

J. Agron. Indonesia 37 (3) : 240 – 248 (2009)

Embriogenesis Somatik dari Eksplan Daun Anggrek *Phalaenopsis* sp L.

Somatic Embryogenesis from Leaf Eksplant of Phalaenopsis Orchids

Sri Rianawati^{1*}, Agus Purwito², Budi Marwoto¹, Ridho Kurniati¹ dan Suryanah¹

¹Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang, Cianjur 43253, Jawa Barat, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga 16680, Indonesia

Diterima 7 Agustus 2009/Disetujui 16 November 2009

ABSTRACT

Somatic embryogenesis has been recognized as one of the process on plant micropropagation techniques. This process occurred through regeneration by direct embryo formation and through an intermediary callus phase. This research was conducted through an intermediary callus phase. The experiment was initiated with callus induction from leaf explant on five modifications of MS medium i.e : 1/2MS without plant hormone (MI-0); 1/2 MS containing 1mg/L BA + 0.5 mg/L 2.4-D + 1mg/L NAA (MI-1); 1/3 MS containing 2 mg/L 2.4-D (MI-2); 1/2 MS supplemented with 0.5 mg/L 2.4-D + 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L thidiazuron (MI-3); 1/2 MS supplemented 2 mg/L thidiazuron and 1 mg/L BAP (MI-4). After the tissues were swollen, the explants were placed on callus proliferation medium 1/2 MS supplemented with 0.2 mg/L thidiazuron and 0.5 mg/L 2.4-D (MP). After two months, calli were regenerated in regeneration medium 1/2 MS supplemented with 0.4 mg/L BAP and 0.2 mg/L 2.4-D (MR). The results of this research showed that MI-1 and MI-3 were the best swelling explant mediums before the callus produced in both MP and MR medium. Callus produced was increased in every subculture. However, the level of calli production decreased on the following subculture. Plantlets were regenerated from somatic embryos derived from calli on MR medium. The results of this study may contribute to our advancement of scientific knowledge achievements tissue culture techniques to support unconventional plant improvement.

Key words: embryo somatic induction, in vitro, embryogenic calli

PENDAHULUAN

Perbanyakan *Phalaenopsis* umumnya dilakukan dengan cara perkecambahan biji secara *in vitro* (Young *et al.*, 2001), sehingga hasil yang diperoleh tidak seragam dan menghasilkan warna bunga yang beragam. Untuk mengatasi masalah ini, produsen *Phalaenopsis* melakukan kultur *in vitro* pada kultivar yang telah terpilih dengan cara membentuk plb (*protocorm like body*) atau embrio somatik melalui proses embriogenesis. Proses ini terkenal dengan sebutan ilmiah embriogenesis somatik (Smith, 2000). Beberapa teknik kultur jaringan yang telah dikembangkan untuk pembentukan embrio somatik *Phalaenopsis* di antaranya termasuk kultur mata tunas tangkai bunga (Kozir *et al.*, 2004) maupun irisan daun (Sinha *et al.*, 2007). Meskipun telah banyak dilakukan penelitian mengenai pembentukan embrio somatik, namun masih banyak dijumpai kesulitan. Beberapa metode dapat menghasilkan kalus embrio somatik dalam volume besar, tetapi mengalami hambatan dalam regenerasi tanamannya, sehingga pada kenyataannya penerapan

teknik perbanyakan tersebut belum mencapai efisiensi yang cukup tinggi (Young *et al.*, 2001; Park *et al.* 2002).

Embriogenesis somatik pada beberapa eksplan tanaman dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung atau dapat terjadi keduanya pada eksplan yang sama. Naz *et al.*, (2008) melakukan penelitian embriogenesis somatik pada kotiledon muda dan kalus yang berasal dari daun kacang-kacangan. Pada penelitian ini embriogenesis somatik terjadi secara bersama-sama, secara langsung maupun tidak langsung. Beberapa peneliti lebih menyukai cara langsung pada tanaman vinca (Hashemloian *et al.*, 2008), pada kopi arabika (Gatica *et al.*, 2008), gandum (Eudes *et al.*, 2003).

Kecepatan proses embriogenesis somatik dipengaruhi oleh dua faktor pembatas yaitu inisiasi embrio somatik dan regenerasi tanaman. Keduanya membutuhkan kondisi yang tepat termasuk komposisi media dan zat pengatur tumbuh. Di era tahun 2000, protokol regenerasi tanaman *Phalaenopsis* direalisasikan menggunakan medium 1/2 nutrisi Murashige and Skoog (MS)

* Penulis untuk korespondensi. E-mail: rianawati5757@yahoo.com

yang ditambahkan thidiazuron 0-1 mg/l dan 2,4-dichloropenoxyacetic acid (2,4-D) 0-10 mg/l, sedangkan plb dapat dibentuk dari kalus tersebut pada medium ½ MS yang ditambah thidiazuron saja sebanyak 0,1-1 mg/l (Ying-Chun *et al.*, 2000). Park *et al.* (2002b) dan Chowdhury *et al.* (2003) juga melakukan perbanyakan cepat pada *Phalaenopsis* menggunakan eksplan daun dari mata tunas tangkai bunga, namun media yang digunakan lebih sederhana yaitu menggunakan ½ MS dan diberi tambahan BAP dan NAA untuk inisiasi.

Pada penelitian ini, dipelajari beberapa media untuk menguji respon terhadap inisiasi kalus, proliferasi kalus maupun regenerasi tanaman pada eksplan daun *Phalaenopsis* yang diperoleh dari mata tunas tangkai bunga. Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh media inisiasi, proliferasi dan regenerasi yang optimal untuk pengembangan *Phalaenopsis*, terkait dengan media yang digunakan. Selain itu juga diharapkan dapat digunakan sebagai salah satu bahan pertimbangan dalam pengembangan teknik lain yang berhubungan dengan pengembangan *Phalaenopsis* di masa mendatang khususnya di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Percobaan Instalasi Penelitian Tanaman Hias Pasar Minggu Jakarta Selatan, Laboratorium Biologi Sel Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB, Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Percobaan Instalasi Penelitian Tanaman Hias Cipanas, Cianjur-Jawa Barat dari bulan Januari 2007-Januari 2008.

Materi penelitian menggunakan daun plantlet beberapa hasil silangan *Phalaenopsis* yaitu 377 (*Phal.* Golden Poeker/Sogolisa x *Phal.* Viogold), 642 (*Phal.* Chih Sang's Stripe/Alfonso Ibara/Matao Freed] x *Phal.* *amboinensis*) x Ever Spring Prince), SGN-PV (*Phal.* *amabilis* x *Vanda* FuchdeLight_Lombokensis).

Induksi Pembentukan Kalus

Induksi embrio somatik dengan eksplan irisan daun dari ketiga macam klon *Phalaenopsis* diuji pada lima macam media inisiasi. Kelima macam media tersebut adalah MI-0 hingga MI-4. Komposisi media ditampilkan secara rinci pada Tabel 1. Induksi kalus dilakukan pada ruang gelap dengan suhu 25°C. Mengingat keterbatasan persediaan bahan eksplan, dalam percobaan ini setiap perlakuan terdiri atas 5 botol (setiap botol = ulangan) dan setiap botol berisi 3 eksplan. Percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial dengan faktor pertama adalah klon dan faktor kedua adalah jenis media inisiasi.

Peubah yang diamati dalam percobaan ini meliputi (1) persentase perubahan warna eksplan (2) persentase eksplan hidup (3) persentase eksplan yang mampu

membentuk kalus. Pengamatan dilakukan setiap minggu, mulai 2 minggu setelah tanam (MST) sampai 6 MST.

Data yang terkumpul dianalisis menggunakan SAS Release Window 6.2. Jika ditemukan perbedaan nyata antar perlakuan, maka perbedaan nyata antar nilai rerata perlakuan diuji lanjut menggunakan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

Proliferasi Kalus

Kalus pertama yang diperoleh dari proses induksi kalus dipindahkan ke media MP dan MR agar dapat berproliferasi. Media MP mengandung 1/2MS + 0.5 mg/L 2.4-D + 0.2 mg/l thidiazuron + 2 g/l pepton + 75 ml/l air kelapa, sedangkan media MR mengandung 1/2MS + 0.2 mg/l 2.4-D + 0.4 mg/l BAP + 2 g/l pepton + 75 ml/l air kelapa. Kedua media tersebut diberi tambahan arang aktif 1 g/l. Sebagai media kontrol digunakan media MI-0. Kalus-kalus selanjutnya disubkultur 3 kali pada media yang sama dengan interval waktu 4 minggu yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan 3 ulangan. Tiap perlakuan terdiri atas 5 botol, masing-masing botol berisi sekelompok kalus yang telah ditimbang terlebih dahulu.

Pengamatan dilakukan terhadap (1) jumlah eksplan berkalus yang berproliferasi (2) adanya kalus globuler (3) berat kalus setiap subkultur (4) persentase perubahan berat kalus pada setiap subkultur.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA). Perlakuan yang pengaruhnya nyata dianalisis lanjut dengan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

Perkembangan Kalus dan Regenerasi Tanaman

Plb-plb yang telah terbentuk selama proses embriogenesis diuji secara histologi untuk membuktikan perkembangan yang terjadi selama proses pembentukan embrio. Uji histologi dilakukan pada jaringan kalus yang mengalami proses embriogenesis. Jaringan didehidrasi menggunakan alkohol, pra parafinasi dan parafinasi menggunakan alkohol-xylool dan xylool-parafin. Pewarnaan menggunakan safranin dan alcian blue.

Plb yang telah dihasilkan dari ketiga kali subkultur diuji daya regenerasinya menggunakan media MR hingga terbentuk plantlet. Pada percobaan ini masing-masing klon diregenerasi sebanyak 10 gerombol plb dalam 10 botol kultur dengan ulangan 3 kali, dalam rancangan acak lengkap.

Peubah yang diamati adalah (1) jumlah calon tunas tiap gerombol kalus dan (2) jumlah tunas tiap gerombol kalus. Pengamatan dilakukan setelah 16 minggu dalam media regenerasi.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA). Perlakuan yang pengaruhnya nyata dianalisis lanjut dengan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

Tabel 1. Komposisi media inisiasi tanaman yang digunakan dalam penelitian

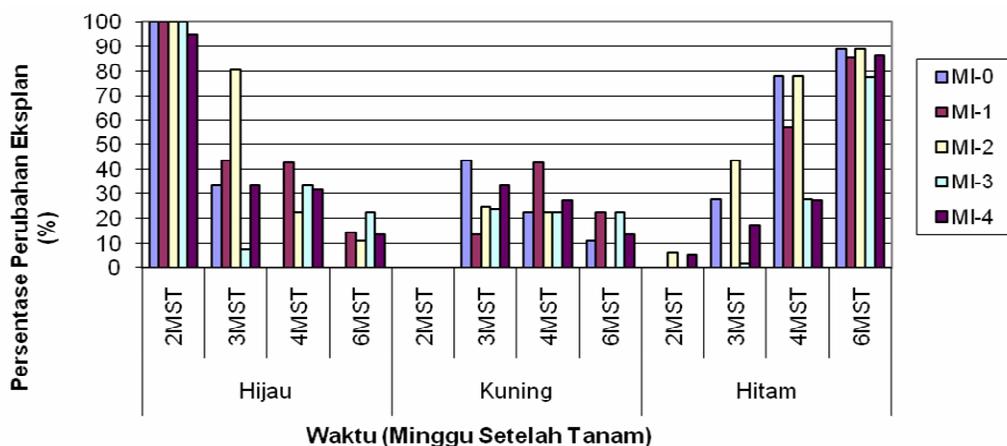
Komponen media MS	MI-0	MI-1	MI-2	MI-3	MI-4
makro elemen	penuh	1/2	1/3	1/2	1/2
Mikro elemen	penuh	1/2	penuh	1/2	penuh
Na-FeEDTA	penuh	penuh	penuh	penuh	penuh
Vitamin	penuh	penuh	penuh	penuh	penuh
Myoinositol (mg/l)	100	100	100	100	100
2,4-D (mg/l)	-	0.5	2	0.5	-
NAA (mg/l)	-	1	-	-	-
BAP (mg/l)	-	1	-	0.5	1
TDZ (mg/l)	-	-	-	0.2	2
Pepton (g/l)	-	-	-	-	-
Air kelapa (ml/l)	-	75	75	75	75
Sukrosa (g/l)	20	20	20	20	20
Gelrite (g/l)	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52
Charcoal (g/l)	-	-	-	-	-
pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7

HASIL DAN PEMBAHASAN

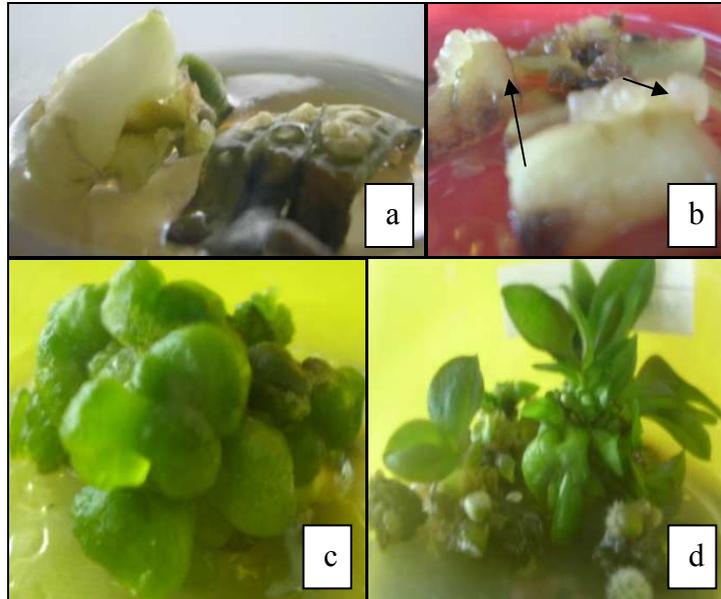
Induksi Pembentukan Kalus

Seperti pada tanaman lainnya, proses embrio somatik pada *Phalaenopsis* dapat dilakukan secara tidak langsung melalui tahapan pembentukan kalus dan membutuhkan zat pengatur tumbuh spesifik (Arnold *et al.*, 2002). Tahapan pembentukan kalus diawali dengan inisiasi kalus dari eksplan. Dalam penelitian ini inisiasi dilakukan menggunakan eksplan daun *Phalaenopsis* yang berasal dari biji. Pengamatan pada kelima media inisiasi MI-0 hingga MI-4 pada irisan daun ternyata tidak langsung membentuk kalus, namun didahului dengan pembengkakan jaringan daun meskipun tidak semua eksplan mengalami hal tersebut. Menurut Gill *et*

al. (2004), pembengkakan eksplan merupakan pemanjangan sel yang disebabkan adanya 2.4-D. Meskipun beberapa media yang digunakan mengandung 2.4-D, tidak semua media memberikan dampak yang sama pada irisan daun. Media yang memberikan respon pembengkakan hanya media yang mengandung 0.5 mg/l 2.4-D. Pada umumnya daun yang diris masih berwarna hijau hingga 6 minggu setelah tanam dan inkubasi di ruang gelap. Lambat laun eksplan berubah warna menjadi kuning kecoklatan dan kemudian menghitam. Gambar 1 menunjukkan bahwa persentase eksplan yang berubah hitam semakin besar pada semua media yang digunakan dengan bertambahnya waktu. Bahkan pada media MI-0 dan MI-2, eksplan hampir semua menghitam.



Gambar 1. Persentase perubahan eksplan irisan daun *Phalaenopsis* menjadi hitam pada beberapa minggu setelah tanam



Gambar 2. (a) dan (b) Inisiasi kalus irisan eksplan daun yang mulai membengkak dan berkalus membentuk proembrio (c) plb (d) regenerasi tanaman dari plb

Perubahan warna atau kesegaran eksplan tidak menjadi tanda bahwa eksplan yang kecoklatan tidak mampu membentuk kalus. Pada kenyataannya eksplan yang berubah coklat muda beberapa masih mampu membentuk kalus seperti terlihat pada Gambar 2a. Kalus-kalus globular yang berwarna transparan tumbuh disela irisan eksplan (Gambar 2b).

Tabel 2 menunjukkan bahwa respon ketiga genotipe yang digunakan dalam pembentukan kalus berbeda-beda. Pada semua media perubahan eksplan dari hijau menjadi hitam terlihat fenomena yang hampir sama yaitu bahwa eksplan yang menghitam jumlahnya paling banyak dibandingkan dengan yang masih hijau. Selain itu dapat dilihat bahwa persentase eksplan yang hidup menunjukkan persentase lebih tinggi dari pada eksplan yang hijau. Hal ini karena eksplan yang berwarna coklat atau hitam juga dapat membentuk kalus.

Persentase pembentukan kalus tertinggi sebesar 40% terbentuk dari media MI-3 pada klon 642, media MI-1 dan MI-3 pada SGN-PV. Setelah itu diikuti oleh klon 377 pada media yang sama sebesar 33.3%. Media tersebut ternyata merupakan media yang sesuai untuk pembentukan kalus. Hal ini karena media MI-1 dan MI-3 mengandung kombinasi zat pengatur tumbuh yang seimbang antara auksin dan sitokinin. Keseimbangan ini mampu mendorong terbentuknya kalus. Media MI-2 yang mengandung auksin saja dan MI-4 yang mengandung kombinasi sitokinin saja tidak mampu menstimulasi terbentuknya kalus. Berdasarkan

penelitian terdahulu pengaruh thidiazuron sangat penting untuk proses morfogenesis *in vitro* ataupun embriogenesis somatik karena potensinya sebagai bioregulan (Jiang *et al.*, 2005). Namun demikian apabila thidiazuron digunakan tanpa kombinasi zat pengatur tumbuh yang lain, pengaruhnya akan berbeda.

Proliferasi Kalus

Hasil pengamatan pada percobaan proliferasi menunjukkan bahwa perkembangan kalus yang diperoleh dari proses inisiasi memiliki respon yang beragam terhadap medium proliferasi. Dalam proses proliferasi kalus, kalus membentuk kalus globuler yaitu kalus yang permukaannya membentuk bulatan-bulatan mengkilap, atau kalus non globuler yaitu kalus yang permukaannya rata atau bergerigi halus.

Tabel 3 menunjukkan hasil percobaan proliferasi kalus pada 3 klon *Phalaenopsis*. Ketiga klon 377, 642 dan SGN-PV menghasilkan volume kalus globuler yang sama pada media MR yaitu yang dinyatakan sebagai ++ yang artinya volume sebesar 2 cm², walaupun berbeda jumlah eksplan yang mampu membentuk kalus globuler yang berwarna hijau. Klon SGN-PV menghasilkan volume kalus non globuler terbanyak baik pada media MP maupun MR. Media MR juga mendukung terbentuknya kalus dengan rata-rata berat lebih dari 1 gram pada klon 642 dan SGN-PV. Sementara pada klon 377 pembentukan kalus lebih terhambat bila dibandingkan dengan klon 642 dan SGN-PV.

Tabel 2. Pengaruh komposisi media inisiasi terhadap perubahan eksplan daun 3 klon *Phalaenopsis* pada 6 MST

Medium dan Klon	Jumlah Eksplan	Respon Eksplan				% Eksplan Hidup	% Eksplan Yang Membentuk Kalus
		Perubahan Warna Eksplan					
		Hijau	Kuning	Coklat	Hitam		
Klon 377							
MI-0	15	0	0	7	8	00.00	00.00 b
MI-1	15	8	0	2	5	53.33	33.33 a
MI-2	15	2	2	0	11	26.66	13.33 b
MI-3	15	4	2	2	8	40.00	33.33 a
MI-4	15	3	2	1	9	33.33	13.33 b
Klon 642							
MI-0	15	0	0	1	14	00.00	00.00 b
MI-1	15	3	2	1	9	33.33	00.00 b
MI-2	15	1	1	2	11	13.33	00.00 b
MI-3	15	6	2	2	5	53.33	40.00 a
MI-4	15	3	1	2	9	26.66	00.00 b
Klon SGN-PV							
MI-0	15	0	0	2	13	00.00	00.00 b
MI-1	15	4	2	1	8	40.00	40.00 a
MI-2	15	3	2	4	6	33.33	6.66 b
MI-3	15	6	1	1	7	46.66	40.00 a
MI-4	15	3	2	3	7	33.33	6.66 b

Keterangan : angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%

Tabel 3. Pengaruh komposisi media proliferasi terhadap perkembangan kalus 3 klon *Phalaenopsis* pada 12 MST (Minggu Setelah Tanam)

Medium	Jumlah Total Eksplan Kalus Berproliferasi	Jenis Kalus		Rata-rata Berat Kalus (g)
		Globuler Hijau	Non Globuler Pucat	
Klon 377				
MI-0	5	0/-	5/-	0.1576
MP	16	2/++	14/+	0.3713
MR	5	2/++	3/+	0.3658
Klon 642				
MI-0	5	0/-	0/-	0.0000
MP	9	2/+	7/+	0.2236
MR	17	4/++	13/+++	1.0129
Klon SGN-PV				
MI-0	4	0/-	4/-	0.1489
MP	37	12/++	25/+++	0.9391
MR	14	4/++	10/+++	1.0015

Keterangan : Setiap satu tanda (+) merupakan volume kalus ± 1 cm³. Setiap satu tanda (-) mewakili volume 0.5 cm³. Angka di depan garis miring menyatakan jumlah total kalus

Tabel 4. Pengaruh komposisi media proliferasi kalus terhadap pembentukan kalus

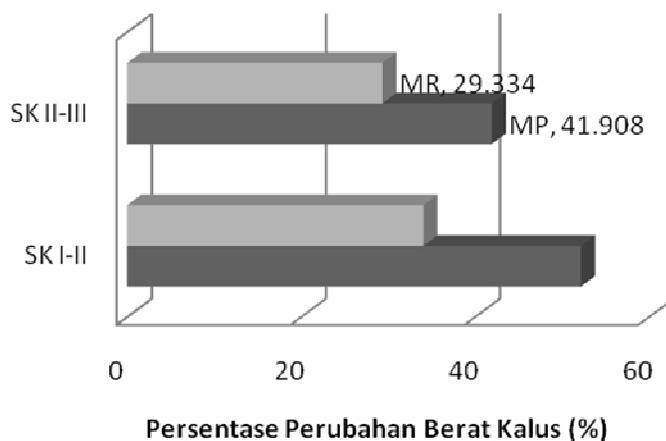
Media	Berat Kalus (g)		
	Subkultur I	Subkultur II	Subkultur III
MP	2.47a	5.07a	9.09a
MR	3.25a	5.40a	7.36a

Keterangan : angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%

Rata-rata produksi kalus dalam tiga kali subkultur dengan interval 4 minggu mencapai 9.09 g pada media MP dan 7.36 g pada media MR. Apabila dilihat dari berat kalus media MP lebih baik dari pada media untuk proliferasi kalus yaitu MR. namun apabila dilihat dari analisis ragam ternyata tidak ada beda nyata pada kedua media tersebut (Tabel 4). Ditinjau dari peningkatan produksi kalus pada masing-masing subkultur (Gambar 3). peningkatan produksi kalus pada subkultur I ke subkultur II lebih besar dari pada subkultur ke II ke subkultur III. Hal ini dapat dikatakan bahwa kemampuan produksi kalus semakin menurun pada subkultur berikutnya.

Pengaruh media MP dan MR terhadap pembentukan kalus terjadi akibat kontribusi kombinasi zat

pengatur tumbuh TDZ dengan 2.4-D atau BAP dengan 2.4-D yang seimbang untuk pembelahan sel. Namun akibat akumulasi zat pengatur tumbuh tersebut dengan adanya sitokinin endogenous akan menurunkan atau menghambat pembelahan sel oleh karena itu semakin sering disubkultur semakin rendah kemampuan sel untuk membelah. Chang and Chang (2000) menyatakan bahwa TDZ yang terakumulasi menjadi sangat tinggi konsentrasinya mampu menghambat pembelahan sel. tetapi secara umum TDZ yang merupakan derivat phenylurea dipercaya lebih aktif menstimulasi pembentukan tunas dari pada somatik embriogenesis (Park *et al.*, 2002a; Jiang *et al.*, 2005).

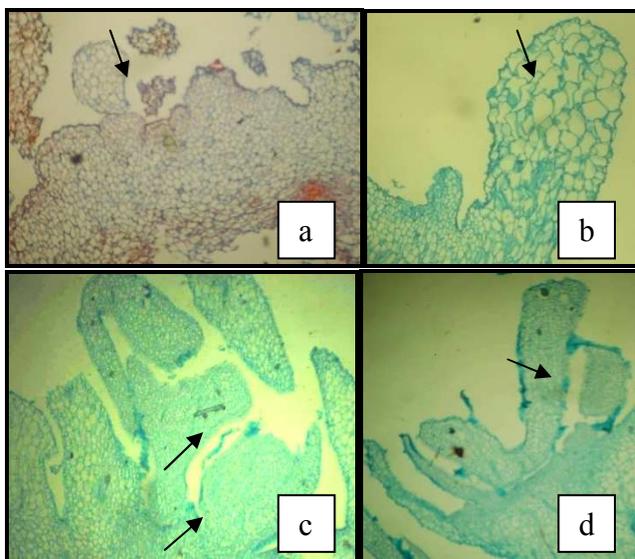


Gambar 3. Penambahan berat kalus dari subkultur I hingga ke III pada media MP dan MR

Perkembangan Kalus dan Regenerasi Tanaman

Pada penelitian ini, proses embriogenesis somatik telah terbukti tercapai menggunakan media MR yang mengandung BAP 0.4mg/l dan 2.4-D 0.2mg/l. BAP pada konsentrasi tersebut mampu menginduksi sel-sel untuk melewati proses embriogenesis somatik seperti bentuk globuler, torpedo dan bentuk hati yang akhirnya membentuk kotiledon, primordia tunas dan akar

(Gambar 4a-d). Hormon 2.4-D umumnya digunakan untuk menginduksi kalus, namun dalam bentuk kombinasi dengan BAP mampu menginduksi embrio somatik. Pada penelitian semacam yang dilakukan oleh Ishii *et al.* (1998) kombinasi BAP dan 2.4-D telah digunakan untuk menginduksi embrio somatik pada *Phalaenopsis* dengan konsentrasi 0.1-1 mg/L.



Gambar 4. Proses embriogenesis somatik pada kalus *Phalaenopsis* sp L.
 (a) irisan melintang bentuk kalus globuler dan jaringan kalus sekitarnya (b) embrio somatik bentuk torpedo
 (c) perkembangan embrio somatik dengan calon kotiledon, primordia tunas dan akar (d) irisan melintang perkembangan embrio somatik yang telah membentuk daun.

Hasil percobaan regenerasi tanaman yang disajikan pada Tabel 5 memperlihatkan bahwa selama proses regenerasi, kecepatan pembentukan organ berbeda karena pada saat yang sama sudah terbentuk tunas juga masih terdapat kalus globuler (Gambar 2d dan 2e).

Selain itu di antara ketiga klon tersebut terdapat perbedaan dalam hal kemampuan membentuk tunas maupun calon tunas pada media yang diberi tambahan BAP dan 2.4-D.

Tabel 5. Daya regenerasi kalus 3 klon *Phalaenopsis* pada media MR

Klon	Jumlah kelompok kalus	Jumlah calon tunas per gerombol kalus			Jumlah tunas per gerombol kalus		
		4MST	8MST	12MST	4MST	8MST	12MST
Klon SGN-PV	30	17a	20a	25a	3c	8c	18b
Klon 377	30	12bc	17b	19b	7b	15a	22a
Klon 642	30	16ab	19a	22ab	10a	12b	15bc

Keterangan : MST (Minggu setelah Tanam); Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%

Media yang digunakan menghasilkan respon berbeda terhadap regenerasi tanaman ketiga klon. Pada 12 MST pembentukan calon tunas terbanyak didapatkan pada klon SGN-PV sedangkan pembentukan tunas terbanyak diperoleh pada klon 377 disusul oleh SGN-PV kemudian 642. Secara visual ketiga klon memiliki penampilan dan karakter berbeda (Gambar 5). Klon 377

memiliki lembar daun paling runcing bila dibandingkan dengan yang lain dan lebih lambat respon regenerasinya dibandingkan dengan SGN-PV yang merespon lebih cepat. Perbedaan postur tanaman seperti terlihat pada Gambar 5 tersebut bukan merupakan pengaruh dari media namun merupakan pengaruh perbedaan genotipe.



Gambar 5. Hasil regenerasi tanaman pada klon 642. 377 dan SGN-PV

Pengaruh media MR terhadap regenerasi tanaman diduga berkaitan dengan kandungan dan konsentrasi benzylaminopurin (BAP) dan 2.4-dichloropenoxyacetic acid (2.4-D) yang cukup sesuai untuk ketiga klon tersebut. Konsentrasi 0.4 mg/l BAP dan 0.2 mg/l 2.4-D merupakan kombinasi yang seimbang dan efektif untuk menginduksi regenerasi tunas pada *Phalaenopsis* seperti yang dinyatakan oleh Chowdhury *et al.* (2003).

KESIMPULAN

Embrio somatik dapat diinduksi melalui tahapan inisiasi kalus, proliferasi kalus dan selanjutnya untuk pengembangannya kalus diregenerasikan menjadi tanaman. Media MI-3 yang mengandung thidiazuron 0.1 mg/l dan 10 mg/l 2.4-D merupakan media yang paling baik untuk menginisiasi kalus. Sedangkan media MP (1/2 MS + 0.2 mg/l TDZ + 0.5 mg/l 2.4-D) dan MR (1/2 MS + 0.4 mg/l BAP + 0.2 mg/l 2.4-D), dapat mempengaruhi pembentukan kalus dan regenerasi tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, S.V., I. Sabali, P. Bozhlov, J. Dyachok, L. Filonova. 2004. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69:233-249.
- Chang, C., W. Chang. 2000. Effect thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinensis* WilldWilld in vitro. *Plant Growth Reg.* 30:171-175.
- Chowdhury, I., M.D. Abu Reza, M. Rahman, O. Islam. S. Matsui. 2003. Effect of plant growth regulation on callus proliferation, plantlet regeneration and growth of plantlets of *Doritaenopsis* Orchid. *Biotechnology* 2(3):214-221.
- Eudes, F., S. Acharya, A. Laroche, L.B. Selinger, K.J. Cheng. 2003. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell Tissue & Organ Cult.* 73:147-157.
- Gatica, A.M., G. Arrieta, A.M. Espinoza. 2008. Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L cvs Caturra & Catuai : Effect of triacontanol, light condition and medium consistency. *Agronomia Costaricense* 32(1):139-147.
- Gill, N.K., R. Gill, S.S. Gisal. 2004. Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L). *Indian J. Biochem.* 3:119-123.
- Hashemloian, B.D., A.A. Azimi, A. Majid, H. Ebrahimzadeh. 2008. Abnormal plantlets regeneration through direct somatic embryogenesis on immature seeds of *Vinca herbacea* Waldst & Kit. *African J. Biotech.* 7(11):179-183.
- Ishii, Y., T. Takamura, M. Goi, M. Tanaka. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 17:446-450.
- Jiang, B., Y. Yang, M. Guo, Z. Guo, Y. Chen. 2005. Thidiazuron-induced in vitro shoot organogenesis of the medicinal plant *Arnebia eichroma* (Royle) Johnston. *In vitro Cell Dev. Biol-Plant* 41:677-681.
- Kozir, P., S. Skof, Z. Luthan. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* Orchids. *Acta Agriculturae Slovenica* 82:233-242.
- Naz, S., A. Ali, F.A. Siddique, J. Iqbal. 2008. Somatic embryogenesis from immature cotyledone and leaf calli of chickpea (*Cicer arietinum* L). *Pak. J. Bot.* 40(2):523-531.
- Park, S.Y., E.C. Yeung, D. Chakrabarty, K.Y. Paek. 2002a. An efficient direct induction of protocorm like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Report* 21: 46-51.

- Park, S.Y., H.N. Murthy, Y.K. Paek. 2002b. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk.-derived leaves. *In vitro Cell Dev. Biol-Plant* 38:168-172.
- Sinha, P., M.L. Hakim, M.F. Alam. 2007. Efficient micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* (L) BL cv Cool Breeze using inflorescence axis thin sections as explants. *Propagation of Ornamental Plants Vol 7(1):9-15.*
- Smith, R.H. 2000. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Second Edition.* Academic Press. Diego. San Fransisco. New York. Boston Sydney. Tokyo.
- Ying-Chun, C., C. Chen, C. Wei-Chin. 2000. A reliable culture of protocol for plant regeration from callus *Phalaenopsis*. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant.* 36(5):420-423.
- Young, P.S., H.N. Murthy, P.K. Yeuep. 2001. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 63:67-72.