutnya tunas yang terbentuk ditransfer ke medium tanpa ZPT sitokinin atau sitokinin rendah agar terjadi elongasi tunas, kemudian tunas ditransfer lebih lanjut ke medium perakaran yang mengandung ZPT auksin rendah atau bisa juga dengan menurunkan konsentrasi mineral makro menjadi setengah resep medium dasar untuk merangsang pembentukan akar.

Organogenesis langsung disebut juga regenerasi organ (bisa berupa tunas atau akar) dari eksplan yang tidak mengandung meristem. Tunas yang tumbuh langsung dari organ tanpa mengandung meristem disebut tunas adventif. Tunas adventif juga dapat didahului oleh pembentukan kalus, yaitu yang terjadi melalui organogenesis tak langsung. Oleh karena itu media induksi tunas adventif dilakukan dengan dua media, yaitu media induksi kalus dan media

induksi tunas adventif. Media induksi kalus pada umumnya diberi zat pengatur tumbuh auksin tanpa sitokinin atau sitokinin dengan konsentrasi rendah. Setelah terbentuk kalus maka eksplan dipindahkan ke media regenerasi tunas dan proses ini disebut organogenesis tak langsung karena melalui fase kalus, umumnya diberi zat pengatur tumbuh sitokinin tanpa auksin atau auksin dengan konsentrasi rendah. Lebih lanjut tunas dipindahkan ke media perakaran agar membentuk planlet.

Teknik organogenesis memiliki tingkat multiplikasi tunas yang lebih tinggi dibandingkan dengan teknik multiplikasi tunas aksilar atau tunas apikal. Meskipun demikian, teknik organogenesis tak langsung melalui fase pembentukan kalus sering kali menghasilkan variasi/mutasi genetik pada bibit yang dihasilkan. Oleh karena itu, teknik ini cocok untuk produksi bibit yang hasil akhirnya adalah terjadinya keragaman genetik pada anaknya, seperti pada produksi tanaman hias. Munculnya variasi genetik pada tanaman hias sering kali menguntungkan karena tanaman menjadi unik dan spesial sehingga harga jual meningkat.

Embriogenesis somatik dapat diinduksi langsung pada eksplan atau tidak langsung melalui pembentukan kalus terlebih dahulu. Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan embriogenesis somatik antara lain kondisi

fisiologis tanaman donor, genotip tanaman donor, jenis medium dan kondisi fisik medium, ZPT, dan lingkungan kultur. Pada umumnya embriogenesis langsung secara *in vitro* terjadi pada eksplan yang masih muda (juvenil). Eksplan embrio atau bagian dari buah atau bunga akan lebih mudah diinduksi untuk membentuk embrio dibandingkan dengan eksplan lain seperti ruas batang, daun, dan akar. Embrio yang terbentuk ini disebut embrio somatik karena berasal dari sel somatik, berbeda dengan embrio yang berasal dari hasil perkawinan. Penelitian Gomes *et al.* (2015) membuktikan terjadinya pembentukan PLBs secara langsung dari eksplan potongan tipis *protocorm Brasiliidium forbesii* baik irisan memanjang maupun melintang.

2.4 Kultur Jaringan Anggrek *Vanda*

Anggrek merupakan salah satu tanaman hias dengan bentuk dan penampilan yang indah. Anggrek mencakup kurang lebih 800 genera yang meliputi kurang lebih 25.000 spesies tersebar di dunia (Chugh *et al.*, 2009) dan di antaranya terdapat di Indonesia. *Vanda* adalah salah satu genus anggrek yang terdiri dari sekitar 60 spesies. Genus ini populer karena menghasilkan bunga cantik, warna atraktif, berukuran besar, dan beberapa spesiesnya beraroma wangi. *Vanda* tergolong anggrek monopodial, artinya batang utamanya tumbuh terus menerus ke atas tanpa batas. Di habitat aslinya ada yang tumbuh sebagai

anggrek tanah (terrestrial), dan ada juga yang tumbuh menempel di batang pohon (epifit).

Vanda tricolor, sesuai dengan namanya, memiliki bunga terdiri dari tiga warna dan mengeluarkan aroma wangi. Kelopak berwarna putih, mahkota berwarna putih dengan bercak coklat, dan labellum berwarna ungu. Anggrek ini merupakan salah satu anggrek alam khas hutan di lereng selatan Gunung Merapi, Yogyakarta. Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* seperti terlihat pada Gambar 2 merupakan spesies lokal endemik yang terancam punah keberadaannya di Hutan Amerta Jati, Taman Wisata Alam (TWA) Buyan Tamblingan, Buleleng, Bali (Balipost.com/news/2018/j04/23/43721/Terancam-Punah,Populasi-Anggrek-Vanda..).



(a)



(b)

(sumber: a. <https://goo.gl/i6mQWE>; b. <https://goo.gl/3T224C>)

Gambar 2. Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*

Klasifikasi anggrek *Vanda tricolor* sebagai berikut (menurut Backer dan van den Brink, 1965): Divisio Spermatophyta, Sub Divisio Angiospermae, Kelas Monocotyledoneae, Ordo Orchidales, Famili Orchidaceae, Genus *Vanda*, Spesies *Vanda tricolor* Lindl.

Vanda tricolor dapat diperbanyak dengan cara stek, pemisahan anakan, dan biji. Kendala budidaya anggrek *Vanda* adalah masa vegetatif yang panjang, sehingga masa munculnya bunga yang dinantikan juga relatif lama, padahal justru organ bunga yang memiliki estetika dan nilai komersial tinggi. Salah satu alternatif melestarikan anggrek adalah perbanyak tanaman secara kultur jaringan. Dengan perbanyak secara teknik kultur jaringan akan diperoleh tanaman dalam jumlah banyak, dalam waktu yang relatif singkat, seragam, dan identik dengan induknya.

Secara umum perbanyak anggrek dilakukan dengan perkecambahan biji secara *in vitro*, akibatnya tanaman yang diperoleh tidak seragam dan warna bunga beragam. Perbanyak berbagai spesies anggrek *Vanda* secara *in vitro* sebagai metode produksi tanaman anggrek secara massal dan cepat melalui perbanyak embrio somatik atau yang lebih dikenal dengan sebutan *protocorm-like bodies* (PLBs) telah banyak dilaporkan dengan menggunakan berbagai eksplan antara lain biji *Vanda testacea* (Sebastinraj *et al.*, 2014), batang *Vanda tessellate* Roxb. (Bhattacharjee and

Islam, 2017), potongan daun dari *Vanda testacea* (Lindl.) Reichb.f. (Kaur and Bhutani, 2009), *Vanda* sp. (Budisantoso *et al.*, 2017), persilangan *Vanda coerulea* Griff. Ex. Lindl X *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' (Gantait dan Sinniah, 2012), basal daun *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* (Hardjo and Savitri, 2017), tunas pucuk *Vanda coerulea* (Jitsopakul *et al.*, 2013), ujung akar *Vanda coerulea* (Lang and Hang, 2006), dan PLBs *Vanda dearei* (Jawan *et al.*, 2010), *Vanda* Kasem's Delight (Gnasekaran *et al.*, 2012). PLBs merupakan struktur seperti *corm*, yang memiliki karakter pembelahan sel yang cepat dengan kutub bipolar yang akan terinduksi menjadi tunas dan sekaligus juga akar, sehingga akan berkembang menjadi planlet dalam jumlah yang banyak dan waktu yang lebih cepat.



3

IMPLEMENTASI

3.1 Embriogenesis Somatik *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*

Embriogenesis somatik adalah suatu proses di mana sel-sel somatik berkembang melalui tahap perkembangan embrio spesifik tanpa melalui penggabungan dua sel gamet untuk membentuk embrio somatik. Embrio somatik dicirikan dengan struktur yang bipolar, yaitu memiliki meristem tunas dan meristem akar, sehingga regenerasi membentuk tanaman utuh lebih mudah dibanding regenerasi tunas adventif yang unipolar. Lee *et al.* (2013) menyatakan embrio somatik dianggap sama dengan PLBs anggrek karena keduanya memiliki struktur yang mirip dengan embrio zigotik.

Embrio somatik dapat tumbuh langsung dari bagian eksplan atau tidak langsung melalui fase pembentukan

kalus terlebih dahulu pada eksplan, selanjutnya baru terbentuk embrio somatik dari setiap sel kalus. Embrio zigotik yang belum matang (*immature*) umumnya digunakan sebagai eksplan dalam teknik embriogenesis langsung. Hal ini disebabkan jaringan eksplan sudah bersifat embriogenik sehingga hanya memerlukan perlakuan ZPT eksogen untuk mengubahnya menjadi embrio somatik.

Aplikasi embrio somatik memiliki kelebihan dibanding pembentukan tunas adventif ataupun tunas lateral, karena embrio somatik terbentuk dari satu sel embriogenik dan berkembang menjadi struktur bipolar sehingga bila diregenerasi akan langsung membentuk planlet (Purnamaningsih, 2002). Dengan metode perbanyakan melalui embriogenesis somatik, pencapaian hasil untuk mendukung program perbaikan tanaman melalui metode rekayasa genetik menjadi lebih cepat. Akan tetapi, untuk memperoleh teknik embriogenesis somatik biasanya lebih sukar dibandingkan teknik lainnya.

Embriogenesis somatik tak langsung mempunyai beberapa tahapan, yaitu (1) induksi sel atau kalus embriogenik; (2) pembentukan embrio somatik atau pendewasaan; (3) perkecambahan atau regenerasi membentuk planlet; dan (4) aklimatisasi bibit. Induksi kalus embriogenik umumnya memerlukan auksin dengan aktivitas kuat atau konsentrasi tinggi (2,4-D, picloram, NAA) tanpa sitokinin,

selain itu bisa juga auksin kuat dikombinasi dengan sitokin konsentrasi rendah. Tahap pendewasaan merupakan perkembangan dari struktur globular membentuk struktur primordia tunas dan primordia akar. Beberapa literatur menunjukkan tahap pendewasaan tahap yang paling sulit dan biasanya digunakan auksin konsentrasi rendah atau bahkan tanpa auksin dan dikombinasi dengan sitokin. Tahap perkecambahan embrio somatik merupakan tahap di mana embrio somatik beregenerasi membentuk tunas dan sekaligus akar pada media yang sama. Seringkali media perkecambahan tidak menggunakan ZPT atau menggunakan ZPT konsentrasi sangat rendah. Tahap aklimatisasi bibit merupakan perubahan kondisi planlet dari kondisi *in vitro* ke lingkungan *in vivo* di rumah kaca dengan penurunan kelembaban dan peningkatan intensitas cahaya.

Jenis eksplan, ZPT, dan komposisi media merupakan beberapa faktor penentu keberhasilan embriogenesis somatik. Jenis eksplan yang digunakan dan tahap perkembangan dari eksplan berpengaruh terhadap respon pembentukan sel-sel kalus embriogenik maupun pembentukan embrio somatik secara langsung dari eksplan. Demikian pula halnya dengan ZPT dan komposisi media.

Berbagai teknik perbanyakan angrek untuk membentuk embrio somatik atau dikenal juga dengan PLBs telah banyak diteliti namun masih banyak dijumpai

kesulitan, sehingga belum mencapai efisiensi tinggi. Penelitian embriogenesis somatik pada anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* secara tidak langsung melalui fase kalus telah dilakukan mulai dari pemilihan eksplan, ZPT dan komposisi media hingga terbentuk embrio somatik kemudian diregenerasikan membentuk planlet.

3.2 Induksi Kalus Embriogenik *Vanda tricolor* Lindl. var *pallida*

Pada umumnya penggunaan eksplan yang bersifat meristematik memberikan keberhasilan pembentukan embrio somatik yang lebih tinggi. Menurut Mose *et al.* (2017) eksplan *protocorm* dan batang *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume terbanyak menghasilkan embrio somatik secara langsung dibanding daun dan akar di medium NP (Ichihashi New *Phalaenopsis*) ditambah TDZ (1-3 mg.L⁻¹).

Induksi kalus dari beberapa eksplan *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* seperti potongan helai daun, basal daun, dan ujung akar pada berbagai komposisi ZPT dan media tidaklah mudah, dan hal yang sama juga dilaporkan oleh Budisantoso *et al.* (2017) yang berhasil menginduksi kalus dari eksplan daun *Vanda* sp. menggunakan auksin 2,4-D 2 ppm di medium VW setelah 14 hari masa kutur, namun belum ada data regenerasi kalus. Tabel 1 menunjukkan skrining berbagai media (media VW, MS, dan ½ MS) dan komposisi ZPT (auksin NAA, sitokinin TDZ, dan BAP) dari

ketiga jenis eksplan tersebut. Dari ketiga eksplan yang diuji, hanya eksplan basal daun yang mampu membentuk kalus (Gambar 3A) walaupun pada akhirnya eksplan basal daun mengalami pencoklatan dan mati namun sebelumnya kalus telah terbentuk dan segera dilakukan sub kultur ke media yang sama, sedangkan eksplan daun dan ujung akar mengalami pencoklatan kemudian mati (Tabel 1). Semua eksplan mudah mengalami pencoklatan, karena kandungan fenolik yang tinggi pada *Vanda tricolor*. Eksplan basal daun posisinya dekat dengan daerah meristematis yang terdiri dari sel-sel muda dengan kecepatan mitosis yang tinggi di bagian batang, sehingga lebih cepat merespon nutrisi dan ZPT yang ada di media tumbuh. Dengan demikian diketahui kemampuan setiap jaringan berbeda-beda untuk mengalami embriogenesis.

Tabel 3.1. Induksi kalus *Vanda tricolor* Lindl. var. pallida dari eksplan daun, basal daun dan ujung akar pada berbagai media dan ZPT

Media + ZPT (mg.L ⁻¹) + sukrosa (%)	Skor pertumbuhan kalus		
	Helai daun	Basal daun	Ujung akar
VW (NAA 3 + TDZ 0,5) sukrosa 1	0	0	0
VW (NAA 3+ TDZ 1) sukrosa 2	0	0	0
VW (NAA 3 + TDZ 1,5) sukrosa 3	0	0	0
VW (NAA 2 + TDZ 0,5) sukrosa 1	0	0	0

Tabel 3.1. Induksi kalus *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* dari eksplan daun, basal daun dan ujung akar pada berbagai media dan ZPT (Lanjutan)

Media + ZPT (mg.L ⁻¹) + sukrosa (%)	Skor pertumbuhan kalus		
	Helai daun	Basal daun	Ujung akar
VW (NAA 2 + TDZ 0,5) sukrosa 2	0	0	0
VW (NAA 2 + TDZ 0,5) sukrosa 3	0	0	0
VW (NAA 1 + TDZ 0,5) sukrosa 1	0	0	0
VW (NAA 1 + TDZ 0,5) sukrosa 2	0	0	0
VW (NAA 1 + TDZ 0,5) sukrosa 3	0	0	0
MS (NAA 1 + BAP 0,5) sukrosa 1	0	0	0
MS (NAA 0,1+ BAP 0,05) sukrosa 1	0	0	0
MS (NAA 0,05+ BAP 0,025) sukrosa 1	0	1	0
MS (NAA 1,0 + BAP 0,5) sukrosa 2	0	0	0
MS (NAA 0,1+ BAP 0,05) sukrosa 2	0	0	0
MS (NAA 0,05+ BAP 0,025) sukrosa 2	0	0	0
MS (NAA 1,0 + BAP 0,5) sukrosa 3	0	0	0
MS (NAA 0,1+ BAP 0,05) sukrosa 3	0	0	0
MS (NAA 0,05+ BAP 0,025) sukrosa 3	0	0	0
½ MS (NAA 0,05 + BAP 0,025) sukrosa 1	0	1	0
½ MS (NAA 0,05 + BAP 0,02) sukrosa 1	0	1	0
½ MS (NAA 0,05 + BAP 0,01) sukrosa 1	0	2	0

Ket.: skor 0 artinya eksplan mati berwarna coklat dan tidak ada kalus
 1 artinya eksplan kecoklatan dan sedikit berkalus
 2 artinya eksplan hijau kekuningan dan kalus banyak

Komposisi media yaitu kandungan hara makro dan mikro berpengaruh terhadap pertumbuhan sel-sel baru,

hal ini terlihat dari respon eksplan di mana hanya sel-sel eksplan basal daun yang mampu membentuk kalus pada media $\frac{1}{2}$ MS dengan sukrosa 1% (Tabel 1). Sebagian besar peneliti melaporkan embriogenesis somatik anggrek baik secara langsung maupun tidak langsung melalui kalus terjadi pada media $\frac{1}{2}$ MS.

Jawan *et al.* (2010) melaporkan pada media $\frac{1}{2}$ MS pertumbuhan PLBs dari eksplan biji *immature* anggrek *Vanda dearei* adalah yang tercepat. Menurut Naing *et al.* (2010) media $\frac{1}{2}$ MS dengan 2,4-D 2 mg/L⁻¹ dikombinasi dengan BA 2 mg/L⁻¹ dapat menginduksi kalus embriogenik pada tanaman *Coelogyne cristata* sebesar 40%. Jainol and Gansau (2017) melaporkan induksi kalus embriogenik dari daun pucuk anggrek *Dimorphorchis lowii* terjadi pada media $\frac{1}{2}$ MS + NAA 0,046 mg.L⁻¹ dengan TDZ 3 mg.L⁻¹. Shen *et al.* (2018) melaporkan terbentuk embrio somatik langsung dari eksplan daun anggrek *Tolumnia* pada media $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan sitokinin TDZ 3 mg.L⁻¹.

Demikian pula konsentrasi sumber karbon sukrosa *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* berpengaruh terhadap inisiasi kalus dari eksplan basal daun, di mana sel-sel eksplan mengalami pencoklatan dan kematian sangat cepat pada sukrosa 3% (Tabel 1). Sukrosa merupakan sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan dan perkembangan sel-sel baru dari eksplan selain itu juga

bermanfaat untuk mempertahankan tekanan osmotik media, namun bila konsentrasi sukrosa terlalu tinggi ternyata justru menghambat pertumbuhan sel-sel baru. Sel eksplan basal daun *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* mampu membentuk kalus justru pada sukrosa rendah yaitu 1%. Sedangkan media dasar MS mengandung sukrosa 3% dan sebagian besar spesies tumbuhan umumnya mampu tumbuh dengan baik pada sukrosa 3%, dengan demikian perkecualian untuk *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* yang justru tumbuh baik pada sukrosa 1%. Sebaliknya Ishii *et al.* (1998) menyatakan bahwa induksi kalus dari segmen PLBs *Phalaenopsis* terbentuk pada media VW dengan sukrosa 40 g.L⁻¹ (4%).

Menurut Bhojwani dan Razdan (1996) auksin konsentrasi tinggi diperlukan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik, yang pada akhirnya setiap sel akan membentuk embrio somatik. Lebih lanjut dikemukakan oleh Gutierrez-Mora *et al.* (2012) bahwa pada embriogénesis somatik auksin berperan penting menginduksi polaritas sel dan pembelahan sel asimetri. Setelah terjadi tahap induksi embrio somatik, adalah penting mengurangi atau menurunkan konsentrasi auksin untuk inisiasi simetri bilateral dan ekspresi embrio somatik. Induksi kalus pada eksplan basal daun *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* tidak berhasil dengan auksin NAA 0,1-3 mg.L⁻¹. Pembentukan ka-

lus hanya berhasil dengan penambahan auksin NAA yang lebih rendah yaitu $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ dikombinasi BAP ($0,01-0,025 \text{ mg.L}^{-1}$) dengan sukrosa 1% pada $\frac{1}{2}$ MS seperti terlihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil skrining dari Tabel 1, selanjutnya dilakukan induksi kalus hanya pada eksplan basal daun di media $\frac{1}{2}$ MS dengan perlakuan ZPT NAA saja dan perlakuan kombinasi NAA dengan BAP seperti terlihat pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan kombinasi ZPT auksin NAA $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ dan BAP $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ pada media $\frac{1}{2}$ MS yang mampu menginduksi kalus embriogenik (Gambar 3B) dengan ciri struktur kalus nodular dan warna kalus hijau mengkilat dari eksplan basal daun sebesar 55%. Sebaliknya penambahan auksin NAA secara tunggal tanpa sitokinin BAP hanya menghasilkan kalus kompak berwarna kekuningan, dan kalus yang demikian ternyata tidak mampu beregenerasi membentuk organ ataupun embrio, bahkan lama kelamaan kalus mengalami pencoklatan. Berdasarkan Tabel 2 diketahui NAA $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ dikombinasikan dengan BAP $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ merupakan konsentrasi yang paling cocok dan cepat untuk induksi kalus embriogenik. Pada jenis dan konsentrasi tersebut diduga terjadi perubahan konsentrasi auksin endogen, sehingga tercapai keseimbangan relatif untuk induksi kalus embriogenik. Induksi kalus embriogenik pada Orchidaceae oleh beberapa peneliti ternyata juga memerlukan penambahan auksin dikombinasikan dengan

sitokinin, seperti pada eksplan PLBs *Cymbidium* (Huan *et al.*, 2004), eksplan daun *Phalaenopsis* sp. (Rianawati dkk., 2009), eksplan PLBs *Doritaenopsis* Taisuco Ladylip (Liao *et al.*, 2015). Rineksane dan Sukarjan (2015) melaporkan bahwa eksplan daun *Vanda tricolor in vitro* mampu membentuk kalus bila dikulturkan pada medium *New Dogashima Medium* (NDM) dengan penambahan sitokinin TDZ 0,5 mg.L⁻¹, sedangkan bila eksplan berasal dari daun *in vivo* mampu membentuk kalus bila dikulturkan pada medium NDM dengan penambahan BAP 1-2 mg.L⁻¹ dikombinasi dengan NAA 0,1 mg.L⁻¹. Penambahan auksin secara eksogen berperan penting dalam pembelahan sel, dan berkaitan dengan induksi pembentukan embrio somatik. Penambahan sitokinin dikombinasi dengan auksin pada embriogénesis somatik berperan dalam proliferasi sel (Gutierrez-Mora *et al.* (2012). Keberadaan ZPT dalam media kultur merupakan faktor penting untuk pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi jaringan tanaman hanya bila mana jaringan yang digunakan sebagai sumber eksplan juga bersifat responsif.

Konsentrasi optimum NAA untuk induksi kalus embriogenik pada eksplan basal daun *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* sangat rendah bila dibanding dengan peneliti lain terdahulu pada embriogenesis somatik *Vanda* sp.

dengan eksplan berbeda. Tee *et al.* (2010) menggunakan NAA 3 mg.L^{-1} untuk menginduksi PLBs pada eksplan basal daun *Vanda Somsri Pink*. Beberapa peneliti menggunakan auksin 2,4-D untuk induksi kalus embriogenik. Lang and Hang (2006) menggunakan auksin kuat 2,4-D 10 mg.L^{-1} dikombinasi dengan TDZ 3 mg.L^{-1} untuk menginduksi kalus embriogenik dari daun *Vanda*. Auksin 2,4-D 2 mg.L^{-1} mampu menginduksi dan mempercepat pertumbuhan kalus daun *Vanda* sp. namun belum terjadi regenerasi kalus. Temuan ini dilaporkan oleh Budisantoso *et al.* (2017). Auksin 2,4-D merupakan auksin sintetik yang tahan terhadap degradasi karena reaksi enzimatik dan fotooksidasi. Dengan demikian terbukti bahwa kebutuhan jenis dan konsentrasi auksin untuk induksi kalus embriogenik bervariasi untuk setiap jenis eksplan yang berbeda dan genotip yang berbeda. Hal yang sama juga dikemukakan oleh Gutierrez-Mora *et al.* (2012) bahwa setiap fase embriogénesis somatik membutuhkan konsentrasi dan kombinasi ZPT yang berbeda yang pada akhirnya akan terbentuk embrio. Menurut Bhattacharjee dan Hossain (2015) kombinasi jenis dan konsentrasi ZPT mengubah proses diferensiasi, konsentrasi auksin tinggi dikombinasi dengan sitokinin rendah efektif pada proses diferensiasi anggrek monopodial *Rhynchostylis retusa*.

Tabel 2. Waktu terbentuk kalus, morfologi kalus dan persentase eksplan berkalus *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* 120 hari masa kultur

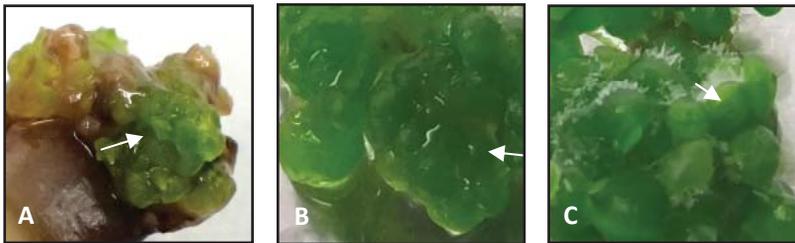
ZPT (mg.L ⁻¹)	Waktu terbentuk kalus (hari)	Struktur & warna kalus	Persentase (%) eksplan berkalus
½ MS (NAA 0,02)	115±5,25 ^a	Kompak, kuning	25
½ MS (NAA 0,05)	79±3,46 ^c	Kompak, kuning	25
½ MS (NAA 0,02 + BAP 0,01)	93±6,24 ^b	Nodular, hijau kekuningan	35
½ MS (NAA 0,05 + BAP 0,025)	81±4,76 ^c	Nodular, hijau	35
½ MS (NAA 0,05 + BAP 0,020)	77±5,87 ^c	Nodular, hijau	50
½ MS (NAA 0,05 + BAP 0,01)	54±2,07 ^d	Nodular, hijau	55

Ket.: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom berarti berbeda nyata dengan uji DMRT pada $\alpha = 0,05$
Jumlah eksplan basal daun: 20

3.3 Pembentukan Embrio Somatik *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*

Tahap pembentukan embrio somatik atau disebut juga tahap pendewasaan merupakan perkembangan dari struktur globular membentuk struktur calon tunas pucuk dan calon akar. Sebagian besar peneliti melaporkan bahwa pembentukan embrio somatik merupakan tahapan yang paling sulit. Zat pengatur tumbuh yang digunakan umumnya berbeda antara tahap induksi kalus embriogenik

dengan tahap pembentukan embrio somatik. Sel atau kalus tidak akan berkembang membentuk embrio somatik bila mana digunakan auksin dengan konsentrasi yang sama dengan tahap induksi kalus embriogenik.



Gambar 3. Inisiasi kalus embriogenik dan pembentukan embrio somatik *Vanda tricolor* Lindl. var. pallida
A. Eksplan basal daun membentuk kalus ; B. Penampilan kalus embriogenik 120 hari masa kultur ; C. Embrio somatik (ES) 30 hari masa kultur

Tabel 3 menunjukkan bahwa 90% kalus dalam waktu 35 hari mampu membentuk embrio somatik lebih banyak (Gambar 3C) setelah kalus embriogenik dikulturkan pada media $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan NAA konsentrasi yang lebih rendah ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) dibandingkan dengan konsentrasi NAA $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ pada tahap induksi kalus dan dikombinasi dengan sitokinin BAP $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ (75%). Penurunan konsentrasi auksin NAA berefek menginduksi kalus *Vanda tricolor* (Lindl.) var pallida membentuk embrio somatik lebih cepat. Dengan demikian disimpulkan bahwa tahap induksi kalus embriogenik dan tahap pendewasaan atau

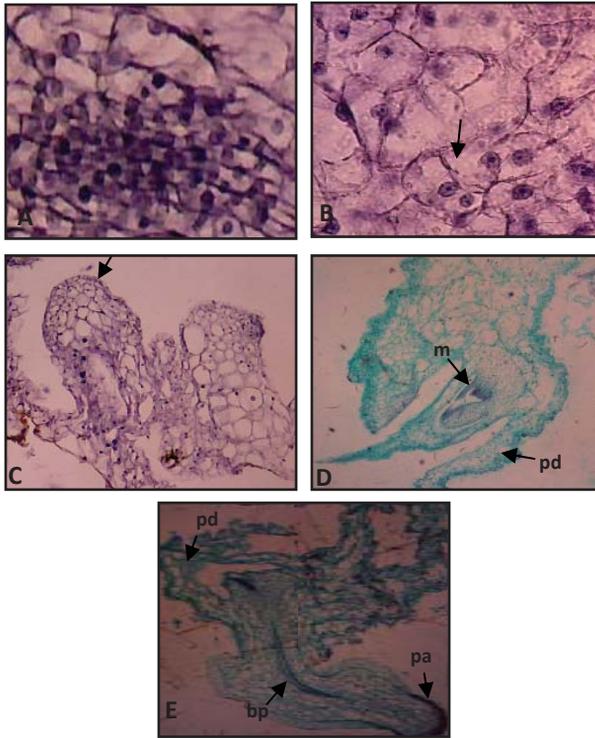
pembentukan embrio somatik membutuhkan kombinasi auksin dan sitokinin yang berbeda.

Tabel 3. Lama waktu dan persentase embrio somatik yang terbentuk setelah 30 hari masa kultur *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*

Perlakuan ZPT (mg.L ⁻¹) pada ½ MS, sukrosa 1%	Saat terbentuknya embrio somatik (hari setelah kultur)	Persentase (%) kalus membentuk embrio somatik setelah 30 hari masa kultur
BAP 0,2 + NAA 0,01	65±8,57 ^c	80
BAP 0,1 + NAA 0,01	45±9,25 ^d	85
BAP 0,05 + NAA 0,01	25±6,75 ^e	90
BAP 0,01 + NAA 0,05	70±2,75 ^c	75
BAP 0,2	90±7,86 ^b	70
BAP 0,1	115±7,42 ^a	55
BAP 0,05	100±6,54 ^a	50

Ket.: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom berarti berbeda nyata dengan uji DMRT pada $\alpha = 0,05$
Jumlah eksplan kalus: 20

Perkembangan embrio somatik seperti terlihat pada Gambar 4A ditunjukkan sel-sel embriogenik berukuran kecil dengan nukleus jelas karena menyerap zat warna dan berukuran besar. Sel embriogenik melakukan pembelahan mitosis berulang kali menghasilkan proembrio yang terlihat terdiri dari 3 sel (Gambar 4B) dan selanjutnya membentuk struktur globular dan memanjang (Gambar 4C).



Gambar 4. Histologis perkembangan embrio somatik *Vanda tricolor* Lindl. var *pallida*. A. Sel-sel embriogenik berukuran kecil dan nukleus besar; B. Proembrio (tersusun 3 sel); C. Struktur globular dengan bagian tepi dari apikal terdiri dari sel-sel berukuran kecil dan bagian tengah ke arah basal sel-sel berukuran besar; D. Embrio somatik dengan meristem pucuk (m) dan primordia daun (pd); E. Embrio somatik beregenerasi membentuk primordia daun (pd) dan primordia akar (pa), dan terlihat diferensiasi berkas pembuluh (bp) yang menghubungkan meristem pucuk dengan primordia akar.

Embrio di mana pada bagian apikal terdiri dari sel-sel yang aktif membelah dicirikan sel berukuran kecil, bagian tepi luar yaitu epidermal terlihat terdiri dari selapis sel yang tersusun beraturan, kemudian bagian tengah terdiri dari sel berukuran besar. Gambar 4D menunjukkan terjadi diferensiasi embrio somatik membentuk struktur meristem pucuk dan primordia daun, namun belum terlihat primordia akar. Perkembangan selanjutnya seperti terlihat pada Gambar 4E bahwa ada meristem akar yang akan membentuk primordia akar setelah terbentuk daun. Selain itu juga terlihat diferensiasi sel membentuk berkas pembuluh yang akan menghubungkan pucuk dengan akar.

3.4 Regenerasi Embrio Somatik *Vanda tricolor* Lind. Var. *pallida*

Pada Gambar 5C dapat dilihat morfologi embrio somatik yang sudah matang (berasal dari media $\frac{1}{2}$ MS + BAP $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ + NAA $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) dan siap berkecambah atau beregenerasi membentuk planlet. Regenerasi embrio somatik dimulai dengan munculnya tunas pada 15 hari setelah dikulturkan di media $\frac{1}{2}$ MS + BAP $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ maupun tanpa penambahan ZPT (Tabel 4 dan Gambar 5A). Hal yang sama juga dilaporkan oleh Naing *et al.* (2011) pada *Coelogyne cristata*, Mei *et al.* (2012) pada *Dendrobium sonia-28*, Meilasari dan Iriawati (2016) pada *Phalaenopsis* 'Join Angle X Sogo Musadian' bahwa embrio somatik atau

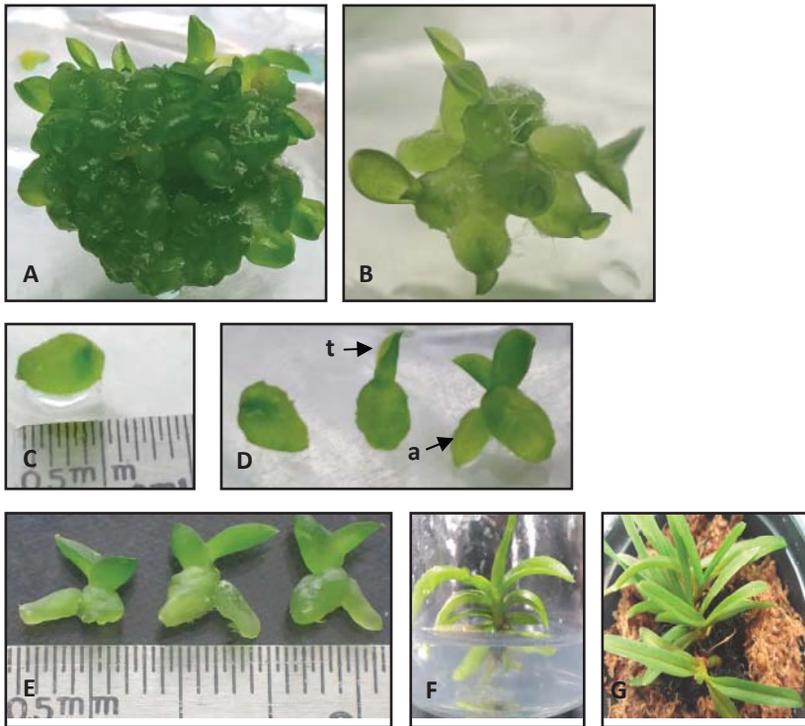
PLB anggrek mampu beregenerasi atau berkecambah membentuk planlet pada media dengan penurunan konsentrasi hara makro dan mikro ($\frac{1}{2}$ MS) tanpa penambahan ZPT. Majumder *et al.* (2010) melaporkan regenerasi PLBs anggrek *Dendrobium farmeri* Paxt. membentuk planlet pada media MS tanpa ZPT. Penurunan konsentrasi hara makro dan mikro mendorong proses morfogenesis, namun bila dikombinasi dengan jenis dan konsentrasi sitokinin yang tepat maka dapat mempercepat terjadinya regenerasi embrio membentuk planlet, seperti pada embrio somatik anggrek *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. Ex.G.Don. yang dikulturkan pada media $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan BAP $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ (Bhattacharjee and Islam, 2017). Jainol and Gansau (2017) juga melaporkan hal yang sama bahwa penambahan air kelapa 15% (w/w) yang diduga memiliki efek seperti sitokinin mendorong regenerasi PLBs *Dimorphorchis lowii* membentuk tunas. Sebaliknya seperti terlihat pada Tabel 4 regenerasi embrio somatik *Vanda tricolor* Lind. var. *pallida* menjadi lebih lambat baik pada media MS penuh tanpa ZPT maupun pada $\frac{1}{2}$ MS + BAP $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$. Penambahan ZPT sitokinin pada konsentrasi tinggi justru dapat menghambat atau memperlambat regenerasi embrio somatik membentuk planlet. Sitokinin memiliki efek menghambat perakaran.

Tabel 4. Regenerasi embrio somatik *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* membentuk planlet pada beberapa komposisi media dan ZPT setelah 30 hari masa kultur

Media dan ZPT (mg.L ⁻¹)	Embrio somatik membentuk tunas (hari)	Persentase (%) embrio somatik membentuk tunas	Persentase (%) embrio somatik membentuk planlet
MS	25±2,27 ^a	80	85
½ MS	17±3,45 ^c	100	100
½ MS + BAP 0,02	15±2,68 ^c	100	100
½ MS + BAP 0,05	20±2,85 ^b	90	80

Ket.: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom berarti berbeda nyata dengan uji DMRT pada $\alpha = 0.05$
Jumlah eksplan embrio somatik: 20

Berdasarkan pengamatan morfologi embrio somatik *Vanda tricolor* beregenerasi membentuk tunas lebih dahulu di mana telah terbentuk daun pertama dan kedua (Gambar 5B) kemudian baru diikuti munculnya akar (Gambar 5D, 5E). Hal ini dibuktikan juga dari pengamatan histologis embrio somatik seperti terlihat pada gambar 5E, bahwa primordia akar muncul setelah sebelumnya didahului munculnya primordia daun. Demikian pula hal yang serupa juga dilaporkan oleh Utami dkk (2007) pada perkembangan embrio somatik *Phalaenopsis amabilis* (L.).



Gambar 5. Regenerasi embrio somatik *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* membentuk planlet

A. Sebagian embrio somatik beregenerasi; B. Embrio somatik membentuk tunas; C. Embrio somatik; D. Urutan perkembangan regenerasi embrio somatik; E. Perkembangan embrio somatik membentuk tunas terlebih dahulu kemudian akar; F. Planlet; G. Planlet aklimatisasi; t: tunas (tanda panah) a: akar (tanda panah)

Dengan demikian dapat disimpulkan untuk induksi kalus embriogenik dan dilanjutkan dengan pembentukan embrio somatik *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* dibutuhkan auksin dan sitokinin, sedangkan regenerasi embrio

somatik membentuk planlet (Gambar 5F) terjadi tanpa penambahan ZPT. Planlet berumur 2 bulan di médium regenerasi $\frac{1}{2}$ MS (Gambar 5F) yang siap diaklimatisasi. Aklimatisasi planlet *Vanda tricolor* Lindl. var *pallida* tidak sulit dan hampir 100% berhasil tumbuh di media *sphagnum moss* seperti terlihat pada Gambar 5G.



4

KESIMPULAN

Perbanyakan *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* telah berhasil melalui cara embriogenesis somatik tidak langsung hingga membentuk planlet dan dapat diaklimatisasi. Penggunaan media dasar $\frac{1}{2}$ MS dan penambahan ZPT auksin NAA dan sitokinin BAP dapat menginduksi pembentukan kalus embriogenik dan selanjutnya berkembang membentuk embrio somatik. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembentukan embrio somatik *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* adalah jenis eksplan, media, sumber karbohidrat sukrosa konsentrasi rendah, serta ZPT.

Induksi kalus embriogenik dari eksplan basal daun *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* terjadi pada media $\frac{1}{2}$ MS (+ sukrosa 1%) dengan penambahan ZPT NAA 0,05 mg.L⁻¹ + BAP 0,01 mg.L⁻¹.

Pembentukan embrio somatik *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida* pada media $\frac{1}{2}$ MS (+ sukrosa 1%) dengan ZPT BAP $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ + NAA $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$.

Regenerasi embrio somatik membentuk primordia tunas terjadi pada $\frac{1}{2}$ MS tanpa ZPT maupun $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan sitokinin BAP $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ dalam masa kultur 15 hari, dan membentuk planlet dalam 15 hari setelah terbentuk tunas terlebih dulu.



DAFTAR PUSTAKA

- Artadana, I.B.M., G.B.F. Suhono, P.H. Hardjo, M.G.M. Purwanto, Y.B. Wang, and K. Supaibulwatana. *Bali Medical Journal* 3(3):S12-S17.
- Backer, C.A. and R.C.B. van den Brink Jr. 1965. *Flora of Java*. N.V.P. Noordhoff, Groningen.
- Balipost. "Terancam Punah, Populasi Anggrek *Vanda tricolor* Di Twa Buyan-Tamblingan". 28 Juli 2018. <https://goo.gl/3T224C>
- Budisantoso, I., N. Amalia, and Kamsinah. 2017. In vitro callus induction from leaf explants of *Vanda* sp. stimulated by 2,4-D. *Biosaintifika* 9(3):492-497.
- Bhattacharjee, D.K. and M.M. Hossain. 2015. Effects of plant growth regulators and explants on propagation of a monopodial and sympodial orchid: a study in vitro. *J. Orchid Soc. India* 29:91-102.

- Bhattacharjee, B. and S.M.S. Islam. 2017. Mass propagation of PLBs derived from leaf and shoots of *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. Ex. G. Don. an endangered medicinal orchid in Bangladesh. *Bangladesh J. Bot.* 46(2):775-782.
- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition. Amsterdam, Elsevier. 749 p.
- Chugh, S.S., I.U. Guha, and Rao. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Sci. Hortic* 122:507-520.
- Gantait, S. and U.R. Sinniah. 2012. Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (*Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' X *Vanda coerulea* Griff. Ex. Lindl.) through direct induction of protocorm like bodies from leaf segments. *Plant Growth Regul.* 68:129-140.
- Gomes, L.R.P., C.R.B. Franceschi, and L.L.F. Ribas. 2015. Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin layer culture. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 37(2):143-149.
- Gnasekaran, P., R. Poobathy, M. Mahmood, M.R. Samian, and S. Subramaniam. 2012. Effect of complex organic additives on improving the growth of PLBs of *Vanda*

- Kasem's Delight. *Australian Journal of Crop Science* 6(8):1245-1248.
- Guan, Y., S.G. Li, X.F. Fan, and Z.H. Su. 2016. Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontiers in Plant Science* 7:938:1-12.
- Gutierrez-Mora, A., A.G. Gonzales-Gutierrez, B. Rodriguez-Garay, A. Ascencio-Cabral, and L. Li-Wei. 2012. Plant somatic embryogenesis: some useful considerations In Embryogenesis (Eds. Ken-ichi Sato). DOI: 10.5772/2143
- Hardjo, P.H. 2013. Perbanyak mikro tebu (*Saccharum* spp. hybrids) melalui kultur kalus. *Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi* 7(1):15-20.
- Hardjo, P.H. 2015. Overekspresi gen *SoSUT1* untuk meningkatkan translokasi sukrosa pada tanaman tebu (*Saccharum* spp. hybrids). Disertasi (non publikasi). Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardjo, P.H. 2016. Proliferasi PLBs *Vanda tricolor* Lindl. var. *pallida*. Prosiding Seminar Nasional Biologi. Unesa, Surabaya.
- Hardjo, P.H., C.H.S. Binarto, dan W.D. Savitri. 2016. Induksi protocorm-like bodies (PLBs) *Vanda tricolor* Lindl.

- var. pallida. Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas VI. Unair, Surabaya.
- Hardjo, P.H. and W.D. Savitri. 2017. Somatic embryo from basal leaf segments of *Vanda tricolor* Lindl. var. pallida. *KnE Life Sciences* 3(5):173-179.
- Huan, L.V.T, T. Takamura, and M. Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science* 166:1443-1449.
- Ishii, Y., T. Takamura, M. Goi, M. Tanaka. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 17:446-450.
- Jainol, J.E. and J.A. Gansau. 2017. Embryogenic callus induction from leaf tip explants and protocorm-like-body formation and shoot proliferation of *Dimorphorchis lowii*: Borneon endemic orchid. *Agrivita Journal of Agricultural Science* 39(1):1-10.
- Jawan, R., J.A. Gansau, and J.O. Abdullah. 2010. In vitro culture of Borneo's endemic orchid, *Vanda dearei*. *Aspac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 18(1):203-207.
- Jena, S. R.C. Jena, and R. Bhol. 2013. In vitro propagation of *Acampe papillosa* Lind. (Orchidaceae) through direct somatic embryogenesis using leaf explant. *Asian Journal of Biological and Life Sciences* 2(3):234-240.

- Jitsopakul, N. K. Thammasiri, K. Ishikawa. 2013. Efficient adventitious shoot regeneration from shoot tip culture of *Vanda coerulea*, a Thai orchid. *ScienceAsia* 39:449-455.
- Juntada, K., S. Taboonmee, P. Meetum, S. Poomjae, and P.N. Chiangmai. 2014. Somatic embryogenesis induction from protocorm-like bodies and leaf segments of *Dendrobium Sonia* "Earsakul". *Silpakorn U Science & Tech J* 9(2):9-19.
- Kaur, S. and K.K. Bhutani. 2009. In vitro propagation of *Vanda Testacea* (Lindl.) Reichb.f.- A rare orchid of high medicinal value. *Plant Tissue Cult & Biotech.* 19(1):1-7.
- Lang, N. and N. Hang. 2006. Using biotechnological approaches for *Vanda* orchid improvement. *Omonrice* 14:140-143.
- Liao, Y.W., P.L. Huang, K.L. Huang, I. Miyajima, and S.T. Hsu. 2015. Factors affecting to somatic embryogenesis and plant regeneration from callus and in vitro ontogeny of *Doritaenopsis* Taisuco Ladylip. *J. Fac.Agr.*60(1):13-22.
- Lee, Y.I, S.T. Hsu, E.C. Yeung. 2013. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. *American J. of Botany* 100(11):2121-2131.

- Majumder, M., S.S. Maiti, and N. Banerjee. 2010. Direct and callus- mediated protocorm-like body induction and high frequency adventitious shoot regeneration in an endanger orchid - *Dendrobium farmer* Paxt. (Orchidaceae). *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 4(Special Issue 1):22-28.
- Mei, T.A., M. Danial, M. Mahmood, and S. Subramaniam. 2012. Exquisite protocol of callus induction and protocorm-like bodies (PLBs) regeneration of *Dendrobium Sonia-28*. *Australian J. of Crop Science* 6(5):793-800.
- Meilasari, D. and Iriawati. 2016. Regeneration of plantlets through PLB (protocorm-like body) formation in *Phalaenopsis* 'Join Angle X Sogo Musadian'. *J. Math. Fund. Sci.* 48(3):204-212.
- Mose, W., A. Indrianto, A. Purwantoro, and E. Semiarti. 2017. The influence of thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume orchid. *Hayati Journal of Biosciences* 24:201-205.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Naing, A.H., J.D. Chung, and K.B. Lim. 2011. Plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in *Coelogyne*

- cristata* orchid. *American Journal of Plant Sciences* 2:262-267.
- OrchidRoots. "Spc_000042039_000460986". 26 Juni 2018. <https://goo.gl/MAe8AF>
- OrchidRoots. "*Vanda dearei*". 26 Juni 2018. <https://goo.gl/dA7xXR>
- Orchidspecies. "Hooker's Papilionanthe". 26 Juni 2018. <https://goo.gl/RRygpP>
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin AgroBio* 5(2):51-58.
- Purwanto, A.W. dan E. Semiarti. 2009. Pesona Kecantikan Anggrek *Vanda*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 51 hal.
- Rianawati,S., A. Purwito, B. Marwoto, R. Kurniati, dan Suryanah. 2009. Embriogenesis somatik dari eksplan daun anggrek *Phalaenopsis* sp. L. *J. Agron. Indonesia* 37(3):240-248.
- Rijanto, A. dan Hardjo, P.H. 2002. Perakaran dan aklimatisasi planlet *Rauvolfia serpentina* Benth. Prosiding Seminar Nasional XXII Tumbuhan Obat Indonesia, Purwokerto. Hal. 321-324.
- Rv-Orchidworks. "*Vanda limbata*". 26 Juni 2018. <https://goo.gl/G1LpeF>

- Sahijram, L. and B. Bahadur. 2015. Somatic Embryogenesis In Plant Biology and Biotechnology Vol . II: Plant Genomics and Biotechnology (B. Bahadur *et al.* eds.). Springer, India. DOI 10.1007/978-81-322-2283-5_15.
- Samala, S., S. Te-chato, S. Yenchon, and K. Thammasiri. 2014. Protocorm-like body proliferation of *Grammatophyllum speciosum* through asymbiotic seed germination. *ScienceAsia* 40:379-383.
- Sebastinraj J., S.J. Britto, D.V. Kumar, J.P. Robinson, and P. Thangavel. 2014. Rapid propagation of *Vanda Testacea* (Lindl.) Rochb.F. -A highly medicinal value epiphytic orchid of India. *World Journal of Agricultural Science* 10(5):223-230.
- Shen, H., J.T. Chen, H.H. Chung, and W.C. Chang. 2018. Plant regeneration via direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Tolumnia* Louise Elmore'Elsa'. *Botanical Studies* 59:4: 1-7.
- Soe, K.W., K.T. Myint, A.H. Naing, and C.K. Kim. 2014. Optimization of efficient protocorm-like body (PLB) formation of *Phalaenopsis* and *Dendrobium* hybrids. *Current Research on Agriculture and Life science* 32(4):179-183.
- Tee, C.S., C.Q. Wong, X.L. Lam, and M. Maziah. 2010. A preliminary study of protocorm-like-bodies (PLBs)

induction using leaf explants of *Vanda* and *Dendrobium* orchids. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 18(1):189-191.

Teixeira da Silva, J.A. 2012. Jasmonic acid, but not salicylic acid, improves PLB formation of Hybrid *Cymbidium*. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 22(2):187-192.

Tissuecultureandorchidologi. "Upaya Pelestarian dan Budidaya *Vanda tricolor*". 28 Juli 2018. <https://goo.gl/i6mQWE>

Wattimena, G.A. 1991. Bioteknologi Tanaman. PAU Bioteknologi, IPB. Bogor. 506 hal.



