

Aplikasi 2,4-D dan TDZ dalam Pembentukan dan Regenerasi Kalus pada Kultur Anther *Anthurium*

Winarto, B.¹⁾, N.A. Mattjik²⁾, A. Purwito²⁾, dan B. Marwoto¹⁾

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

²⁾Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti No.1, Kampus Dramaga, Bogor 16680

Naskah diterima tanggal 22 Juni 2009 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 4 Januari 2010

ABSTRAK. Studi kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ dalam pembentukan kalus dan regenerasinya pada kultur anther *Anthurium* dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias sejak bulan November 2007 hingga Agustus 2008. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ terhadap pembentukan dan regenerasi kalus. Spadik *Anthurium andraeanum* kultivar Tropical yang 50% stigmanya berada dalam kondisi reseptif optimal, kalus hasil regenerasi, dan medium MWR-3 yang mengandung BAP 0,75 mg/l, NAA 0,02 mg/l, sukrosa 30 g/l, dan gelrit 2,0 g/l digunakan dalam penelitian ini. Konsentrasi 2,4-D dan TDZ yang diuji ialah 0, 0,5, 1,0, dan 2,0 mg/l. Rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan digunakan dalam penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ berpengaruh nyata terhadap pembentukan dan regenerasi kalus. Aplikasi 2,4-D 0,5 mg/l yang dikombinasikan dengan TDZ 2,0 mg/l merupakan kombinasi terbaik untuk pembentukan kalus dengan potensi tumbuh anther mencapai 58%, 38% anther beregenerasi dan rerata 2,3 anther membentuk kalus tiap perlakuan. Kombinasi 2,4-D 1,0 mg/l dengan TDZ 0,5 mg/l merupakan kombinasi terbaik untuk regenerasi kalus dengan 5,3 tunas per eksplan.

Katakunci: *Anthurium*; Kultur anther; 2,4-D; TDZ; Kalus; Regenerasi

ABSTRACT. Winarto, B., N.A. Mattjik, A. Purwito, and B. Marwoto. 2010. Application of 2,4-D and TDZ on Callus Formation and Its Regeneration of Anthurium Anther Culture. Study of 2,4-D and TDZ concentration combination in callus formation and its regeneration on anther culture of *Anthurium* was conducted at Tissue Culture Laboratory of Indonesian Ornamental Crops Research Institute from November 2007 to August 2008. This study was aimed to determine the effect of concentration combination of 2,4-D and TDZ on callus formation, growth, and its regeneration. Spadix of *Anthurium andraeanum* cv. Tropical which 50% of its stigma was in optimum receptive, MWR-3 medium containing BAP 0.75 mg/l, NAA 0.02 mg/l, sucrose 30 g/l, and gelrite 2.0 g/l and callus derived from the anthers were used in the experiments. Concentrations of 2,4-D and TDZ tested in the experiment for callus formation and its regeneration were 0, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/l. Factorial experiment with four replications was arranged in a completely randomized design. The results of the study indicated that combination of 2,4-D and TDZ gave significant effect on callus induction and its regeneration. In callus formation, 2,4-D 0.5 mg/l combined with TDZ 2.0 mg/l was the most suitable treatment with potential anther growth up to 58%; and 38% of anther regenerated with average 2.3 of anthers produced callus per treatment. 2,4-D 1.0 mg/l combined with TDZ 0.5 mg/l was the most appropriate treatment for callus regeneration into shoots with 5.3 shoots/explant.

Keywords: *Anthurium*; Anther culture; 2,4-D; TDZ; Callus; Regeneration.

Respons sel, jaringan, dan organ yang dikultur secara in vitro bervariasi bergantung pada komponen kondisi kultur, jenis eksplan, dan genotip tanaman. Seringkali kombinasi dari dua atau lebih komponen tersebut yang diaplikasikan secara simultan maupun parsial diperlukan untuk meningkatkan respons sel, jaringan, ataupun organ dalam kultur in vitro. Pertumbuhan dan morfogenesis eksplan tersebut dikendalikan oleh keseimbangan antara zat pengatur tumbuh (ZPT) endogen maupun eksogen (Laslo dan Vicas 2008). Selain itu beberapa ZPT sintetik juga dapat memodifikasi dan memengaruhi ZPT endogen yang kadang bersifat menurun pada generasi berikutnya.

Kultur anther merupakan salah satu teknik kultur jaringan yang keberhasilannya dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi auksin maupun sitokinin. Thengane *et al.* (1994) menggunakan medium MS yang ditambah dengan 2,4-D 1,0 mg/l dan BAP 0,5 mg/l untuk menginduksi pembentukan embrio pada kultur anther bunga matahari. Medium N6 yang mengandung NAA 1,0 mg/l dan BA 0,2 mg/l sesuai untuk pembentukan kalus pada kultur anther bunga matahari (Coumans dan Zong 1995), sedangkan Saji dan Sujatha (1998) memanfaatkan NAA 0,1 mg/l dan BA 0,5 mg/l pada medium MS pada kultur yang sama untuk pembentukan kalus.

Pembentukan dan regenerasi kalus pada kultur anther lili dapat dilakukan pada medium N6 yang mengandung 2,4-D 2 mg/l (Arzeta-Fernandez *et al.* 1997). Pada kultur anther Cyclamen, Ishizaka (1998) menggunakan medium B5 yang ditambah dengan 0,1-1,0 mg/l NAA atau 1,0 mg/l 2,4-D untuk induksi kalus embriogenik.

Keberhasilan penerapan teknologi kultur anther pada berbagai jenis tanaman sangat ditentukan oleh penggunaan ZPT, termasuk pada tanaman kentang (Uhrig 1985), *Linum usitatissimum* (Nichterlein *et al.* 1991), asparagus (Falavigna *et al.* 1999), apel (Hofer 2004), *poplar* (Stoehr dan Zsuffa 1990), dan jeruk (Germana *et al.* 2000). Pada kultur anther kentang, penggunaan IAA 0,1 mg/l dan BA 1,0-2,5 mg/l sesuai untuk pembentukan kalus dan regenerasi kalus dapat dilakukan pada medium yang bebas dari ZPT (Uhrig 1985). Pada *L. usitatissimum*, 2,4-D 2,0 mg/l dan BAP 1,0 mg/l dengan zeatin 1,0 mg/l (Nichterlein *et al.* 1991), pada asparagus, NAA 2,0 mg/l dan BA 1,0 mg/l dengan NAA 1,0 mg/l dan BAP 0,5 mg/l (Falavigna *et al.* 1999), pada apel, IBA 0,2 mg/l, NAA 4,0 mg/l, kinetin 0,2-0,5 mg/l, dan GA_3 1,0 mg/l dengan IBA 0,1 mg/l, TDZ 0,1 mg/l, dan GA_3 1,0 mg/l (Hofer 2004), pada *poplar*, BA 5 μ M, dengan BA 1,5 μ M (Stoehr dan Zsuffa 1990), pada jeruk, NAA 0,02 mg/l, kinetin 1,0 mg/l, BA 0,5 mg/l, dan zeatin 0,5 mg/l (Germana *et al.* 2000) pada media dasar dapat menginduksi pembentukan dan regenerasi kalus dalam kultur anther.

Pada kultur anther *Anthurium*, kombinasi TDZ 1,5 mg/l, BAP 0,75 mg/l, dan NAA 0,02 mg/l merupakan kombinasi ZPT yang paling potensial untuk menginduksi kalus (Winarto *et al.* 2009a). Namun pada penelitian lain ditemukan bahwa pemberian 2,4-D 0,5 mg/l, TDZ 0,5, dan 1,5 mg/l juga berpengaruh signifikan terhadap pembentukan dan regenerasi kalus anther *Anthurium* (Winarto *et al.* 2009b).

Tujuan penelitian ialah mengetahui kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ pada medium terseleksi terhadap pembentukan, pertumbuhan, dan regenerasi kalus. Diduga terdapat satu kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ yang optimal untuk pembentukan dan regenerasi kalus.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias mulai

bulan November 2007 hingga Agustus 2008. Spadik *Anthurium andraeanum* kultivar Tropical yang 50% stigmanya telah reseptif digunakan dalam penelitian ini. Anther yang digunakan untuk kegiatan penelitian diisolasi dari daerah transisi spadik. Spadik disterilkan menggunakan teknik standar yang telah berhasil dikembangkan pada penelitian sebelumnya (Winarto *et al.* 2009c). Teknik isolasi anther optimal juga diterapkan dalam penelitian ini (Winarto *et al.* 2009a).

Medium dasar yang digunakan ialah MWR-3 yang mengandung BAP 0,75 mg/l, NAA 0,02 mg/l, sukrosa 30 g/l, dan gelrit 2,0 g/l. pH medium diatur 5,8 dan disterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit pada tekanan atmosfer 15 kPsi.

Botol kultur plus anther selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap dengan suhu $24 \pm 1^\circ\text{C}$ selama dua bulan. Kemudian botol kultur diinkubasi pada kondisi terang selama 12 jam fotoperiod pada suhu yang sama di bawah lampu fluoresens dengan intensitas cahaya $\pm 13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ untuk pertumbuhan dan perkembangan kalus lebih lanjut.

Penyiapan kalus untuk percobaan pertumbuhan dan regenerasi kalus dilakukan dengan menanam anther pada medium dasar. Kalus dari hasil regenerasi digunakan sebagai sumber eksplan, dipotong ± 3 mm panjang, lebar, dan tingginya. Potongan ini selanjutnya dikulturkan pada medium yang digunakan dalam penelitian ini.

Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Pembentukan Kalus

Konsentrasi 2,4-D yang diuji ialah 0, 0,5, 1,0, dan 2,0 mg/l, sedangkan konsentrasi TDZ ialah 0, 0,5, 1,0, dan 2,0 mg/l.

Rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan digunakan dalam percobaan ini. Tiap ulangan terdapat tiga botol. Tiap botol terdiri atas enam anther yang dikultur.

Parameter yang diamati ialah (1) potensi tumbuh anther (%) (diamati satu bulan setelah kultur inisiasi dengan menghitung jumlah anther yang tetap segar dibagi dengan total anther yang dikultur dikalikan 100%), (2) persentase regenerasi anther (diamati dua bulan setelah kultur inisiasi dengan menghitung jumlah anther yang membentuk kalus dibagi dengan total anther yang dikultur dikalikan dengan 100%), dan (3) jumlah anther yang membentuk kalus (diamati tiga bulan setelah kultur inisiasi).

Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Pertumbuhan dan Regenerasi Kalus

Konsentrasi 2,4-D yang digunakan ialah 0, 0,5, 1,0, dan 2,0 mg/l, sedangkan konsentrasi TDZ yang digunakan ialah 0, 0,5, 1,0, dan 2,0 mg/l.

Rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan digunakan dalam percobaan ini. Tiap ulangan terdapat tiga botol. Tiap botol terdiri dari empat eksplan dengan ukuran $\pm 3 \times 3 \times 3$ mm (panjang, lebar, dan tinggi kalus).

Parameter yang diamati ialah (1) persentase tumbuh kalus (PTK), (2) volume kalus (VK, mm³), (3) skor bakal tunas (SBT) – s/d +++, (– tidak ada bakal tunas yang teramati, + terdapat 1-5 bakal tunas, ++ terdapat 6-10 bakal tunas, +++ terdapat 11-20 bakal tunas, dan ++++ terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan yang diamati), dan (4) jumlah tunas (JT). Pengamatan dilakukan 2,5-3 bulan setelah kultur awal untuk skoring bakal tunas, sedangkan jumlah tunas dihitung dan diamati 4-4,5 bulan setelah kultur inisiasi.

Data yang berhasil dikumpulkan pada percobaan pertama dan kedua dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) menggunakan program SAS Release Window 6.12. Jika nilai F hitung lebih besar dari nilai F tabel maka dilakukan uji lanjut perbedaan rerata perlakuan menggunakan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Pembentukan Kalus

Meskipun jumlah anther yang membentuk kalus tidak setinggi yang diharapkan (berkisar antara 1-4 anther), tetapi perlakuan kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ terbukti memberikan pengaruh yang nyata hingga sangat nyata terhadap keberhasilan kultur anther *Anthurium*. Kedua perlakuan juga memberikan pengaruh interaksi yang sangat nyata terhadap semua peubah yang diamati.

Konsentrasi 2,4-D 0,5 mg/l paling sesuai untuk menginduksi pembentukan kalus. Perlakuan tersebut mampu menstimulasi potensi tumbuh anther hingga 46%, 25% di antaranya beregenerasi, dan rerata 1,5 anther membentuk

kalus per perlakuan. Konsentrasi 2,4-D lain justru menurunkan pembentukan kalus (data tidak ditunjukkan). Peningkatan konsentrasi TDZ cenderung meningkatkan pembentukan kalus, konsentrasi TDZ-4 2,0 mg/l merupakan konsentrasi terbaik, 15% mampu beregenerasi dengan rerata 0,9 anther membentuk kalus per perlakuan (data tidak ditunjukkan).

Dari percobaan ini terlihat bahwa 2,4-D 0,5 mg/l yang dikombinasikan dengan TDZ 2,0 mg/l merupakan kombinasi konsentrasi ZPT yang paling sesuai untuk pembentukan kalus. Kombinasi tersebut menginduksi kalus hingga 58%, 38% di antaranya beregenerasi, dan rerata 2,3 anther membentuk kalus per perlakuan (Tabel 1, Data PTA dan PRA tidak ditunjukkan), sedangkan kombinasi 2,4-D 0,5 mg/l dengan TDZ 1,0 mg/l merupakan perlakuan terbaik kedua dengan potensi tumbuh anther mencapai 50%, 29% beregenerasi, dan rerata 1,8 anther membentuk kalus per perlakuan.

Pengaruh 2,4-D dan TDZ terhadap Pertumbuhan dan Regenerasi Kalus

Pemberian 2,4-D dan TDZ berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus. Interaksi antarlevel perlakuan juga berpengaruh nyata terhadap semua parameter yang diamati. Perlakuan 2,4-D cenderung menurunkan persentase pertumbuhan kalus, tetapi meningkatkan pertumbuhan dan regenerasi kalus. Pertumbuhan kalus tertinggi mencapai 175 mm³ per kalus dan tunas terbanyak 2,5 tunas per eksplan terdapat pada perlakuan 2,4-D-3 1,0 mg/l, diikuti oleh 2,4-D-4 2,0 mg/l dengan 152 mm³ per kalus dan 1,4 tunas per eksplan (data tidak ditunjukkan). Kondisi yang hampir sama juga ditemukan pada perlakuan tanpa TDZ, yang memberikan persentase tumbuh kalus hingga 81% dengan 133 mm³ per kalus dan 1,6 tunas per eksplan. Hasil tersebut meningkat pada TDZ 0,5 mg/l dengan pertumbuhan kalus tertinggi (158 mm³) dan jumlah tunas terbanyak (1,9 tunas per eksplan). Perlakuan tersebut juga berbeda nyata dengan perlakuan yang lain (data tidak ditunjukkan). Dari hasil tersebut diketahui bahwa TDZ 0,5 mg/l merupakan konsentrasi tertinggi yang berpengaruh positif terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus. Peningkatan TDZ justru menurunkan pertumbuhan dan regenerasi kalus.

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi 2,4-D dan TDZ terhadap jumlah kalus (*Effect of concentration of 2,4-D and TDZ on number of callus produced*)

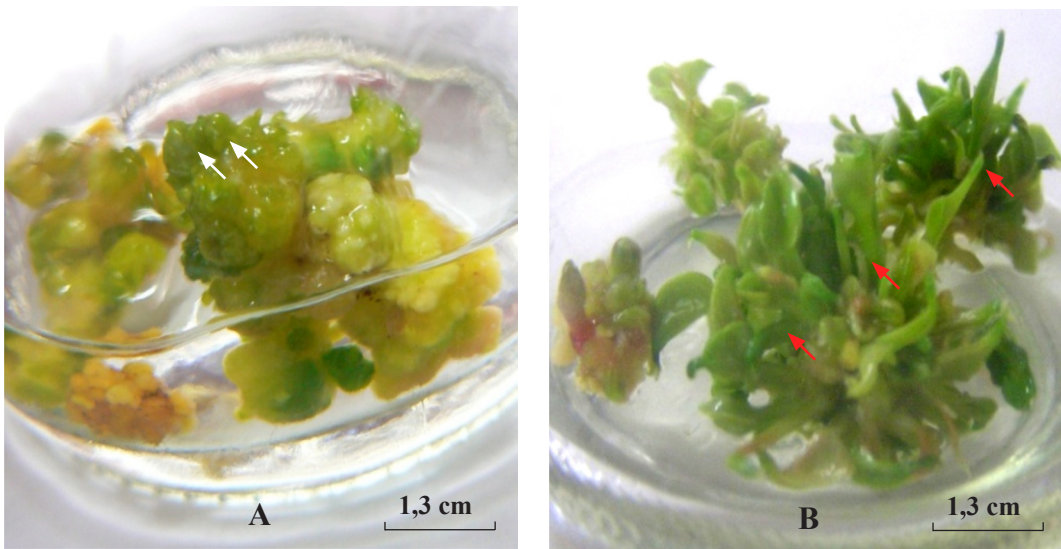
Konsentrasi TDZ (TDZ concentration), mg/l	Jumlah kalus per perlakuan (<i>Number of callus per treatment</i>)			
	Konsentrasi 2,4-D (2,4-D concentration), mg/l			
	0	0,5	1,0	2,0
0	0,0 b	0,4 b	1,5 a	0,0 b
0,5	0,0 b	1,5 a	0,5 b	0,3 a
1,0	0,4 b	1,8 a	0,2 b	0,0 b
2,0	1,3 a	2,3 a	0,0 b	0,0 b
KK (CV), %	16,93	14,57	20,29	11,39

Konsentrasi 2,4-D 1,0 mg/l yang dikombinasikan dengan berbagai konsentrasi TDZ memberikan hasil induksi bakal tunas yang lebih baik dibanding kombinasi perlakuan yang lain. Bakal tunas yang diinduksi berkisar antara 1-10 (Tabel 2). Kombinasi yang juga berpengaruh positif terhadap pembentukan bakal tunas ialah 2,4-D 2,0 mg/l dengan variasi konsentrasi TDZ. Bakal tunas umumnya terbentuk pada 3,5 bulan setelah kultur inisiasi. Bakal tunas tersebut terus tumbuh hingga membentuk tunas sempurna dengan 1-2 daun 4,5 bulan setelah kultur inisiasi (Gambar 1).

Nilai tertinggi pertumbuhan kalus ditemukan pada kombinasi perlakuan yang berbeda.

Konsentrasi 2,4-D 1,0 mg/l dan TDZ 0,5 mg/l merupakan kombinasi perlakuan terbaik dengan persentase tumbuh kalus mencapai 94% (Data tidak ditunjukkan) dan pertumbuhan kalus tertinggi hingga 280 mm³ per kalus (Tabel 3). Namun berdasarkan jumlah tunas, 2,4-D 1,0 mg/l dengan TDZ 0,5 mg/l merupakan kombinasi terbaik dengan rerata jumlah tunas mencapai 5,3 tunas per eksplan (Tabel 4, Gambar 1), diikuti 2,4-D 0 mg/l dan TDZ 0 mg/l dengan 3,0 tunas per eksplan. Pada studi ini jumlah tunas yang terbentuk berkisar antara 1-9 tunas per eksplan.

Dari hasil penelitian terungkap bahwa pemberian ZPT memberi pengaruh signifikan



Gambar 1. Bakal tunas dan tunas yang teregenerasi pada perlakuan 2,4-D dan TDZ. (A) Bakal tunas yang teregenerasi ± 3 bulan setelah kultur inisiasi. (B) Tunas yang terbentuk ± 4 bulan setelah kultur inisiasi. Panah putih = bakal tunas, panah merah = tunas. (*Initial shoots and shoots regenerated due to 2,4-D and TDZ treatments. (A) Regenerated initial shoots ± 3 months after culture initiation. (B) Regenerated shoots ± 4 months after culture initiation. White arrows = initial shoots, red arrows = shoots*)

terhadap pembentukan, pertumbuhan dan regenerasi kalus. Pada induksi pembentukan kalus, konsentrasi ZPT yang lebih tinggi diperlukan untuk proses morfogenesis awal. Sel-sel dinding anther merupakan sel-sel yang mudah didiferensiasi menjadi kompeten dan responsif untuk diinduksi dan diregenerasi membentuk kalus (Winarto *et al.* 2009b). Setelah kultur inisiasi, sel-sel dinding anther berada pada fase tidak responsif terhadap nutrisi dan ZPT hingga ± 15 hari inkubasi. Pada tahap selanjutnya sel-sel ini mengalami diferensiasi dan responsif terhadap nutrisi dan ZPT seperti yang dinyatakan oleh Taji *et al.* (2001). Umumnya inti sel bergerak ke tengah sel dan membelah, yang kemudian diikuti dengan perubahan bentuk dan ukuran sel yang menjadi lebih kecil dan kompak. Pada tahap ini pemberian ZPT pada konsentrasi tinggi diperlukan untuk menginduksi diferensiasi dan meningkatkan kompetensi sel seperti yang juga dilaporkan oleh Nordstrom dan Eliasson (1991) pada *pea* dan Narciso *et al.* (1996) pada *Vigna radiata*. Setelah sel berubah menjadi kompeten, sel aktif membelah, pada saat ini peran ZPT menurun. Dari tahap ini teregenerasi dua jenis kelompok sel, yaitu sel meristematik dan nonmeristematik pada

kultur anther. Sel yang aktif membelah kemudian membentuk dua tipe kalus, yaitu organogenik dan nonorganogenik.

Pada pembentukan kalus, penambahan 2,4-D memiliki peran yang sangat signifikan terhadap proses pembentukan kalus, terkait dengan diferensiasi, dan peningkatan kompetensi sel. Konsentrasi ZPT yang tinggi umumnya diaplikasikan untuk mencapai tujuan tersebut. Thengane *et al.* (1994) menggunakan 2,4-D 1,0 mg/l yang dikombinasikan dengan BA 0,5 mg/l pada kultur anther bunga matahari. Konsentrasi ZPT 2,0 mg/l yang sama digunakan dalam pembentukan kalus pada kultur anther lili (Arzeta-Fernandez *et al.* 1997). Konsentrasi tersebut yang dikombinasikan dengan BAP 1,0 mg/l diaplikasikan pada kultur anther *L. usitatissimum*, sedangkan pada kultur anther *Anthurium*, aplikasi 2,4-D 0,5 mg/l yang dikombinasikan dengan TDZ 2,0 mg/l, BAP 0,75 mg/l, dan NAA 0,02 mg/l merupakan kombinasi konsentrasi ZPT yang optimal untuk stimulasi pembentukan kalus.

Konsentrasi 2,4-D 0,5 mg/l pada awal kultur diduga menjadi pendorong (*trigger*) bagi diferensiasi, dan peningkatan kompetensi sel-sel

Tabel 2. Pengaruh kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ terhadap skor bakal tunas (*Effect of 2.4-D and TDZ concentration combination on initial shoots score*)

Konsentrasi TDZ (TDZ concentration), mg/l	Skor bakal tunas (<i>Initial shoot score</i>)			
	Konsentrasi 2,4-D (2.4-D concentration), mg/l			
	0	0,5	1,0	2,0
0	+	-	++	+
0,5	-	+	++	+/++
1,0	-/+	+	+/++	+/++
2,0	+	-	+	+

– tidak ada bakal tunas yang teramati (*no initial shoots observed*), + terdapat 1-5 bakal tunas (*one to five initial shoots observed*), ++ terdapat 6-10 bakal tunas (*six to ten initial shoots observed*), +++ terdapat 11-20 bakal tunas (*eleven to twenty initial shoots observed*), dan ++++ terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan yang diamati (*more than twenty initial shoots per explant observed*)

Tabel 3. Pengaruh interaksi kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ terhadap pertumbuhan volume kalus (*Interaction effect of 2.4-D and TDZ concentration combination on callus volume growth*)

Konsentrasi TDZ (TDZ concentration) mg/l	Volume kalus (<i>Callus volume</i>), mm ³			
	Konsentrasi 2,4-D (2.4-D concentration), mg/l			
	0	0,5	1,0	2,0
0	124 a	29 b	241 a	148 ab
0,5	89 a	100 a	164 a	280 a
1,0	167 a	26 b	155 a	109 b
2,0	137 a	24 b	142 a	70 b
KK (CV), %	21,81	19,64	24,34	21,69

Tabel 4. Interaksi kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ (*Interaction of 2.4-D and TDZ combination concentration*)

Konsentrasi TDZ (TDZ concentration), mg/l	Jumlah kalus per perlakuan (<i>Number of callus per treatment</i>)			
	Konsentrasi 2,4-D (2.4-D concentration), mg/l			
	0	0,5	1,0	2,0
0	3,0 a	0,0	2,4 ab	0,9 a
0,5	0,0 b	0,0	5,3 a	2,3 a
1,0	1,0 ab	0,0	1,8 ab	1,0 a
2,0	0,0 b	0,0	0,8 b	1,6 a
KK (CV), %	21,81	-	24,34	21,69

dinding anther. Konsentrasi TDZ yang tinggi (2,0 mg/l) selain mendukung pembelahan sel yang cepat diduga juga berperan penting dalam translokasi, distribusi 2,4-D dan NAA dalam sel-sel dinding anther dan akumulasinya pada sel-sel yang memiliki totipotensi tinggi pada *Pelargonium* (Murch dan Saxena 2001). Kombinasi ZPT tersebut juga berpengaruh terhadap keberhasilan kultur anther *Anthurium*, *Pelargonium* (Murch dan Saxena 2001), pisang (Srngsam dan Kanchanapoom 2003), dan kedelai hitam (Wang *et al.* 2003). Pada tahap berikutnya 2,4-D dan NAA menginduksi terjadinya diferensiasi dan meningkatkan kompetensi sel, kemudian berubah menjadi sel-sel meristematik yang aktif membelah hingga membentuk kalus.

Pada pertumbuhan dan regenerasi kalus hingga membentuk bakal tunas dan tunas, TDZ pada konsentrasi yang tinggi tidak diperlukan lagi. Pada tahap induksi kalus penurunan konsentrasi TDZ dari 2,0 mg/l menjadi 0,5 mg/l yang dikombinasikan dengan peningkatan konsentrasi 2,4-D dari 0,5 mg/l menjadi 1,0 mg/l mampu meregenerasi tunas. Kemudian medium MWR-3 tanpa 2,4-D dan TDZ ditemukan optimal untuk meregenerasi tunas. Hasil ini membuktikan bahwa untuk pertumbuhan dan regenerasi kalus diperlukan kombinasi konsentrasi ZPT yang berbeda. Meski hasil penelitian ini belum maksimal, tetapi penurunan konsentrasi 1-2 ZPT diperlukan untuk menginduksi dan meregenerasi kalus. Kecenderungan tersebut juga banyak ditemukan pada beberapa kultur anther seperti yang dilaporkan oleh Ishizaka (1998) pada *Cyclamen*, Saji dan Sujatha (1998) pada bunga matahari, Stoehr dan Zsuffa (1990) pada *poplar*, Hofer (2004) pada apel, Germana *et al.* (2000) pada jeruk, Nichterlein *et al.* (1991) dan Nichterlein dan Friedt (1993) pada *L. usitatissimum*, Uhrig

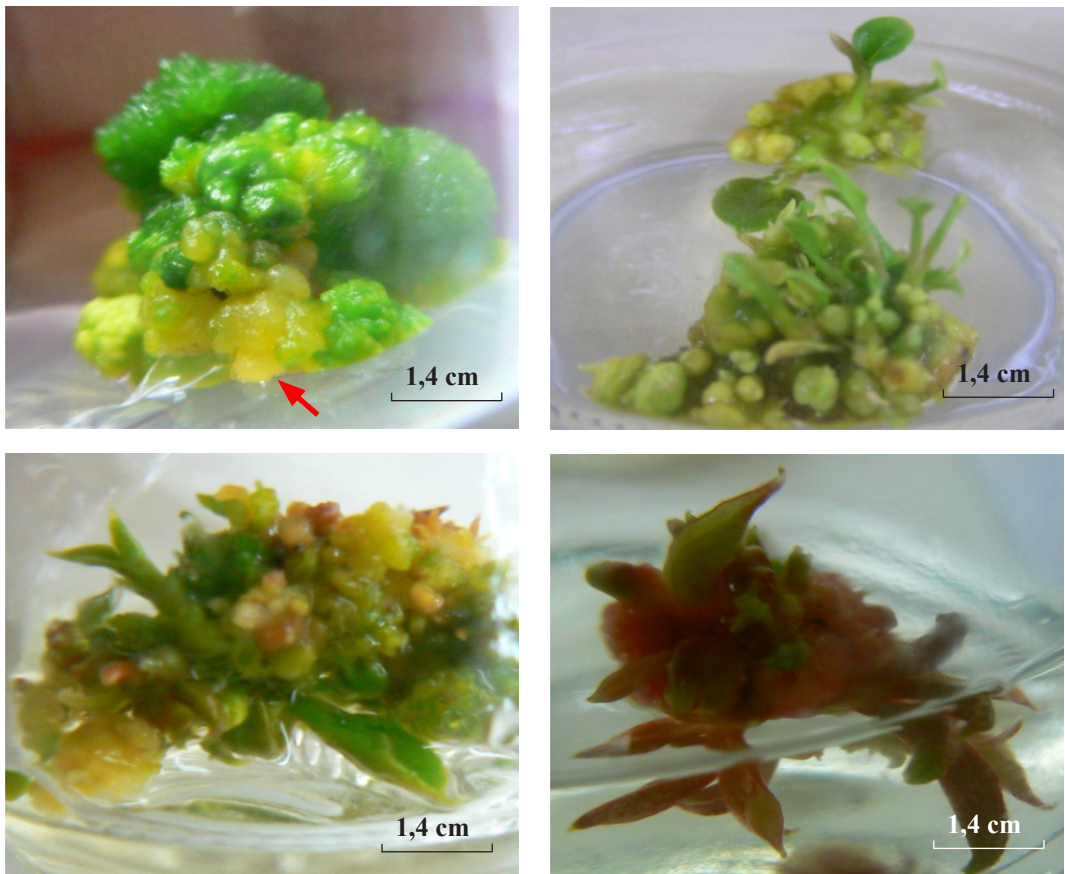
(1985) pada kentang, dan Falavigna *et al.* (1993) pada asparagus.

Konsentrasi pikloram 2 mg/l dan zeatin 2 mg/l sesuai untuk induksi kalus lili, tetapi untuk regenerasi kalus penurunan konsentrasi pikloram hingga 0,1 atau 0,5 mg/l dan BA 0,01 mg/l sangat direkomendasikan. Konsentrasi NAA 2,0 mg/l dan BA 1,0 mg/l digunakan untuk pembentukan kalus pada kultur anther bunga matahari, sedangkan untuk regenerasi kalus cukup hanya menggunakan BA 0,5 mg/l (Saji dan Sujatha 1998). Medium MS yang mengandung BA 5 µM sesuai untuk induksi kalus dan WPM yang ditambah dengan BA 1,5 µM sesuai untuk medium regenerasi pada kultur anther poplar (Stoehr dan Zsuffa 1990). Medium Tsay (1996) yang ditambah NAA 2,0 mg/l dan BA 1,0 mg/l digunakan untuk induksi, sedangkan NAA 1,0 mg/l dan BA 0,5 mg/l untuk regenerasi kalus pada kultur anther asparagus (Falavigna *et al.* 1999). Uhrig (1985) menggunakan medium Uhr85 ditambah IAA 0,1 mg/l dan BA 2,5 mg/l untuk induksi, sedangkan medium tanpa ZPT untuk regenerasi kalus asparagus. Beberapa hasil penelitian ini menguatkan hasil penelitian kultur anther *Anthurium*, bahwa untuk pembentukan dan regenerasi kalus diperlukan medium spesifik yang mengandung 2,4-D dan TDZ. Pengaruh pemberian ZPT yang sama juga ditemukan Shen *et al.* (2008) pada regenerasi tunas *Dieffenbachia*.

Pembentukan bakal tunas dan tunas pada kultur in vitro dipengaruhi oleh berbagai faktor (Shen *et al.* 2008), di antaranya ialah jenis dan intensitas cahaya yang diterima oleh eksplan (Moreira-Dias *et al.* 2000, Seabrook 2005, Sunandakumari *et al.* 2005). Cahaya merah merupakan jenis cahaya yang berpengaruh terhadap regenerasi dan pembentukan tunas (Moreira da Silva dan Debergh 1997). Pada inkubasi dibawah kondisi terang, kalus hasil regenerasi berubah warna

menjadi hijau, kehijauan, kemerahan, atau warna lain yang menjadi indikasi potensi kemampuan organogenesis sel (Widyanto *et al.* 2001, Pickens *et al.* 2005). Kalus hasil kultur anther *Anthurium* berubah dari warna putih-kuning menjadi hijau atau kemerahan (Rachmawati 2005, Gambar 2). Penurunan konsentrasi ZPT pada tahap pembentukan tunas diduga juga berkaitan dengan masih adanya pengaruh ZPT yang diserap oleh sel-sel eksplan pada tahap inisiasi seperti ditemukan pada tanaman herbaceous (Stoehr dan

Zsuffa 1990, Uhrig 1985, Meyer *et al.* 1993, Falavigna *et al.* 1999). Sementara *Anthurium* merupakan tanaman dengan respons tumbuh yang lambat, baik in vivo maupun in vitro (Rachmawati 2005), sehingga bersama dengan inkubasi pada kondisi cahaya terang penambahan ZPT untuk proses organogenesis (pembentukan tunas) tetap diperlukan pada kalus hasil kultur anther, di mana 2,4-D 1,0 mg/l, TDZ 0,5 mg/l, BAP 0,75 mg/l, dan NAA 0,02 mg/l menjadi kombinasi konsentrasi ZPT yang sesuai untuk regenerasi tunas.



Gambar 2. Variasi warna kalus organogenik hasil kultur anther *Anthurium* kultivar Tropical. Panah merah = warna asli kalus hasil tahap induksi (*Variation of organogenic callus color derived from anther culture of Anthurium c.v. Tropical. Red arrow = original callus color resulted from induction stage*)

KESIMPULAN

1. Kombinasi konsentrasi TDZ 2,4-D dan berpengaruh terhadap pembentukan dan regenerasi kalus.
2. Konsentrasi TDZ 2,4-D 0,5 mg/l dan 2,0 mg/l sesuai untuk pembentukan kalus dengan potensi tumbuh anther mencapai 58%, 38% beregenerasi, dan rerata 2,3 anther membentuk kalus per perlakuan.
3. Konsentrasi TDZ 2,4-D 1,0 mg/l dan 0,5 mg/l merupakan kombinasi terbaik untuk meregenerasi kalus menjadi tunas dan menghasilkan 5,3 tunas per eksplan.

PUSTAKA

1. Arzate-Fernandez, A.M., T. Nakzaki, H. Yamagata, and T. Tanisaka. 1997. Production of Double Haploid Plants from *Lilium longiflorum* Thunb. Anther Culture. *Plant Sci.* 123:179-187.
2. Coumans, M. and D. Zhong. 1995. Doubled Haploid Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Production by Androgenesis: Fact or Artifact? 1. In Vitro Isolated Microspore Culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 41:203-20.
3. Falavigna, A., P.E. Casali, and A. Battaglia. 1999. Achievement of Asparagus Breeding in Italy. *Acta Hort.* 479:67-74.
4. Germana, M.A., F.G. Crescimanno, and A. Motisi. 2000. Factors Affecting Androgenesis in *Citrus clementina* Hort.ex. Tan. *Adv. Hort. Sci.* 14(2):43-51.
5. Han, D.S., Y. Niimi, and M. Nakano. 1997. Regeneration of Haploid Plants from Anther Cultures of the Asiatic Irbid Lily Connecticut King. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 47:153-158.
6. Hofer M. 2004. In Vitro Androgenesis in Apple–Improvement of the Induction Phase. *Plant Cell Rep.* 22: 365–370.
7. Ishizaka, H. 1998. Production of Microspore-Derived Plants by Anther Culture of an Interspecific F1 Hybrid between *Cyclamen persicum* and *C. purpurascens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 54:21-28.
8. Laslo, V.A. and S. Vicaș. 2008. The Influence of Certain PhitoZPTs on Organogenesis Process for In Vitro Culture of Apricot (*Armeniaca vulgaris*). *Analele Universității din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului*, 13:200-205.
9. Meyer, R., F. Salamini, and H. Uhrig. 1993. Isolation and Characterization of Potato Diploid Clones Generating a High Frequency of Monohaploid of Homozygous Diploid Androgenic Plants. *Theor. Appl. Genet.* 85:905-912.
10. Moreira da Silva, M.H. and P.C. Debergh. 1997. The Effect of Light Quality on the Morphogenesis of In Vitro Cultures of *Azorina vialii* (Wats.) Feer. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 51:87-193.
11. Moreira-Dias, J.M., R. V. Molina, Y. Bordón, J. L. Guardiola, and A. García-Luis. 2000. Direct and Indirect Shoot Organogenic Pathways in Epicotyl Cuttings of Troyer Citrange Differ in ZPT Requirements and in their Response to Light. *Ann. Bot.* 85: 103-110.
12. Murch, S.J. and P.K. Saxena. 2001. Molecular Fate of Thidiazuron and Its Effects on Auxin Transport in Hypocotyls Tissues of *Pelargonium × hortorum* Bailey. *Plant Growth Regul.* 35:269-275.
13. Narciso, J.O., K. Hattori, and T. Wada. 1996. Histological Observation of Callus Formation in Mungbean (*Vigna radiata*. (L.) Wilczek) Cotyledon Culture. *Jpn. J. Crop. Sci.* 65(4):663-671.
14. Nichterlein, K., H. Umbach, and W. Friedt. 1991. Genotypic and Exogenous Factors Affecting Shoot Regeneration from Anther Callus of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) *Euphytica.* 58:157-164.
15. _____ and W. Friedt. 1993. Plant Regeneration from Isolated Microspores of Linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Rep.* 12:426-430.
16. Nordstrom, A.C. and L. Eliasson. 1991. Levels of Endogenous Indole-3-Acetic Acid and Indole-3-Acetylaspatic Acid during Adventitious Root Formation in Pea Cuttings. *Physiol. Plant.* 82:599-605.
17. Pickens, K.A., Z. M. Cheng, and R. N. Trigiano. 2005. Axillary Bud Proliferation and Organogenesis of *Euphorbia pulcherrima* Winter Rose™ In Vitro Cell. *Dev. Biol.- Plant* 41(6):770-774.
18. Rachmawati, F., B. 2005. Kultur Anther pada *Anthurium* (*Anthurium andraeanum* Linden ex André). Thesis. Departemen Agronomi dan Hortikultura. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. 146 Hlm.
19. Saji, K.V. and M. Sujatha. 1998. Embryogenesis and Plant Regeneration in Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Euphytica.* 103:1-7.
20. Seabrook, J.E.A. 2005. Light Effects on the Growth and Morphogenesis of Potato (*Solanum tuberosum*) In Vitro: A Review. *Am. J. Potato Res.* 22 pages.
21. Shen, X., M.E. Kane, and J. Chen. 2008. Effects of Genotype, Explant Source, and Plant Growth Regulators on Indirect Shoot Organogenesis in Dieffenbachia Cultivars. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 44:282-288.
22. Srangsam, A. and K. Kanchanapoom. 2003. Thidiazuron Induced Plant Regeneration in Callus Culture of Triploid Banana (*Musa* sp.) Gros Michel, AAA Group. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 25(6):689-696.
23. Stoehr, M.U. and L. Zsuffa. 1990. Induction of Haploids in *Populus Maximowiczii* via Embryogenic Callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 23(1):49-58.
24. Sunandakumari, C., C. Zhang, K.P. Martin, A. Slater, and P.V. Madhusoodanan. 2005. Effect of Auxins on Indirect In Vitro Morphogenesis and Expression of *Gus a* Transgene in a Lectinaceous Medicinal Plant, *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41(5):695-699.
25. Taji, A., P.P. Kumar, and P. Lakshmanan. 2001. *In Vitro Plant Breeding*. Howarth Press Inc. UK. 167 p.

26. Thengane, S.R., M.S. Joshi, S.S. Khuspe, and A. E Mascarenhas. 1994. Anther Culture in *Helianthus annuus* L. Influence of Genotype and Culture Conditions on Embryo Induction and Plant Regeneration. *Plant Cell Rep.* 13:222-226.
27. Tsay, H.S. 1996. Haploidy in Asparagus Anther Culture. In: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Jain, S.M., S.K. Sopory and R.E. Veilleux (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp:109-134.
28. Uhrig, H. 1985. Genetic Selection and Liquid Medium Conditions Improve the Yield of Androgenetic Plants from Diploid Potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 71:455-460.
29. Wang, R.C., S.Y. Hsieh, and M. Yeh, 2003. Studies on the Anther Culture of Black Soybean and Vegetable Soybean. Tainan District Agricultural Improvement Station, *Res. Bull.* 41:35-43.
30. Widiyanto, S.N., D. Erytrina, and H. Rahmania. 2001. Adventitious Shoot Formation on Teak (*Tectona grandis* L.F.) Callus Cultures Derived from Internodal Segments. ISHS Acta Horticulturae 692: [II International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species](http://www.actahort.org/books/692/692_20.htm). www.actahort.org/books/692/692_20.htm. [27 May 2009].
31. Winarto, B., F. Rachmawati, N.A. Mattjik, A. Purwito, dan B. Marwoto. 2009a. Pengembangan Formulasi Medium Dasar untuk Kultur Anther *Anthurium*. (Belum dipublikasikan).
32. _____. 2009b. Improvement of Selected Induction Culture Media on Callus Induction in Anther Culture of *Anthurium* and a Histological Study on Its Callus Formation. Submitted to Journal Natur Indonesia, Faculty of Agriculture, Riau University. (Not published yet).
33. _____. F. Rachmawati, dan D. Pramanik. 2009c. Pengaruh Cara Isolasi, Jenis dan Konsentrasi Agar terhadap Induksi Pembentukan Kalus pada Kultur Anther *Anthurium*. (Belum dipublikasikan).