




**KARAKTERISASI TETUA PERSILANGAN ANGGREK GENUS  
*Dendrobium* DAN IDENTIFIKASI PLANLET ANGGREK  
HASIL PERSILANGAN SECARA MOLEKULER  
SEBAGAI PENDUGAAN PEWARISAN SIFAT**


Acc   
BPA 21/1/20

TESIS

Acc 

Oleh:

**Aldy Bahaduri Indraloka  
NIM. 171520101003**

Acc   
23/01/2020

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**



**KARAKTERISASI TETUA PERSILANGAN ANGGREK GENUS  
*Dendrobium* DAN IDENTIFIKASI PLANLET ANGGREK  
HASIL PERSILANGAN SECARA MOLEKULER  
SEBAGAI PENDUGAAN PEWARISAN SIFAT**

**TESIS**

**Oleh:**

**Aldy Bahaduri Indraloka  
NIM. 171520101003**

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**



**KARAKTERISASI TETUA PERSILANGAN ANGGREK GENUS  
*Dendrobium* DAN IDENTIFIKASI PLANLET ANGGREK  
HASIL PERSILANGAN SECARA MOLEKULER  
SEBAGAI PENDUGAAN PEWARISAN SIFAT**

**TESIS**

Diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan Program  
Magister Pertanian (S2) pada Program Studi Magister Agronomi  
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh

**Aldy Bahaduri Indraloka**  
**NIM. 171520101003**

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**

## PERSEMBAHAN

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, tesis ini saya persembahkan untuk:

1. Mama Ami Amalia, Papa Solihin, adikku Dwi Smaradahana Indraloka, terimakasih atas motivasi, dukungan dan doa yang selalu mengiringi langkah saya dalam menimba ilmu serta perhatian dan kasih sayang yang telah diberikan;
2. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan dorongan dan dukungan dalam setiap kegiatan;
3. Seluruh guru dan dosen yang telah mendidik dan memberikan ilmunya, terima kasih yang tidak terhingga;
4. Seluruh teman-teman Magister Agronomi;
5. Almamater Program Studi Magister Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

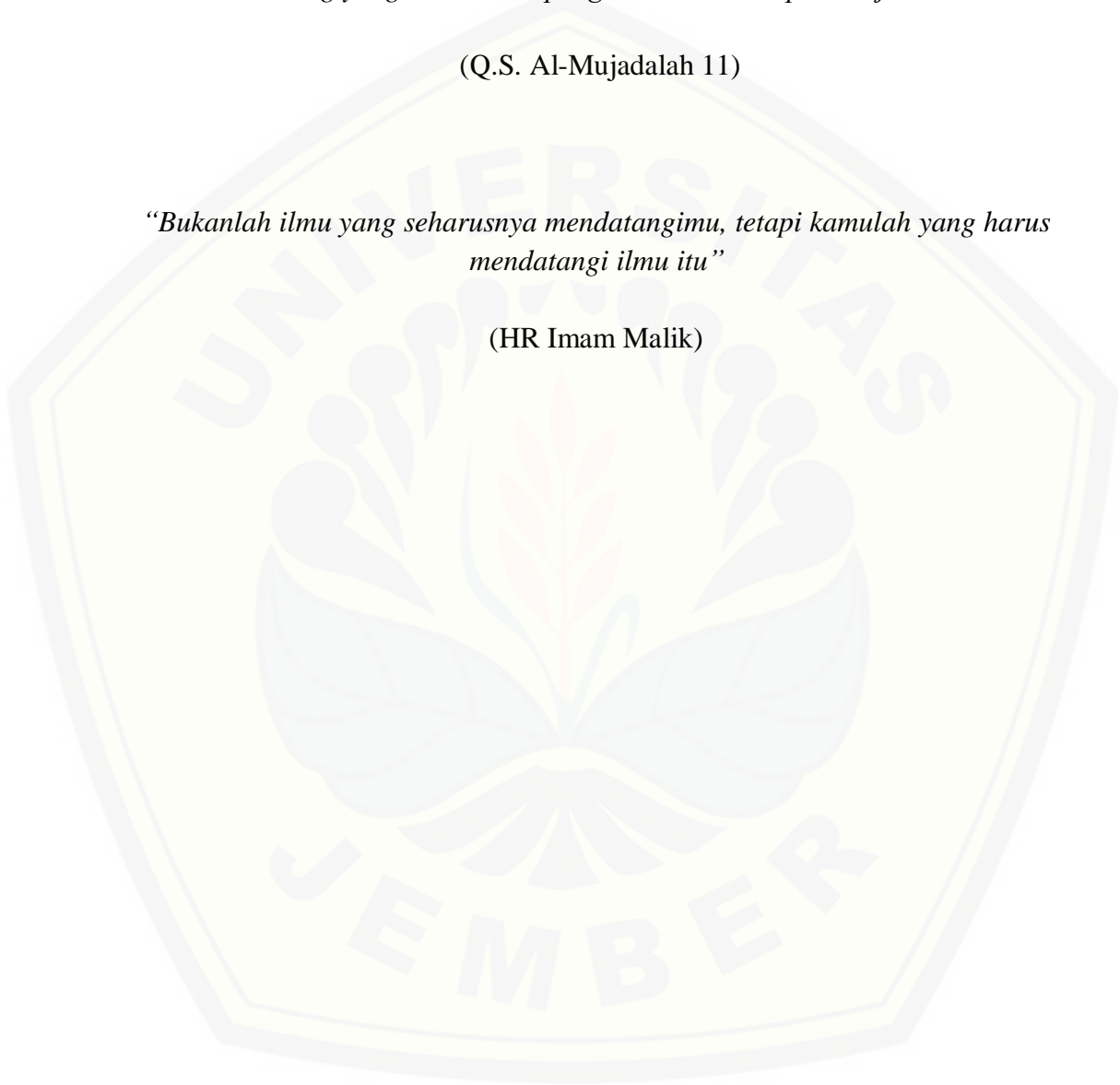
**MOTTO**

*“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”*

(Q.S. Al-Mujadalah 11)

*“Bukanlah ilmu yang seharusnya mendatangimu, tetapi kamulah yang harus mendatangi ilmu itu”*

(HR Imam Malik)



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Aldy Bahaduri Indraloka

NIM : 171520101003

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: **“Karakterisasi Tetua Persilangan Anggrek Genus *Dendrobium* dan Identifikasi Planlet Anggrek Hasil Persilangan secara Molekuler sebagai Pendugaan Pewarisan Sifat”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakkan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Januari 2020

Yang menyatakan

Aldy Bahaduri Indraloka

NIM. 171520101003

**TESIS**

**KARAKTERISASI TETUA PERSILANGAN ANGGREK GENUS  
*Dendrobium* DAN IDENTIFIKASI PLANLET ANGGREK  
HASIL PERSILANGAN SECARA MOLEKULER  
SEBAGAI PENDUGAAN PEWARISAN SIFAT**

Oleh

**Aldy Bahaduri Indraloka  
NIM. 171520101003**

**Pembimbing:**

Pembimbing Utama : Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P.  
NIP. 196504251990022002

Pembimbing Anggota : Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., Ph.D.  
NIP. 196504261994031001

**PENGESAHAN**

Tesis berjudul “**Karakterisasi Tetua Persilangan Anggrek Genus *Dendrobium* dan Identifikasi Planlet Anggrek Hasil Persilangan secara Molekuler sebagai Pendugaan Pewarisan Sifat**” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Jumat

Tanggal : 10 Januari 2020

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

**Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P.**

NIP. 196504251990022002

**Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., Ph.D.**

NIP. 196504261994031001

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota,

**Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, M.S.**

NIP. 196003171983032001

**Dr. Ir. Sholeh Avivi, M.Si.**

NIP. 196907212000121002

Mengesahkan

Dekan,

**Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D.**

NIP. 196005061987021001



## RINGKASAN

**“Karakterisasi Tetua Persilangan Anggrek Genus *Dendrobium* dan Identifikasi Planlet Anggrek Hasil Persilangan secara Molekuler sebagai Pendugaan Pewarisan Sifat”**; Aldy Bahaduri Indraloka; 171520101003; 2020; 87 halaman; Program Studi Magister Agronomi; Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Pemuliaan tanaman anggrek meliputi koleksi tetua persilangan, proses karakterisasi, persilangan antar tetua, perkecambahan biji, pembentukan protokorm, regenerasi planlet dan aklimatisasi planlet. Banyak sekali aspek yang harus dipelajari dan diperhatikan oleh pemulia tanaman anggrek, terutama proses fisiologi dan identifikasi molekuler tanaman. Anggrek spesies memiliki sumber genetik yang tinggi untuk perbaikan dan peningkatan mutu genetik, tetapi berbagai permasalahan pada kesalahan prosedur persilangan, kendala dalam teknik perbanyakan serta eksploitasi anggrek spesies membuat pemanfaatan anggrek spesies sebagai tetua persilangan masih rendah dan belum maksimal. Selain itu, kegiatan pemuliaan tanaman anggrek sering kali meninggalkan proses pencatatan sumber benih berupa *pollen parent* dan *seed parent*. Sumber benih merupakan syarat wajib bagi pemulia tanaman anggrek yang akan mendaftarkan anggrek hibrida pada *Royal Horticultural Society*, UK. Oleh karena itu dilakukan penelitian pemuliaan tanaman anggrek yang meliputi analisis kluster hubungan kekerabatan, identifikasi karakter (karaktersiasi) morfologi secara lengkap, perbaikan mutu genetik dan peningkatan potensi tanaman anggrek melalui persilangan interspesifik dan resiprokal, identifikasi *maternal inheritance* secara molekuler untuk mengetahui pewarisan sifat pada planlet anggrek hasil persilangan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dendrogram analisis kluster menghasilkan 4 kelompok dengan tetua persilangan terpilih yaitu *D. lasianthera* dan *D. antennatum* berada pada kelompok yang berbeda. Hasil karakterisasi menunjukkan seluruh parameter kuantitatif antar tetua berbeda dan terdapat perbedaan pada parameter kualitatif yang didominasi oleh karakter bunga dan daun. Percobaan persilangan menunjukkan keberhasilan persilangan interspesifik pada *D. lasianthera* (♂) X *D. antennatum* (♀) dan terdapat kegagalan pada persilangan resiprokal. Kegagalan dalam persilangan resiprokal dipengaruhi oleh fisiologi ovarium dan ukuran pollen. Hasil persilangan interspesifik telah menghasilkan planlet yang diharapkan dapat memperbaiki dan meningkatkan mutu genetik pada anggrek hibrida yang terbentuk. Hasil identifikasi *maternal inheritance* dengan menggunakan primer CD yang di desain pada bagian trnL intron cpDNA menunjukkan bahwa pewarisan DNA kloroplas bersifat *maternal* dan tidak ada transmisi kloroplas yang berasal dari pollen atau gamet jantan. Sementara identifikasi pewarisan sifat pada planlet anggrek hibrida dapat terlihat pada parameter bentuk daun dan ujung daun. Bentuk daun dan ujung daun anggrek hibrida mengikuti bentuk daun dan ujung daun dari tetua betina.

## SUMMARY

**“Characterization of Crossbred Elders on Genus *Dendrobium* Orchids and Molecular Identification on the Orchids Planlet as an Estimation of Inheritance”**; Aldy Bahaduri Indraloka; 171520101003; 2020; 87 pages; Master of Agronomy Study Program; Faculty of Agriculture, University of Jember.

Plant breeding program of orchids includes the collection of crossbreeding elders, characterization, crossbreeding activity, seed germination, protocorm formation, plantlet regeneration and acclimatization. There are so many aspects that must be studied and considered by orchid breeders, especially the physiological and molecular identification of orchid. Native orchids (species) having potential genetic sources for refinement and improvement of genetic quality, but various problems in crossing errors, obstacles in propagation techniques and exploitation of species affected in application as crossbreed elders were low and weren't optimal. In addition, orchid breeding activities often miss-recording of seed sources in the form of pollen parent and seed parent. Seed sources are a mandatory requirement for orchid breeders who will register a hybrid orchid to Royal Horticultural Society, UK. Orchid breeding in this research includes cluster analysis for orchid relationships, complete identification of morphological characters (characterization), genetic quality improvement through interspecific and reciprocal crossing, identification of maternal inheritance in molecular technique for determining inheritance in orchid plantlet.

The results showed that the dendrogram produced 4 cluster (group) with selected crossbreed elders, *D. lasianthera* and *D. antennatum* in different groups. The characterization results show that all quantitative parameters are different between the elders and there are differences in the qualitative parameters that were dominated by flower and leaf characters. Crossing experiments show the success of interspecific crossing between *D. lasianthera* (♂) X *D. antennatum* (♀) and failure in reciprocal crossing. Failure in reciprocal crossing is influenced by ovarium physiology and pollen size. The results of interspecific crosses have produced plantlets that are expected to improve and enhance the genetic quality of the hybrid. The results of maternal inheritance identification using primers CD that were designed on the cpDNA, trnL intron region showed that the inheritance of chloroplast DNA is maternal and there is no transmission of chloroplast derived from male pollen or gametes. Inheritance identification on hybrid orchid plantlets can be seen in the parameters of leaf shape and leaf tips. The shape of leaves and leaf tips of hybrid orchid similar to the shape of leaves and leaf tips of female elders.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat ALLAH SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Karakterisasi Tetua Persilangan Angrek Genus *Dendrobium* dan Identifikasi Planlet Angrek Hasil Persilangan secara Molekuler sebagai Pendugaan Pewarisan Sifat”**. Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penyusunan tesis ini, yaitu:

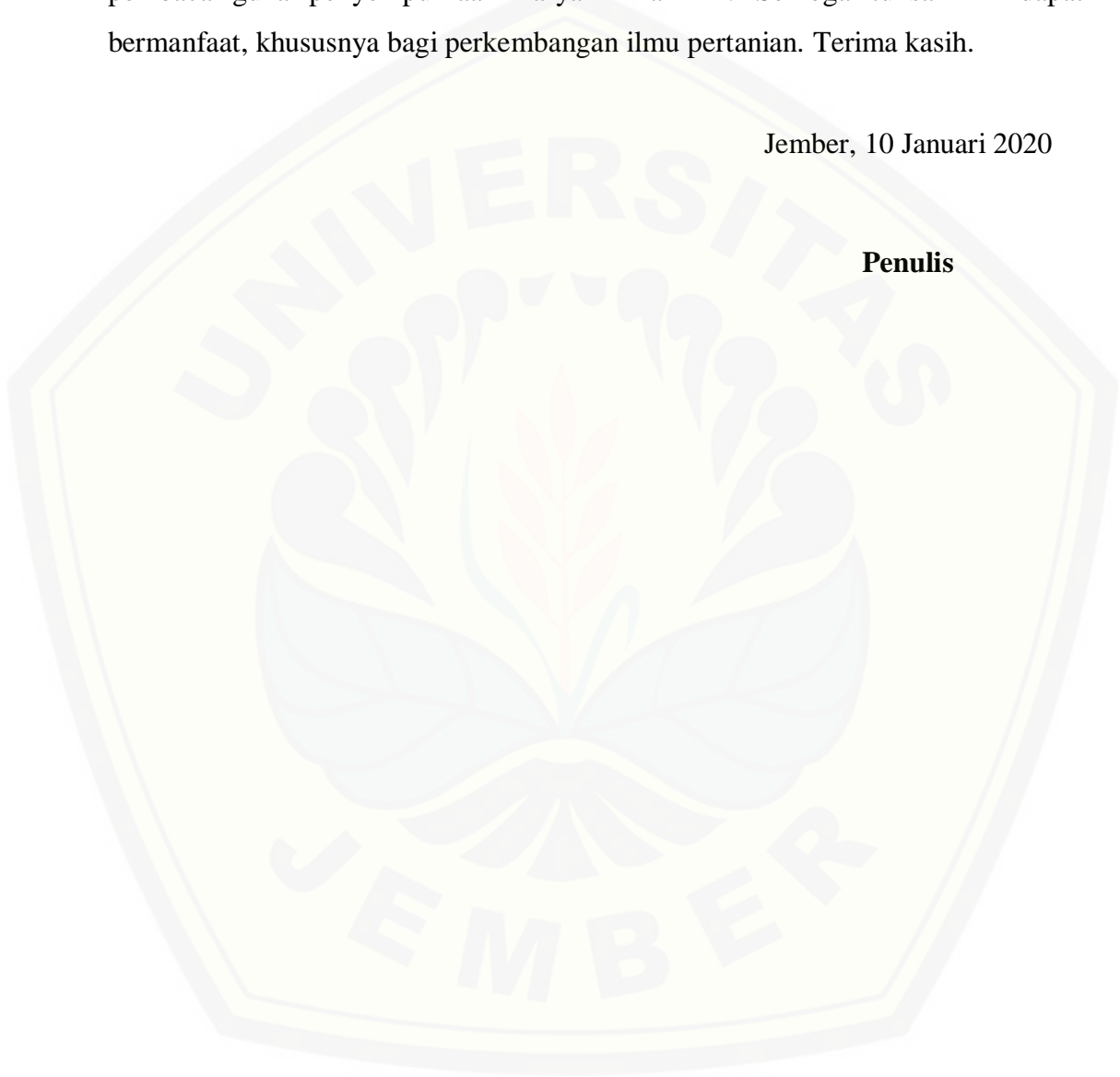
1. Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
2. Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, M.S. selaku Ketua Program Studi Magister Agronomi dan juga Dosen Pembimbing Akademik.
3. Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P. dan Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan arahan dan motivasi dalam penyusunan karya tulis ini.
4. Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, M.S. dan Dr. Ir. Sholeh Avivi, M.Si. selaku Dosen Penguji Utama dan Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan evaluasi dan masukan demi kesempurnaan karya tulis ini.
5. Seluruh Dosen Fakultas Pertanian Universitas Jember yang telah senantiasa berbagi ilmu dan memberi semangat kepada penulis untuk menyelesaikan penulisan tesis ini.
6. Kedua orang tuaku yang selalu memberikan dukungan dan doa demi kelancaran penyusunan karya tulis ini.
7. Adikku Dwi Smaradahana Indraloka dan juga seluruh teman-teman Magister Agronomi yang selalu memberi masukan.
8. Keluarga besar UPT Agrotechnopark Universitas Jember yang telah banyak membantu, memberikan waktu dan dukungan
9. Keluarga besar CDAST Universitas Jember yang telah banyak membantu, memberikan waktu, dukungan serta tambahan ilmu yang bermanfaat.

10. Semua pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu dan memberi semangat serta doa kepada penulis

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca guna penyempurnaan karya ilmiah ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat, khususnya bagi perkembangan ilmu pertanian. Terima kasih.

Jember, 10 Januari 2020

**Penulis**



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN SAMPUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
HALAMAN PEMBIMBING .....	vi
HALAMAN PENGESAHAN .....	vii
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	ix
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah.....	3
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.4 Manfaat .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Klasifikasi <i>Dendrobium</i> .....	5
2.2 Pemuliaan Tanaman Anggrek .....	5
2.3 Perbanyak Anggrek Secara <i>in vitro</i> .....	7
2.4 Media Kultur <i>in vitro</i> .....	8
2.5 Protokorm dan PLB .....	10
2.6 Penanda Molekuler Pada Tanaman .....	11
2.7 Hipotesis .....	12

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>13</b>
3.1 Tempat dan Waktu .....	13
3.2 Bahan dan Alat .....	13
3.3 Rancangan Percobaan.....	13
3.4 Pelaksanaan Percobaan.....	16
3.5 Variabel Pengamatan.....	20
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>24</b>
4.1 Kondisi Umum Percobaan .....	24
4.2 Analisis Klaster .....	24
4.3 Karakterisasi Tetua Persilangan .....	26
4.4 Percobaan Persilangan .....	30
4.5 Karakter Morfologi Biji dan Protokorm Anggrek .....	33
4.6 Identifikasi Pewarisan Sifat Secara Molekuler .....	40
4.7 Aklimatisasi Planlet .....	41
4.8 Pembahasan .....	44
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>59</b>
5.1 Kesimpulan .....	59
5.2 Saran .....	59
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>60</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>71</b>

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
2.1	Skema siklus sel dan kontrol dari hormon tanaman .....	10
3.1	Bagan alur penelitian .....	15
3.2	RAL media pembesaran protokorm.....	17
4.1	Dendrogram hubungan kekerabatan tetua persilangan dengan nilai IS 85% .....	25
4.2	Habitus tetua persilangan .....	28
4.3	Morfologi bunga .....	29
4.4	Morfologi daun .....	30
4.5	Persilangan interspesifik dan resiprokal tetua persilangan .....	31
4.6	Morfologi buah anggrek hibrida hasil persilangan.....	32
4.7	Morfologi pollen anggrek.....	33
4.8	Morfologi biji anggrek A) biji <i>viable</i> B) biji <i>non-viable</i> .....	34
4.9	Tahapan perkembangan protokorm <i>Dendrobium</i> hibrid.....	35
4.10	Tahapan perkembangan awal anggrek hibrida dalam botol kultur .....	36
4.11	Pembentukan primordia daun pada protokorm anggrek .....	37
4.12	Perbedaan morfologi protokorm.....	38
4.13	Diagram rerata berat basah dan berat kering 100 protokorm.....	38
4.14	Morfologi protokorm <i>D.</i> hibrida yang ditanam pada media kultur .....	39
4.15	(1) Morfologi planlet. A) <i>D. lasianthera</i> , B) <i>D. antennatum</i> , C) <i>D.</i> hibrida. (2) Bentuk daun dan ujung daun. A) <i>D. lasianthera</i> , B) <i>D. antennatum</i> , C) <i>D.</i> hibrida .....	40
4.16	Elektroforesis hasil PCR dengan template DNA genom anggrek.....	41
4.17	Botol kultur regenerasi dengan planlet yang telah siap aklimatisasi.....	42

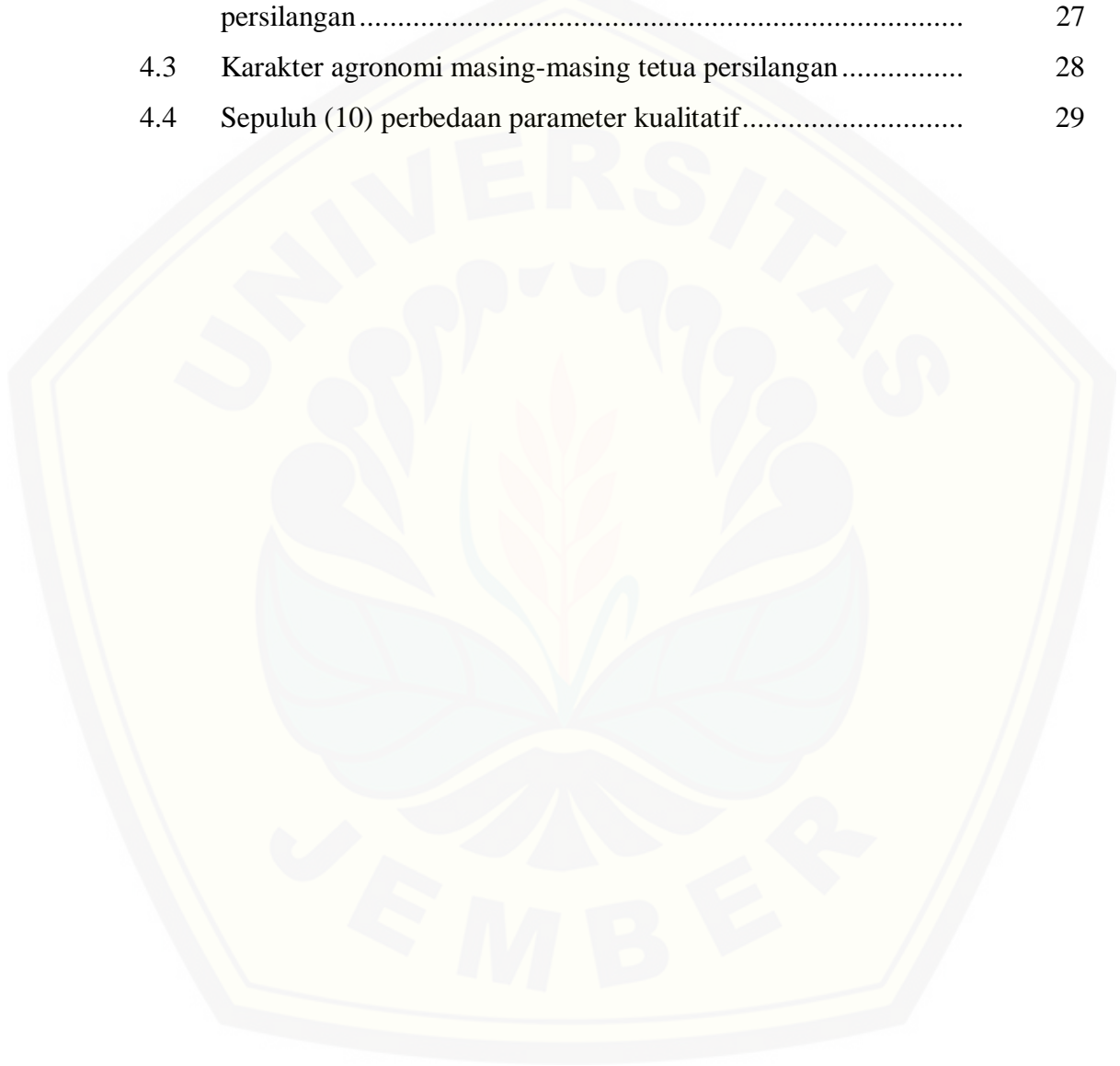
4.18	Rerata kuantitatif planlet hasil aklimatisasi.....	42
4.19	Morfologi planlet yang berasal dari A) Eksplan media cair, B) Eksplan media padat .....	43
4.20	Morfologi PLB pada planlet dengan sumber eksplan media cair.....	44





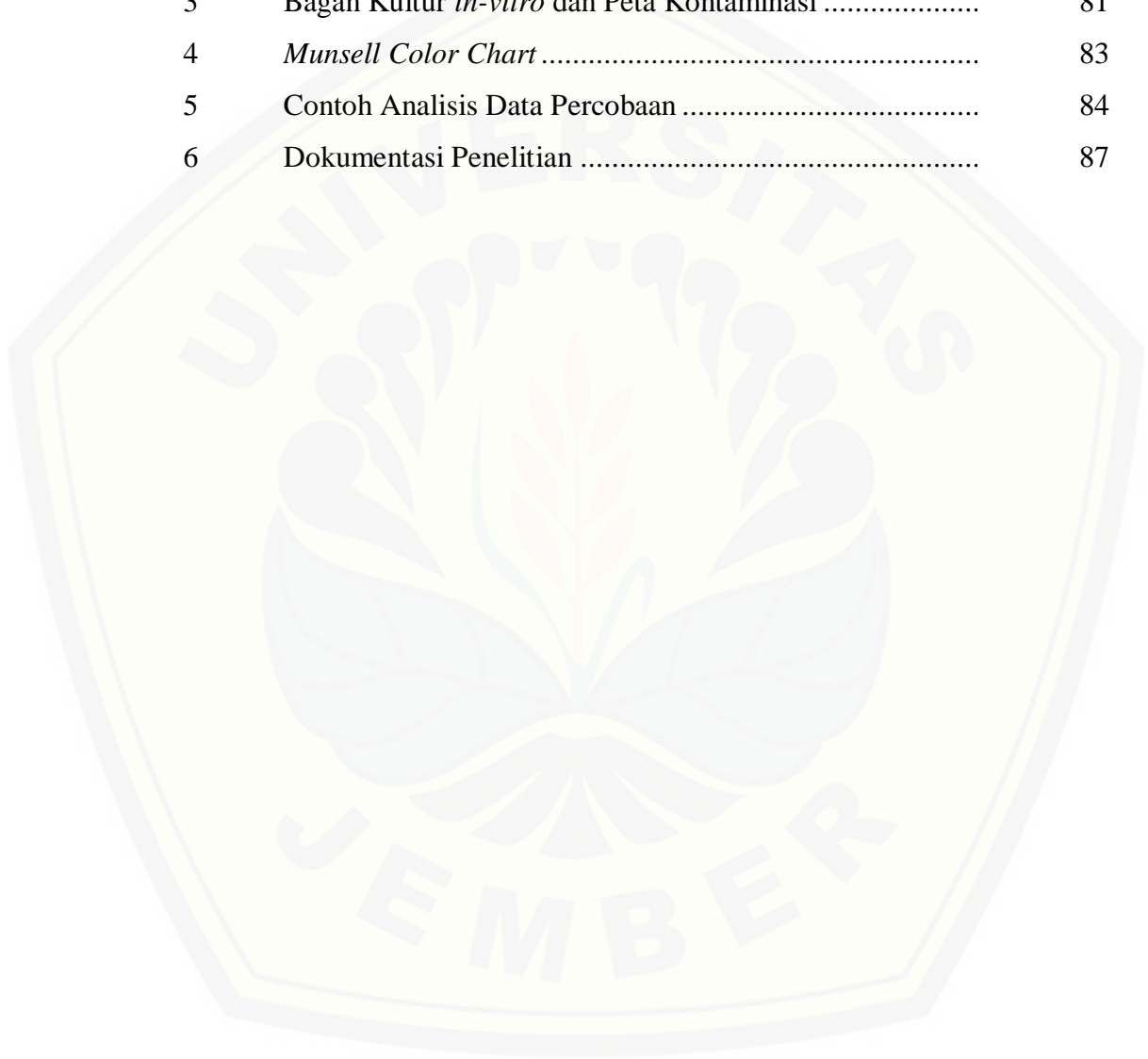
**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
4.1	Matriks similaritas tetua persilangan.....	25
4.2	Nilai rerata parameter kuantitatif masing-masing tetua persilangan.....	27
4.3	Karakter agronomi masing-masing tetua persilangan.....	28
4.4	Sepuluh (10) perbedaan parameter kualitatif.....	29



**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Tabel Skoring UPOV .....	71
2	Karakterisasi <i>D. antennatum</i> dan <i>D. lasianthera</i> .....	75
3	Bagan Kultur <i>in-vitro</i> dan Peta Kontaminasi .....	81
4	<i>Munsell Color Chart</i> .....	83
5	Contoh Analisis Data Percobaan .....	84
6	Dokumentasi Penelitian .....	87



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Negara Indonesia memiliki keanekaragaman anggrek yang cukup tinggi, diperkirakan jumlahnya  $\pm$  5.000 spesies yang hidup sebagai tumbuhan terestrial dan epifit, beberapa diantaranya mempunyai nilai ekonomi yang tinggi (Sugiyarto dan Umniyatie, 2016). Keanekaragaman anggrek membuat tanaman ini memiliki potensi untuk terus dikembangkan guna meningkatkan nilai ekonomi karena permintaan yang semakin meningkat. Rencana Strategis Kementerian Pertanian tahun 2015-2019 menargetkan produksi anggrek di provinsi Jawa Timur tahun 2018 sebanyak 3.794.684 tangkai dan pada tahun 2019 meningkat menjadi 3.994.354 tangkai. Produksi bunga anggrek di Indonesia pada tahun 2018 sebesar 26.624.216 tangkai, target produksi bunga anggrek untuk tahun 2019 di Indonesia meningkat menjadi 28.025.136 tangkai (Kementan RI, 2014).

*Dendrobium* merupakan salah satu anggrek yang paling banyak diterima baik dalam bentuk bunga anggrek potong maupun pot, pasar anggrek potong di Indonesia didominasi oleh genus *Dendrobium*. Anggrek yang memukau ini dikenal karena memiliki berbagai macam warna, ukuran dan bentuk. *Dendrobium* juga dikenal sebagai anggrek abadi karena mampu menghasilkan bunga sepanjang tahun dan tidak dipengaruhi oleh musim (Sarmah *et al.*, 2017). Anggrek-anggrek spesies atau anggrek alam memegang peranan sangat penting dalam mendapatkan hasil persilangan yang baik, hibrida yang terbentuk memiliki mutu yang lebih baik dari induknya (Balai Penelitian Tanaman Hias, 2015).

Kegiatan eksploitasi anggrek alam yang tinggi dapat menyebabkan keberadaan anggrek alam menjadi terancam. Eksploitasi tanpa pembudidayaan menyebabkan perununan potensi anggrek alam sebagai tetua persilangan. Selain itu, pengetahuan mengenai sifat-sifat penurunan karakter anggrek alam masih sedikit diulas dan diketahui sehingga pemanfaatan anggrek spesies sebagai induk persilangan belum maksimal (Balai Penelitian Tanaman Hias, 2015). Peningkatan mutu pada tanaman anggrek juga terkendala pada teknik persilangan dan perbanyakan biji hasil persilangan (Hartati dkk, 2014). Fertilitas dan

kompatibilitas anggrek spesies asal Indonesia masih belum banyak diketahui, sehingga informasi dalam kegiatan persilangan menjadi sangat penting untuk dikuasai (Lestari dkk., 2017). Kegiatan persilangan banyak menggunakan varietas-varietas dengan tetua yang sama sehingga menyebabkan variasi genetik pada hibrida yang terbentuk menjadi terbatas (Marwoto dkk., 2012), persilangan dengan menggunakan anggrek hibrida juga memiliki kelemahan dimana silsilah tetua persilangan biasanya sulit untuk dilacak dan diperoleh, kegiatan persilangan juga banyak melupakan penelusuran informasi tetua persilangan, sehingga identitas karakter anggrek hasil persilangan menjadi tidak jelas. Proses budidaya yang kurang efisien dan penanganan tanaman anggrek yang kurang baik juga dapat menghambat kegiatan produksi anggrek (Zulkhaidah dkk., 2010).

Adanya kegiatan pemuliaan tanaman anggrek diupayakan dapat mengatasi berbagai permasalahan yang ada. Pemuliaan tanaman anggrek dilakukan untuk perbaikan genetik dengan memperluas keragaman genetik pada bentuk dan warna bunga (Dwiatmini, 2013) serta peningkatan potensi tanaman dengan melakukan persilangan antar spesies untuk membentuk kultivar baru (Lestari dkk., 2017). Upaya perbaikan mutu genetik dan peningkatan potensi anggrek dalam penelitian ini dilakukan melalui percobaan persilangan antara dua anggrek spesies genus *Dendrobium* melalui persilangan interspesifik dan resiprokal. *Dendrobium* seksi spatulata memiliki keunggulan bentuk perhiasan bunga yang khas dan unik yaitu terpilinnya bagian petal, anggrek ini memiliki sumber genetik yang potensial untuk dikembangkan. Karakter unik berupa petal terpilin adalah karakter yang diharapkan muncul sebagai hasil dari percobaan persilangan.

Kegiatan pemuliaan tanaman anggrek juga dilakukan dengan modal pengetahuan terkait sifat dan silsilah indukan (tetua) persilangan serta pola pewarisan sifat, sehingga peneliti dapat memperkirakan anakan yang didapat (Balai Penelitian Tanaman Hias, 2015). Penelitian pendugaan dan identifikasi pewarisan sifat dengan menggunakan marka molekuler cpDNA untuk mengetahui pola pewarisan sifat dapat dilakukan pada anggrek hasil persilangan. DNA kloroplas (cpDNA) dan DNA mitokondria (mtDNA) adalah marka molekuler dari studi keragaman, klasifikasi genetik dan kekerabatan karena pola pewarisan tetua

betina (*maternal inheritance*) (Peyachoknagul *et al.*, 2014). *Maternal inheritance* mewariskan sifat dan karakter dari sitoplasma, sehingga diperlukan pengujian tingkat molekuler pada planlet anggrek hasil persilangan.

Pemuliaan tanaman anggrek berkaitan erat dengan penggunaan teknologi untuk memperbanyak anggrek melalui kultur jaringan tanaman (kultur *in-vitro*). Teknologi ini efektif dalam menghasilkan jumlah tanaman yang banyak dan dalam waktu yang cukup singkat (Widiastoety dkk., 2010). Penggunaan media dasar untuk kultur biji anggrek berbeda-beda karena disesuaikan dengan kebutuhan nutrisi tiap spesies. Media kultur anggrek banyak dikombinasikan dengan penambahan sumber gula, senyawa organik, zat pengatur tumbuh dan vitamin. Keberhasilan kultur *in-vitro* juga dipengaruhi oleh jenis media kultur (Serliana dkk., 2017). Persiapan media yang efisien untuk pemenuhan kebutuhan jaringan eksplan adalah hal penting dalam penelitian kultur *in-vitro* (Shekarriz *et al.*, 2017). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini menggunakan media VW cair disertai penambahan senyawa organik berupa air kelapa untuk memacu pembesaran dan memperbanyak protokorm anggrek hasil persilangan.

## 1.2 Perumusan Masalah

Anggrek *Dendrobium* memiliki potensi yang tinggi sebagai tetua persilangan guna memenuhi kebutuhan pasar anggrek. Keanekaragaman anggrek *Dendrobium* di Indonesia sebagai sumber plasma nutfah sangat tinggi. Anggrek spesies memiliki sumber genetik yang baik untuk perbaikan dan peningkatan mutu genetik, tetapi berbagai permasalahan pada kesalahan prosedur serta teknik persilangan, kendala dalam teknik memperbanyak serta eksploitasi anggrek spesies tanpa pembudidayaan membuat pemanfaatan anggrek spesies sebagai tetua persilangan masih rendah dan belum maksimal. Oleh karena itu diperlukan rangkaian penelitian pemuliaan tanaman anggrek yang meliputi: 1) Analisis hubungan kekerabatan antar spesies; 2) Identifikasi karakter (karakterisasi) morfologi tetua persilangan secara lengkap; 3) Perbaikan mutu genetik dan peningkatan potensi tanaman anggrek melalui persilangan interspesifik dan resiprokal; 4) Teknik kultur *in-vitro* yang meliputi tebar biji, pembesaran

protokorm dan regenerasi planlet; 5) Identifikasi *maternal inheritance* secara molekuler untuk mengetahui pewarisan sifat pada planlet anggrek hasil persilangan; dan 6) aklimatisasi planlet. Penggunaan teknologi kultur *in-vitro* pada kegiatan pemuliaan tanaman anggrek diharapkan dapat menjadi mengatasi keterbatasan pengetahuan teknik perbanyakan dan teknik pemuliaan non-konvensional anggrek di masyarakat.

### 1.3 Tujuan

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk:

1. Mendapatkan karakter morfologi dan agronomi tetua persilangan yang dapat digunakan untuk menilai potensi indukan serta sebagai informasi ilmiah untuk kepentingan pemuliaan, pembudidayaan dan produksi tanaman anggrek.
2. Melakukan percobaan persilangan secara interspesifik dan resiprokal untuk mengetahui fertilitas serta kompatibilitas masing-masing tetua persilangan dan sebagai upaya perbaikan mutu genetik serta peningkatan potensi tanaman anggrek.
3. Melakukan identifikasi *maternal inheritance* pada planlet anggrek hasil persilangan dengan menggunakan marka molekuler DNA kloroplas sebagai upaya identifikasi awal pewarisan sifat untuk kepentingan pemuliaan tanaman.

### 1.4 Manfaat

Penelitian ini dapat memberikan manfaat:

1. Informasi ilmiah untuk menjadi wawasan kepada masyarakat terutama kepada para pembudidaya dan pemulia tanaman anggrek terkait karakter morfologi dan karakter agronomi anggrek genus *Dendrobium*.
2. Informasi ilmiah untuk menjadi referensi dalam pengembangan ilmu yang berkaitan dengan penggunaan anggrek spesies sebagai tetua persilangan dan teknik persilangan untuk memperbaiki mutu genetik dan meningkatkan potensi tanaman anggrek.
3. Identifikasi *maternal inheritance* dengan menggunakan marka molekuler DNA kloroplas dapat menjadi tambahan informasi ilmiah dalam identifikasi awal pewarisan sifat untuk kepentingan pemuliaan tanaman.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Klasifikasi *Dendrobium*

Menurut Marshall and Beehler (2006), klasifikasi anggrek *Dendrobium* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermathophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Ordo	: Orchidales
Famili	: Orchidaceae
Subfamili	: Epidendroideaceae
Suku	: Epidendreae dendrobieae
Subsuku	: Dendrobiinae
Genus	: <i>Dendrobium</i>

Para ahli botani mengelompokkan genus *Dendrobium* dalam beberapa seksi. Beberapa seksi yang terkenal adalah seksi *Ceratobium* dan *Phalaenanthe*. Para peneliti pada umumnya menggunakan anggrek *Dendrobium* dari seksi *Ceratobium* (*Spatulata*) serta *Phalaenanthe* sebagai indukan untuk mendapatkan tanaman anggrek dalam bentuk pot dan bunga anggrek potong (Widiastoety dkk., 2010). Seksi *spatulata* merupakan anggrek yang memiliki tingkat keanekaragaman yang tinggi dari segi bentuk dan warna bunga. Anggrek ini memiliki bentuk tanduk dan keriting yang banyak digemari oleh konsumen. Selain itu anggrek seksi *spatulata* memiliki ciri khas berupa petal yang terpilin dan merupakan sumber genetik yang potensial untuk dikembangkan (Rianawati, S., 2017).

### 2.2 Pemuliaan Tanaman Anggrek

Menurut Marwoto dkk. (2012) selaku peneliti dalam Balai Penelitian Tanaman Hias, cakupan penelitian pemuliaan tanaman anggrek meliputi koleksi tetua persilangan, proses karakterisasi, persilangan antar tetua, perkecambahan biji, pembentukan protokorm, regenerasi planlet dan aklimatisasi. Karakterisasi

pada tetua persilangan terpilih dapat dilakukan melalui pengamatan morfologi terhadap parameter kualitatif serta pengukuran pada parameter kuantitatif berdasarkan panduan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Komisi Nasional Plasma Nutfah (2004). Selain melakukan pengamatan morfologi, dilakukan pengamatan karakter agronomi berupa umur panen (umur masak buah), jumlah bunga, jumlah tangkai bunga, serta ketahanan dari mekar bunga untuk kepentingan budidaya tanaman anggrek (Marwoto dkk., 2012). Pengetahuan terhadap karakter dominan tetua untuk persilangan (bentuk, ukuran dan warna bunga) harus dimiliki pemulia tanaman untuk membantu proses seleksi tetua jantan dan tetua betina. Dalam persilangan juga dilakukan pencatatan tetua atau indukan agar tata nama tanaman tidak rusak (Widiastoety dkk., 2010).

Seleksi pada tetua persilangan dapat dilakukan dengan melakukan analisis kluster (*clustering*) untuk mengetahui hubungan kekebaratan melalui *software* UPGMA (Hartati dan Darsana, 2015), sedangkan hasil karakterisasi morfologi pada tetua persilangan terpilih dapat dianalisis dengan melakukan uji parametrik (uji T) untuk menilai potensi tetua persilangan. Mekanisme persilangan pada bunga anggrek dapat terjadi secara alami (dengan bantuan serangga/pollinator) dan secara buatan (bantuan manusia). Persilangan dilakukan dengan meletakkan *pollinia* (pollen anggrek) pada *gynoecium* (stigma). Anggrek *Dendrobium* telah banyak disilangkan baik secara interspesifik maupun interseksional. Persilangan interspesifik dilakukan pada anggrek dalam satu genus dan satu seksi, sementara persilangan interseksional dilakukan pada anggrek dalam satu genus yang sama tetapi berbeda seksi. Persilangan akan menghasilkan anakan yang dikenal dengan anggrek hibrida (Widiastoety dkk., 2010).

Anggrek *Dendrobium* memiliki *ideotype* (tipe ideal) sebagai tanaman pot maupun anggrek potong. Pembentukan hibrida-hibrida baru mengacu pada *Ideotype* tanaman anggrek. *Ideotype Dendrobium* potong maupun pot disesuaikan dengan standar mutu, ekonomi dan preferensi konsumen menurut Setyawati dkk. (2012). *Ideotype* bunga anggrek adalah anggrek berbentuk tanduk, keriting, bintang, dan bulat, jumlah kuntum pertangkai > 12, tekstur bunga tebal, tangkai bunga tegak, warna bunga cerah, ketahanan mekar bunga > 10 hari. *Ideotype* daun



anggrek adalah memiliki daun yang berukuran pendek hingga sedang, sudut daun  $\geq 45^{\circ}$ - $60^{\circ}$ , daun kuat dan tidak mudah rebah serta daun bagian bawah tidak ternaungi. Hal ini bertujuan untuk efektivitas fotosintesis dan mengurangi efek penaungan daun yang berada pada bagian bawah (Setyawati dkk, 2012). Selain itu, konsep *ideotype Dendrobium* potong berdasarkan SNI 01-3171-2014 terbagi dalam 4 kelas (Mutu super, Mutu I, II, III). Perbedaan mutu berdasarkan jumlah kuntum bunga, panjang tangkai pembungaan, prosentase kuntum mekar.

### 2.3 Perbanyak Anggrek Secara *In-Vitro*

Kultur jaringan tanaman (kultur *in-vitro*) mengacu pada pertumbuhan dan perbanyak sel, jaringan dan organ tanaman yang ditumbuhkan dalam media padat atau cair di bawah kondisi aseptik dan lingkungan yang terkendali. Prinsip teknik kultur *in-vitro* adalah munculnya konsep bahwa sel adalah totipoten (totipotensi sel) dimana setiap sel tanaman memiliki kapasitas dan kemampuan untuk berkembang menjadi seluruh organisme atau tanaman yang utuh (Bhoite dan Palshikar, 2014). Perkecambahan biji anggrek melalui teknik konvensional sangat sukar dilakukan, maka digunakanlah teknik yang lebih mudah, efektif, dan efisien yaitu melalui kultur *in-vitro*.

Para pemulia tanaman anggrek menggunakan kultur *in-vitro* sebagai teknik pemuliaan tanaman non-konvensional. Pada berbagai penelitian pemuliaan anggrek, biji anggrek hasil persilangan dikultur secara *in-vitro* untuk membantu perkecambahan biji. Biji anggrek yang berkecambah akan membentuk struktur sel kompak yang disebut protokorm. Biji anggrek adalah biji yang berukuran mikroskopis dan sangat sulit untuk berkecambah secara alami dikarenakan biji anggrek tidak mempunyai *endosperm* (cadangan makanan). Sejumlah ahli botani melihat, menjelaskan dan menggambarkan adanya sejenis jamur (*fungi*) pada biji, akar dan rimpang anggrek. *Fungi* tersebut dikenal sebagai *mycorrhizae* yang sangat diperlukan benih tanaman anggrek selama masa berkecambah (Yam dan Arditti, 2009). Berdasarkan kondisi tersebut, perbanyak anggrek tidak bisa lepas dari peranan teknik kultur jaringan tanaman (kultur *in-vitro*).

## 2.4 Media Kultur *In-Vitro*

Beberapa media dasar yang dikenal sebagai media dasar dalam kultur jaringan adalah *Murashige and Skoog* (MS), *Vacin and Went* (VW), *Knudson C, White, Woody Plant Media* (WPM), B5, *Nitsch and Nitsch*, *Schenk and Hildebrandt* (SH), N6 dan lain-lain. Komponen-komponen penting dalam media kultur jaringan dapat dikelompokkan menjadi enam kelas yaitu makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino, asam organik dan penambahan zat pertumbuhan tanaman atau ZPT (Metwali dan Al-Maghrabi, 2012). Berbagai hasil penelitian menunjukkan penggunaan media VW dalam menginduksi perkecambahan biji dan mempercepat pembentukan protokorm angrek.

Penelitian Tawaro *et al.* (2008) menunjukkan bahwa jumlah protokorm *Cymbidium findlaysonianum* yang dikultur dalam medium VW cair dengan modifikasi vitamin media MS meningkat empat kali lebih banyak dibandingkan dengan media yang lain. Hasil penelitian Pakum *et al.* (2016) menunjukkan media VW yang dikombinasikan dengan ekstrak kentang (75 gram/L) dan penambahan air kelapa 100 mL/L merupakan kombinasi terbaik untuk perkecambahan angrek tersebut. Penggunaan berbagai senyawa organik seperti air kelapa, ekstrak pisang, ekstrak kentang mampu untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan spesies angrek seperti *Oncidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* dan *Doritaenopsis* (Tawaro *et al.*, 2008).

Air kelapa merupakan senyawa organik yang memiliki berbagai kandungan seperti sukrosa, glukosa, dan sukrosa. Air kelapa juga memiliki kandungan ion anorganik seperti kalium (K), fosfor (P), kalsium (Ca), magnesium (Mg), besi (Fe) dan mangan (Mn). Vitamin yang larut dalam air seperti thiamin (V<sub>B1</sub>), Riboflavin (V<sub>B2</sub>), niacin (V<sub>B3</sub>), asam pantotenat (V<sub>B5</sub>), piridoksin (V<sub>B6</sub>), myo-inositol dan asam askorbat (V<sub>C</sub>) merupakan vitamin yang direkomendasikan untuk pertumbuhan angrek dan terdeteksi pada air kelapa. Air kelapa juga mengandung fitohormon seperti IAA, trans-ZR dan ABA (Huh *et al.*, 2016). Selain itu, air kelapa mengandung difenil urea yang berfungsi sebagai sitokinin yang dapat meningkatkan eksplan pertumbuhan dan regenerasi dengan menginduksi pembelahan sel, kandungan giberelin juga dilaporkan terdapat pada

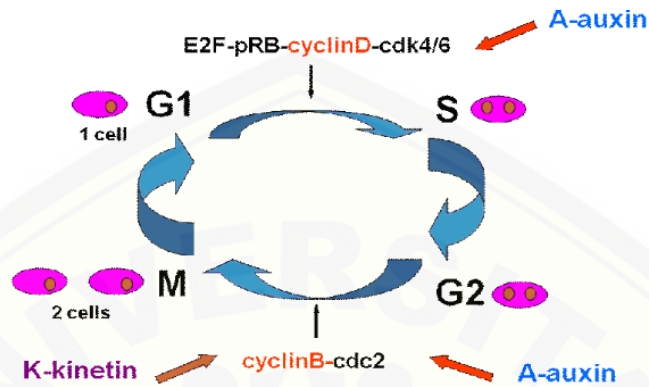
air kelapa (Gupta, A., 2016). Auksin dan Sitokinin merupakan dua golongan ZPT yang pada umumnya dipakai dalam teknik kultur *in-vitro*. Auksin adalah hormon tanaman yang terlibat dalam berbagai mekanisme biologis seluler dasar seperti endositosis, polaritas sel, dan kontrol siklus sel seperti pemanjangan sel dan pertumbuhan diferensial, untuk fenomena makroskopik seperti embriogenesis, pola jaringan dan pembentukan organ (Sauer *et al.*, 2013). Semakin tinggi rasio konsentrasi sitokinin terhadap auksin, akan meningkatkan perkembangan tunas, rasio sitokinin dan auksin yang berimbang akan meningkatkan proliferasi kalus yang tidak berdiferensiasi. Rasio sitokinin yang lebih rendah terhadap auksin akan mendukung perkembangan akar. Sitokinin memainkan peran regulasi positif dalam pengembangan tunas (Murai, 2014).

Sitokinin dan auksin yang berperan dalam siklus sel. Tahap yang paling penting dalam siklus sel adalah transisi G1/S. Terdapat 2 molekul regulator dalam siklus sel yaitu cyclins dan CDKs (Ong dan Torres, 2019). Setelah menerima sinyal ekstraseluler yang berupa auksin (*growth regulator*), maka cyclin D terbentuk dan segera melakukan berikatan dengan CDK membentuk kompleks sisi aktif D-CDK4. Terdapat pula regulasi molekuler berupa retinoblastoma protein (RB) dan faktor transkripsi E2F yang terfosforilasi dengan kompleks aktif D-CDK4. Aktivasi E2F menghasilkan berbagai gen seperti cyclin A, E, DNA polimerase, timidin, kinase dll.

Hasil penelitian Ong dan Torres (2019) menyatakan bahwa kehadiran berbagai komponen molekul seperti cyclin-kinase dan sinyal ekstrasel memainkan peran utama sebagai jantung dari program pembelahan sel. Cyclin E berikatan dengan CDK2 membentuk kompleks E-CDK2 yang berfungsi saat fase S. Skema siklus sel dan kontrol dari hormon tanaman terdapat pada Gambar 2.1. Skema molekuler dari regulasi siklus sel pada tumbuhan sama saja dengan yang terjadi pada hewan (Alberts *et al.*, 2008). Perbedaan yang terjadi adalah adanya sinyal ekstraseluler yang berupa hormon yang mempengaruhi regulasi siklus sel pada tumbuhan (Traas dan Bohn-Courseau, 2005). Selain auksin, terdapat pula peran sitokinin pada proses siklus sel. Sitokinin menstimulasi cyclin B agar berikatan

dengan kompleks cdc2 untuk regulasi proses transisi G2/M (Boucheron *et al.*, 2002).

Gambar 2.1. Skema siklus sel dan kontrol hormon tanaman (Magyar *et al.*, 2005).



Terdapat dua jenis media dalam kultur jaringan, yaitu media padat dan media cair (suspensi). Media suspensi merupakan kultur cair, dimana agarosa tidak diberikan ke dalam media sehingga tidak memadat. Kultur cair memberikan kesempatan yang sama untuk semua bagian eksplan untuk tumbuh, karena semua bagian permukaan eksplan bersinggungan dengan media. Kultur cair berfungsi sebagai media pengoptimalan perkembangan eksplan dan peningkatan produksi (Sinta dkk., 2014). Metode cair bergerak (*Liquid Agiatic Method*) menggunakan bantuan alat berupa *shaker* yang bergerak secara memutar dan mendatar. Metode cair diam (*Liquid Static Method*) menggunakan penyangga (kertas saring) untuk menumbuhkan biji angrek yang akan dikultur. Metode cair bergerak, metode cair diam dan *bioreactor* telah sukses diaplikasikan untuk mendukung perkembangan tanaman hias. Media cair juga telah banyak digunakan dalam penelitian angrek untuk peningkatan pembentukan protokorm, multiplikasi tunas dan PLB (Gupta, S., 2016).

## 2.5 Protokorm dan PLB (*Protocorm Like Bodies*)

PLB adalah istilah khusus untuk embrio somatik pada angrek dan embriogenesis somatik merupakan proses pembentukan embrio yang berasal dari sel-sel somatik (Lee *et al.*, 2013). PLB terbentuk dari bagian tanaman yang biasanya tidak terlibat dalam pembentukan embrio, seperti jaringan daun, akar,

dan batang. Endosperma dan pelapis biji tidak ditemukan pada embrio somatik. Biji anggrek mengalami imbibisi yang menyebabkan pembengkakan embrio. Protokorm adalah embrio yang terbentuk dari proses perkecambahan biji anggrek. Protokorm kemudian berkembang membentuk struktur daun dan akar yang kemudian akan menjadi planlet, sedangkan PLB yang muncul pada bagian protokorm dapat berkembang menjadi anakan/ individu baru (Setiari *et al.*, 2018).

## 2.6 Penanda Molekuler Pada Tanaman

Dalam beberapa dekade terakhir, pengembangan teknik marka molekuler berbasis DNA memiliki peningkatan yang signifikan dan secara rutin digunakan dalam studi ekologi, evolusi, taksonomi, filogenetik, genetik populasi, dan identifikasi ilmu tanaman (Zulfahmi, 2013). Kloroplas adalah organel dengan DNA spesifik yaitu DNA kloroplas (cpDNA). Genom kloroplas dapat digunakan sebagai bahan yang menjanjikan untuk proses klasifikasi dan diferensiasi tanaman (Freitas *et al.*, 2018). Pada tanaman anggrek, karakter genom kloroplas akan memberikan informasi tentang komposisi yang berbeda dari struktur nukleotida dalam kloroplas setiap spesies anggrek, sehingga dapat digunakan sebagai penanda molekuler untuk identifikasi spesies anggrek dan pewarisan sifat (Ferdiani *et al.*, 2015). DNA Kloroplas (cpDNA) merupakan salah satu penanda molekuler yang banyak digunakan dalam riset bidang evolusi molekuler dan sistematika tanaman dikarenakan memiliki genom yang berukuran kecil, cpDNA juga banyak digunakan untuk analisis tetua (*ancestors analysis*). Analisis molekuler dapat dikerjakan dengan menggunakan penanda molekuler cpDNA (*chloroplast DNA*) yaitu *trnL<sub>UAA</sub>* intron dan dideteksi menggunakan PCR. Keberhasilan pendugaan *maternal inheritance* (pewarisan sifat tetua betina) dengan menggunakan marka molekuler cpDNA dilakukan oleh Cafasso *et al.* (2005) dengan menganalisis biji anggrek *Anacamptis palustris* dengan PCR.

cpDNA telah dikarakterisasi hingga tingkat molekuler sehingga dapat menjadi sumber informasi untuk keberlanjutan riset di bidang molekuler. Metode deteksi cpDNA dapat menggunakan PCR dan sekuensing. Beberapa gen yang terdapat pada cpDNA yang meliputi gen *accD*, *matK*, *ndhJ*, *rpoB2*, *rpoC1*, dan

ycf5 (Lahaye *et al.*, 2008), rbcL (Kress dan Erickson, 2007), trnL<sub>UAA</sub> intron (Taberlet *et al.*, 2007), dan trnH-psbA (Kress dan Erickson, 2007). *Internal Transcribed Spacer (ITS)* pada *DNA nuclear* tanaman juga menunjukkan bagian yang menjanjikan sebagai penanda molekuler (CBOL, 2013).

Bagian intron kloroplas diklasifikasikan sebagai intron kelompok I, kelompok II, dan III. Hampir semua tanaman darat dan alga *charophyte* memiliki intron kelompok I dalam gen trnL<sub>UAA</sub> (Amirahmadi *et al.*, 2010). Pada tanaman, trnL<sub>UAA</sub> intron terletak dan diatur secara bersamaan oleh Gen trnL<sub>UAA</sub> dan trnF<sub>GAA</sub>, yang umumnya disebut sebagai wilayah trnL-F pada genom kloroplas. Sejak diperkenalkan ke dalam sistematika molekuler, trnL<sub>UAA</sub> intron dan trnL-F spacer telah dianggap layak sebagai marka molekuler di berbagai tingkat taksonomi. Jumlah penanda untuk identifikasi molekuler semakin banyak tersedia, termasuk wilayah trnL-F, yaitu trnL<sub>UAA</sub> intron (disingkat 'trnL intron') dan trnL-F *intergenic spacer*, merupakan salah satu penanda molekuler yang paling sering digunakan untuk identifikasi tingkat molekuler (Hao *et al.*, 2009). Terdapat dua wilayah dalam trnL intron yaitu trnL CD dan trnL GH (Taberlet *et al.*, 2007). Penggunaan dan evaluasi primer trnL intron *region* CD atau trnL CD telah berhasil dan sukses digunakan pada beberapa famili tanaman, salah satunya adalah famili Orchidaceae (Santos dan Pereira, 2017).

## 2.7 Hipotesis Penelitian

Pengambilan hipotesis berdasarkan latar belakang, perumusan masalah dan tujuan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Hasil karakterisasi berupa karakter morfologi dan agronomi dapat digunakan untuk menilai potensi tetua persilangan terpilih dengan melakukan uji parametrik yaitu uji T (*T-test*).
2. Persilangan interspesifik dan resiprokal dapat digunakan untuk mengetahui fertilitas dan kompatibilitas dari tetua persilangan terpilih.
3. Deteksi *maternal inheritance* pada planlet anggrek hasil persilangan dapat diidentifikasi dan dikonfirmasi pada tingkat molekuler dengan menggunakan marka molekuler DNA kloroplas (cpDNA).

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat

Percobaan ini dilaksanakan pada bulan Februari 2019 sampai dengan Desember 2019 bertempat di *DD Orchids Nursery* Desa Dadarejo, Kabupaten Batu, Jawa Timur; Laboratorium Kultur Jaringan Anggrek *Agrotechnopark*, Laboratorium Fisiologi Tanaman Fakultas Pertanian serta UPT-Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi CDAST, Universitas Jember Jalan Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto.

### 3.2 Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan dalam percobaan ini antara lain: kamera digital, jangka sorong, penggaris, kain penutup, klip, stik (tusuk gigi), kertas label, lumpang, alu porselen, kertas saring, *Laminar Air Flow Cabinet*, *hot plate*, timbangan analitik, botol kultur, batang pengaduk, gelas *stainless*, gelas ukur, pipet, *autoclave*, oven listrik, cawan petri, labu *erlenmeyer*, pembakar bunsen, pinset, *shaker*, pH meter, *thermocycler* (mesin PCR), *waterbath*, *gel documentation* dan *software* MVSP versi 3.22. Bahan percobaan meliputi tanaman induk anggrek *Dendrobium* yang telah berbunga, biji dan protokorm anggrek hasil persilangan, *buffer* CTAB, media VW cair dan padat, air kelapa, alkohol, spiritus, akuades, komponen reaksi PCR serta penanda molekuler DNA kloroplas (cpDNA).

### 3.3 Rancangan Percobaan

Percobaan dimulai dengan melakukan analisis klaster, karakterisasi morfologi dan melakukan percobaan persilangan. Buah hasil persilangan dipelihara hingga matang fisiologis kemudian biji anggrek dikecambahkan melalui kultur *in-vitro* hingga membentuk protokorm. Protokorm kemudian dikembangkan dalam media regenerasi untuk berdiferensiasi menjadi planlet. Planlet hasil kultur *in-vitro* dianalisis pada tingkat molekuler sebagai identifikasi awal pewarisan sifat serta dilakukan aklimatisasi terhadap planlet.

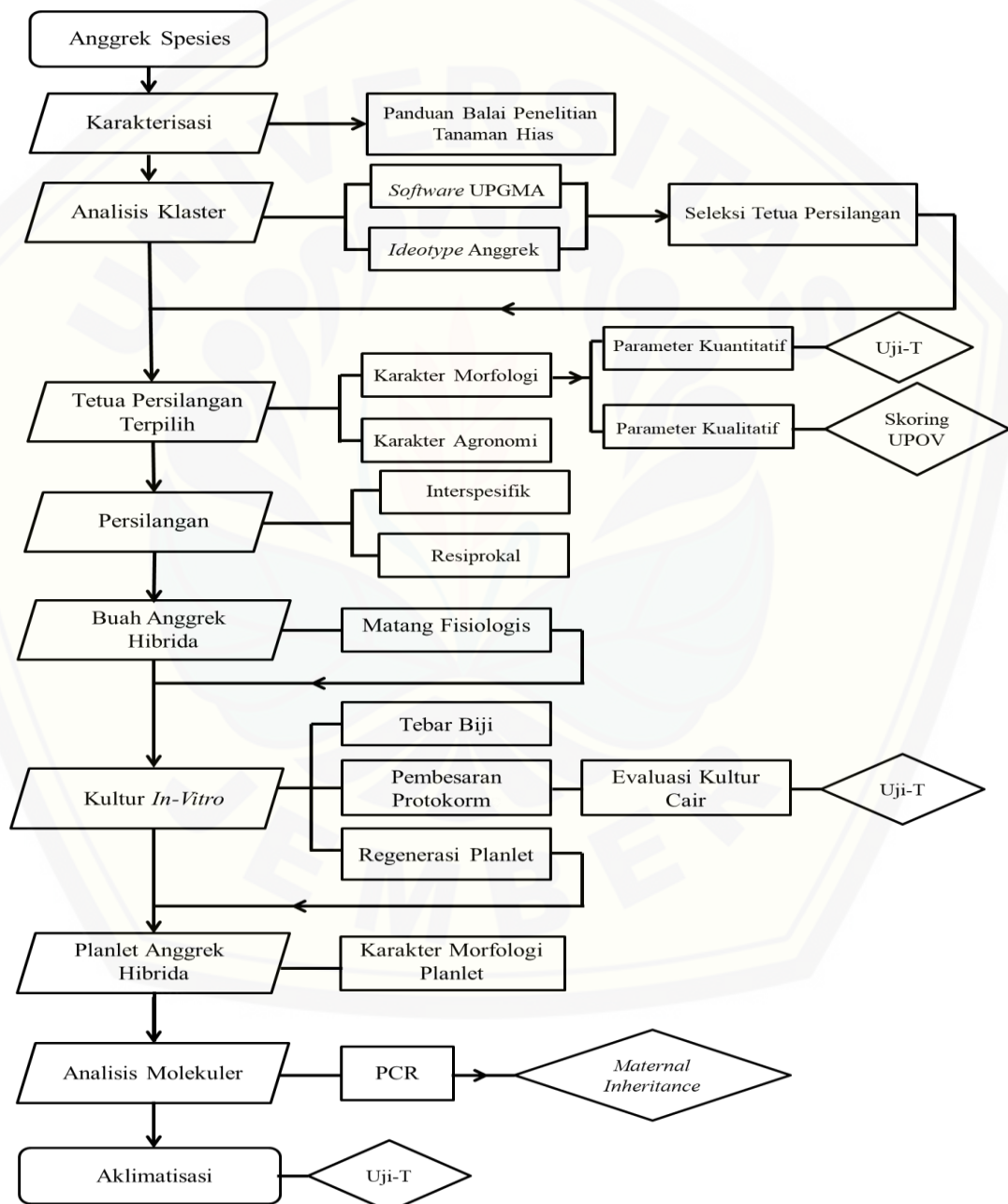
Rincian rancangan percobaan adalah sebagai berikut:

1. Melakukan karakterisasi dan analisis klaster pada beberapa anggrek spesies yang tergolong dalam genus *Dendrobium*, seksi spatulata sebagai metode untuk mendapatkan hubungan kekerabatan yang dapat menjadi modal penting dalam melakukan percobaan persilangan.
2. Tetua persilangan yang digunakan adalah tanaman anggrek yang telah berbunga. Proses karakterisasi morfologi dilakukan untuk mendapatkan parameter kuantitatif dan kualitatif pada masing-masing tetua persilangan. Karakterisasi dilakukan pada seluruh bagian tanaman yang terdiri dari akar, *psedobulb*, daun dan bunga. Setelah melakukan karakterisasi, organ bunga dari masing-masing tetua persilangan digunakan sebagai bahan percobaan persilangan.
3. Kriteria bunga untuk percobaan persilangan adalah bunga yang telah mekar sempurna (*anthesis*). Jumlah bunga yang disilangkan antara 1-3 bunga, tergantung pada jumlah bunga per-tangkai dari masing-masing tetua persilangan. Teknik persilangan dalam penelitian ini adalah persilangan interspesifik dan resiprokal yang bertujuan untuk mengetahui fertilitas serta kompatibilitas pada masing-masing tetua persilangan. Percobaan persilangan menghasilkan buah anggrek, kemudian biji anggrek yang berada didalam buah akan dikecambahkan dalam kultur *in-vitro*.
4. Kultur *in-vitro* pada biji anggrek terdiri dari tiga tahap yaitu tahap tebar biji, pembesaran dan perbanyakkan protokorm, serta tahap pendewasaan (regenerasi planlet). Kultur *in-vitro* pada media pembesaran protokorm menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 25 satuan percobaan. Kultur *in-vitro* dalam media pembesaran dan perbanyakkan bertujuan untuk mendapatkan protokorm anggrek yang telah memiliki tunas. Protokorm kemudian dikembangkan dalam media regenerasi untuk membentuk planlet. Planlet kemudian digunakan sebagai bahan untuk melakukan analisa tingkat molekuler dan aklimatisasi.
5. Melakukan pendugaan awal pewarisan sifat secara molekuler. Bahan untuk analisis molekuler berupa planlet anggrek hasil persilangan dan proses



identifikasi menggunakan marka molekuler *trnL* intron *region* CD dalam DNA kloroplas untuk mengkonfirmasi pola pewarisan sifat *maternal inheritance*.

6. Melakukan aklimatisasi planlet untuk menunjang keberlangsungan hidup planlet dan sebagai periode awal kegiatan budidaya tanaman anggrek secara *ex vivo*. Bagan Alur Penelitian terdapat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

### 3.4 Pelaksanaan Percobaan

#### 3.4.1 Karakterisasi dan Analisis Klaster

Karakterisasi morfologi anggrek dilaksanakan di *DD Orchids Nursery* dengan mengikuti panduan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Komisi Nasional Plasma Nutfah (2004) yang terdiri dari kegiatan pengukuran parameter morfologi menggunakan jangka sorong, pencatatan hasil dan dokumentasi hasil karakterisasi. Data morfologi adalah informasi penting pada kegiatan pemuliaan, terutama yang berkaitan dengan persilangan serta sifat unggul yang diinginkan (Handini dkk., 2016). Penentuan skoring hasil karakterisasi disajikan dalam bentuk tabel dan mengacu pada *test guideline* tanaman anggrek UPOV (*International Union for The Protection of New Varieties of Plants*). Hasil karakterisasi kemudian dianalisis dengan software UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic mean*), MVSP versi 3.22 untuk melakukan klustering (pengelompokan) dan modal seleksi tetua persilangan. Tabel panduan karakterisasi dan skoring UPOV terdapat pada Lampiran 1.

#### 3.4.2 Persilangan Anggrek

Persilangan dikerjakan pagi hari (07.00-08.00 WIB) di *DD Orchids Nursery* dengan menyilangkan tetua persilangan terpilih sebagai tetua jantan maupun betina. Pelaksanaan percobaan persilangan interspesifik dan resiprokal adalah:

1. Persiapan kit persilangan

Kit persilangan terdiri dari jangka sorong, benang, penggaris, kain penutup, klip, stik (tusuk gigi), alat tulis dan kertas label.

2. Seleksi bunga persilangan

Seleksi bunga memperhatikan kondisi bunga dan jumlah bunga yang disilangkan. Kondisi bunga adalah dalam keadaan mekar sempurna (*anthesis*) dan maksimal menggunakan tiga bunga pada satu tangkai untuk disilangkan.

3. Persilangan

Persilangan secara interspesifik dan resiprokal dilakukan dalam empat tahap.

Tahap pertama pada persilangan interspesifik adalah mendorong perhiasan

bunga, yaitu bagian *labellum* tetua betina dengan bantuan jari tangan ke arah bawah. Tahap kedua adalah mengambil cairan bening pada permukaan *column* (stigma anggrek) dengan menggunakan ujung stik. Tahap ketiga adalah membuka *anther cap* tetua jantan dan dengan hati-hati mengambil *pollinia* (pollen anggrek) dengan ujung stik yang telah dilumuri cairan stigma dari tetua betina. Tahap keempat yaitu menempelkan *pollinia* dari tetua jantan pada *column* tetua betina. Persilangan resiprokal mengikuti tahap persilangan interspesifik, perbedaannya adalah dengan mengganti model persilangan pada tetua jantan menjadi tetua betina dan sebaliknya.

#### 4. Pemberian label

Setelah proses persilangan selesai dikerjakan, kemudian lakukan pencatatan waktu polinasi (tanggal, bulan, dan tahun polinasi) serta nama tetua persilangan yang digunakan. Pencatatan tetua persilangan serta sumber benih (*seed parent* dan *pollen parent*) harus tertera dan tertulis dengan jelas. Sumber benih merupakan identitas yang wajib ada saat akan melakukan register anggrek hibrida pada RHS (*Royal Horticultural Society*).

### 3.4.3 Perbanyakan Anggrek Hasil Persilangan

Kultur *in-vitro* untuk perbanyakan protokorm dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Anggrek *Agrotechnopark* Universitas Jember. Pengamatan protokorm dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jember. Pelaksanaan perbanyakan protokorm meliputi sterilisasi alat inokulasi, sterilisasi ruang kerja, penebaran biji anggrek pada media tebar, subkultur protokorm pada media pembesaran dan regenerasi planlet.

#### 1. Sterilisasi Alat dan Ruang Kerja

Peralatan inokulasi disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit (1,5 atm dan suhu 121°C). Ketika akan bekerja dalam LAFC, peralatan inokulasi dicelupkan dalam alkohol 70%, dibakar dengan api bunsen kemudian letakkan dalam LAFC. Sterilisasi LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*) dilakukan dengan menggosok laminar menggunakan kertas tissue dengan alkohol 70%,

kemudian nyalakan lampu UV ( $\pm 1$  jam). Ketika ruangan LAFC siap digunakan, matikan lampu UV dan nyalakan *blower*.

## 2. Penebaran Biji

Setiap biji yang berasal dari buah hasil persilangan ditebar pada media tebar. Setelah 2-3 bulan dalam media tebar, protokorm disubkultur pada media pembesaran. Media tebar menggunakan media VW dengan penambahan ekstrak tomat 150 gram/L (Dwiyani *et al.*, 2009).

## 3. Pembesaran Protokorm

Protokorm dalam media tebar disubkultur pada media pembesaran. Media pembesaran menggunakan media VW cair yang ditambahkan air kelapa. Rancangan kultur cair menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan total 25 satuan percobaan. Desain dan evaluasi kultur cair dalam percobaan ini menggunakan media padat sebagai pembanding. Desain dan rancangan percobaan terdapat pada Gambar 3.2. Seluruh satuan percobaan baik pada media padat dan cair mendapat formulasi media yang sama yaitu media VW dengan penambahan air kelapa. Eksplan yang ditanam dalam tiap satuan percobaan menggunakan standar berat. Berat protokorm yang ditimbang untuk tiap satuan percobaan adalah 0,25 gram yang setara dengan  $\pm 100$  protokorm. Konsentrasi air kelapa yang digunakan dalam penelitian ini adalah 200 mL/L Huh *et al.* (2016). Protokorm ditumbuhkan pada media pembesaran selama 1 bulan.

1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10		6	7	8	9	10
11	12	13	14	15		11	12	13	14	15
16	17	18	19	20		17	17	18	19	20
21	22	23	24	25		21	22	23	24	25
Media padat						Media cair				

Gambar 3.2 RAL dalam media pembesaran

#### 4. Regenerasi Planlet

Protokorm kemudian dipelihara dalam media regenerasi untuk memacu pembentukan planlet. Planlet yang terbentuk kemudian digunakan sebagai bahan untuk analisis molekuler dan aklimatisasi. Media regenerasi menggunakan media VW padat dengan penambahan 15% air kelapa, 5% homogenat pisang, 5% homogenat kentang, 0,2 % arang aktif (Tawaro *et al.*, 2008).

#### 3.4.4 Identifikasi Pewarisan Sifat Secara Molekuler

Analisis molekuler dilakukan di UPT-Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi CDAST, Universitas Jember yang meliputi tahap isolasi DNA, dan aplikasi PCR.

##### 1. Isolasi DNA

Isolasi DNA dari bagian daun segar yang berasal dari planlet anggrek *D. lasianthera*, *D. antennatum* dan *D. hibrida* berdasarkan metode (Doyle dan Doyle, 1987) yang dimodifikasi. Pertama, potong sampel daun seberat 0,2 gram dan rendam dalam larutan etanol murni selama 24 jam. Setelah itu bilas menggunakan akuades steril dan keringkan. Gerus sebanyak 0,2 g sampel daun segar hingga halus disertai penambahan 700  $\mu\text{l}$  *buffer* CTAB dengan menggunakan alu dan mortar. Pindahkan ekstrak tanaman ke dalam tabung *ependorf*, kemudian inkubasikan ekstrak tanaman dalam *waterbath* selama 30 menit pada suhu 60°C. Setelah diinkubasi dalam *waterbath*, sentrifugasi campuran ekstrak tanaman dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, suhu 4°C. Ambil supernatan dan pindahkan supernatan dalam tabung *ependorf* steril. Pada tiap tabung *ependorf* tambahkan 250  $\mu\text{l}$  isopropanol (equal volume) dan inkubasi dalam suhu -20°C selama 30 menit. Sentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, suhu 4°C.

Buang supernatant, tambahkan buffer TE sebanyak 50  $\mu\text{l}$ , inkubasi pada suhu ruang 37°C, selama 1 jam. Tambahkan buffer TE 250  $\mu\text{l}$  dan PCI 300  $\mu\text{l}$ . Sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, suhu ruang. Ambil supernatant 250  $\mu\text{l}$  dan kloroform 250  $\mu\text{l}$ . Vortex kemudian sentrifuse dengan

kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, suhu 4°C. Ambil supernatant 200 µl dan isopropanol 200 µl. Inkubasi pada suhu -20°C selama 30 menit. Sentrifuse kecepatan 12.000 rpm, 10 menit, suhu 4°C, buang supernatant dan keringkan pellet. Setelah pellet kering, tambahkan 20 µl dan simpan pada suhu -20°C.

## 2. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Penanda molekuler untuk amplifikasi DNA adalah trnL intron pada tiap sampel DNA. Setiap larutan PCR (konsentrasi 20 µl): sampel DNA (2 µl), PCR master mix (10 µl), *primer forward* dan *reverse* @ 1 µl, dan dicampur dengan akuabides (ddH<sub>2</sub>O 6 µl). Amplifikasi DNA menggunakan PCR *thermal cycle* (Lestari dkk., 2018). Urutan primer untuk penanda molekuler trnL CD adalah: cpDNAtLnLC\_F (5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3') dan cpDNAtLnLD\_R (5'-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3') (Santos dan Pereira, 2017). Program PCR untuk tahap pre-denaturasi diatur pada suhu 95°C selama 30 detik, dilanjutkan dengan 35 siklus tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, tahap *annealing* pada suhu 53°C selama 1 menit dan tahap *ekstension* pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap terakhir adalah *post-extention* selama 10 menit pada suhu 72°C, hold pada suhu 4 °C.

### 3.4.5 Aklimatisasi Planlet

Aklimatisasi dilakukan pada saat planlet berumur 5 bulan dalam media regenerasi. Media aklimatisasi yang digunakan adalah campuran media *moss* dengan arang, sementara penanaman planlet dilakukan dalam bentuk Kompot (*community pot*). Adi dkk. (2014) mengemukakan bahwa media moss menunjukkan respon pertumbuhan yang baik pada pertumbuhan planlet anggrek hitam. Media tumbuh tanaman anggrek yang umum digunakan adalah campuran arang, pakis, moss, potongan kayu, potongan bata atau genting, serutan kayu, kulit pinus dan serabut kelapa (Ginting dkk., 2004).

### 3.5 Variabel Pengamatan

Variabel yang diamati meliputi analisis klaster, karakterisasi tetua persilangan terpilih untuk memperoleh karakter morfologi dan agronomi, persilangan interspesifik dan resiprokal untuk memperoleh data fertilitas dan

kompatibilitas, karakter morfologi biji dan protokorm anggrek, identifikasi awal *maternal inheritance* serta aklimatisasi planlet anggrek hasil persilangan.

### 3.5.1 Analisis Klaster dan Karakterisasi Tetua Persilangan

Analisis klaster menggunakan *software* MVSP versi 3.22 dengan data berupa parameter kuantitatif dan kualitatif pada 10 anggrek spesies. Karakterisasi pada tetua persilangan terpilih melalui pengamatan morfologi terhadap parameter kualitatif serta pengukuran pada parameter kuantitatif berdasarkan panduan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Komisi Nasional Plasma Nutfah (2004).

Variabel pengamatan parameter kualitatif meliputi:

- a. Karakter dari daun (bentuk, bentuk ujung, penampang melintang, susunan, bentuk tepi, tekstur permukaan dan simetri daun).
- b. *Pseudobulb* (bentuk *pseudobulb*, penampang melintang *pseudobulb*)
- c. Pembungaan (resupinasi, posisi dan tipe pembungaan, spur).
- d. Bunga (bentuk dari bunga, sepal dan petal, bentuk ujung sepal dan petal, susunan petal, penampang melintang sepal dan petal).
- e. *Labellum* (letak lekuk *labellum*, penampang melintang *labellum*, bentuk *labellum*, bentuk keping sisi, bentuk keping tengah, kuvatur keping sisi).
- f. Tipe kalus
- g. Bentuk buah
- h. Tipe perakaran
- i. Tipe pertumbuhan

Data pengamatan parameter kualitatif pada proses karakterisasi morfologi anggrek diolah dalam bentuk tabel yang mengikuti format UPOV, kemudian dilakukan skoring untuk menilai potensi masing-masing indukan yang akan digunakan sebagai tetua persilangan.

Variabel pengamatan parameter kuantitatif meliputi:

- a. Tangkai (panjang tangkai bunga dan rangkaian bunga serta diameter tangkai bunga)
- b. Daun (panjang daun, lebar daun, ketebalan daun)
- c. *Pseudobulb* (panjang *pseudobulb*, diameter *pseudobulb*)

- d. Bunga (panjang perhiasan bunga, lebar perhiasan bunga, panjang sepal dorsal, panjang sepal lateral, panjang petal, jumlah kuntum).

Pengukuran parameter kuantitatif dengan menggunakan jangka sorong akurasi 0,01 mm. Hasil Karakterisasi berupa data pengamatan parameter kuantitatif dianalisis menggunakan uji parametrik dengan uji-T ( $\alpha$  5%). Karakter agronomi yang diamati meliputi umur panen (umur masak buah), jumlah bunga, jumlah tangkai bunga, serta ketahanan dari mekar bunga.

### **3.5.2 Persilangan Interspesifik dan Resiprokal**

Teknik persilangan secara interspesifik dan resiprokal bertujuan untuk mengetahui kompatibilitas dan fertilitas indukan. Kompatibilitas dan fertilitas dari tetua persilangan terpilih dapat diketahui dengan menganalisis parameter pengamatan berupa pembentukan buah. Pengamatan data menggunakan analisis deskriptif sehingga data yang diperoleh diuji secara deskriptif (Hartati dkk., 2014).

### **3.5.3 Karakter Morfologi Biji dan Planlet Anggrek**

Variabel pengamatan difokuskan pada struktur biji anggrek hasil persilangan, identifikasi fase pertumbuhan protokorm, kedinian pembentukan primordia tunas, berat basah dan berat kering protokorm serta morfologi anggrek hibrida.

- a. Struktur biji anggrek

Pengamatan struktur biji anggrek dilakukan dengan menggunakan biji anggrek yang masih menempel dalam daging buah. Pengamatan dan dokumentasi menggunakan Mikroskop Leica.

- b. Identifikasi fase pertumbuhan protokorm

Identifikasi dilakukan pada setiap dua minggu sekali. Identifikasi serta dokumentasi dilakukan pada tahap tebar hingga tahap pembesaran dan perbanyakkan dengan menggunakan Mikroskop Leica.



c. Kedinian pembentukan primordia daun

Pengamatan dilakukan dengan mengamati kultur setiap hari dan menentukan hari pertama munculnya primordia daun. Satuan pengamatan Hari Setelah Tanam (HST). Pengamatan dan dokumentasi menggunakan Mikroskop Leica.

d. Berat basah dan berat kering protokorm

Pengamatan dilakukan pada akhir penelitian yaitu 30 hari setelah tanam (30 HST) pada media pembesaran. Pengamatan dilakukan dengan menimbang 100 protokorm pada timbangan analitik. Analisis berat basah dan kering protokorm dilakukan pada 15 botol kultur cair dan padat menggunakan uji homogenitas (uji F) yang dilanjutkan dengan melakukan uji-T ( $\alpha$  5%).

e. Morfologi planlet anggrek hibrida

Pengamatan karakter morfologi dilakukan pada planlet anggrek hibrida menggunakan analisis deskriptif. Analisis berupa perbandingan morfologi planlet *D.* hibrida dan planlet tetua persilangan.

### 3.5.4 Identifikasi Pewarisan Sifat Secara Molekuler

Hasil PCR diproses dengan elektroforesis dalam 1 % gel agarosa. Gel agarosa divisualisasikan dengan transilluminator UV untuk mengamati fragmen DNA (Ferdiani *et al.*, 2015). Pengamatan pada hasil PCR dilakukan secara visual dan didokumentasi dengan menggunakan *Gel Documentation*.

### 3.5.5 Aklimatisasi Planlet

Parameter pengamatan berupa tinggi planlet, jumlah daun, panjang daun, jumlah akar, panjang akar, dan berat segar planlet yang berasal dari media cair dan padat. Pengamatan dilakukan saat planlet berumur 5 bulan setelah tanam pada media regenerasi. Analisis pada parameter aklimatisasi menggunakan uji homogenitas (uji F) yang dilanjutkan dengan melakukan uji-T ( $\alpha$  5%).

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian sebagai berikut:

1. Hasil uji T (*T-test*) menunjukkan bahwa dari 13 karakter kuantitatif dan kualitatif memiliki perbedaan pada morfologi daun, *pseudobulb* dan bunga. Perbedaan karakter morfologi dan agronomi pada tetua persilangan terpilih menunjukkan bahwa *D. lasianthera* dan *D. antennatum* memiliki potensi sebagai induk untuk produksi angrek hibrida dengan tingkat keragaman genetik tinggi.
2. Persilangan *D. lasianthera* (♂) dan *D. antennatum* (♀) menghasilkan buah angrek hibrida dengan biji yang viabel. Persilangan *D. antennatum* (♂) dan *D. Lasianthera* (♀) berhasil membentuk buah tetapi tidak dapat menghasilkan biji angrek yang viabel.
3. Planlet *D.* hibrida hasil persilangan *D. lasianthera* (♂) dan *D. antennatum* (♀) mengandung DNA yang telah terkonfirmasi dengan primer spesifik pada trnL intron cpDNA (DNA kloroplas) sejumlah 2 individu tanaman (40%).

### 5.2 Saran

Pemeliharaan planlet pada tahap aklimatisasi dan budidaya planlet diperlukan hingga tanaman angrek berbunga untuk mengetahui karakter tetua persilangan yang diturunkan, terutama *ideotype* bunga angrek yang terbentuk pada *D. hibrida*.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alberts, B., Johson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2008. Molecular biology of the cell fifth edition. Garland Science. New York.
- Adelberg, J., W. 2006. Agitated thin-films of liquid media for efficient Micropropagation. In: Dutta Gupta S, Ibaraki Y (eds) *Plant Tissue Culture Engineering*, Springer, The Netherlands, pp 103-117.
- Adi, N., K., A., P., Astarini, I., A., Astiti, N., P, A. 2014. Acclimatization of Black orchids propagated in vitro on different media. *JURNAL SIMBIOSIS*. II (2): 203-214.
- Amalia, R., Nurhidayati, T. dan Nurfadilah, S. 2013. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Vitamin terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara *In Vitro*. *Sains dan Seni Pomits*. 1(1): 1-6.
- Amirahmadi, A., Osaloo, S., K., and Maassoumi, A., A. 2010. Loss of Chloroplast trnLUAA Intron In Two Species of Hedysarum (Fabaceae): Evolutionary implications. *Iranian Journal of Biotechnology*. 8(3): 150–155.
- Apriyanti, D., H., Arymurthy, A., M., Handoko, L., T. 2014. Identification of Orchid Species Using Content-Based Flower Image Retrieval. 3–8.
- Arditti, J. 1977. *Orchid Biology*. Reviews and Perspectives, II, Comstock Publishing Associates a Division of Cornell, University Press, Ithaca.
- Arif, A., Ahmadnarif, R., dan Ratnawati. 2014. Hubungan kekerabatan anggrek dendrobium berdasarkan karakteristik morfologis dan anatomis daun. *Jurnal Prodi Biologi*. 7(4): 213-222.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Komisi Nasional Plasma Nutifah. 2004. *Panduan Karakterisasi Tanaman Hias : Anggrek dan Anthurium*. Bogor: Departemen Pertanian.
- Balai Penelitian Tanaman Hias. 2015. Pemuliaan anggrek. *Iptek Hortikultura*. 7(11).
- Barroroh, U., dan Aiman, U. 2005. Pengaruh Macam dan Konsentrasi Ekstrak Tomat terhadap Pertumbuhan Anggrek Cattleya Secara *In-Vitro*. *Planta Tropika*. 1(2): 79-83.
- Batygina, T. B., Bragina E., A., vasilyeva, V., E. 2003. The reproductive system and germination in orchids. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA Series Botanica*. 45 (2): 21–34.

- Bey, Y., Syafii, W. dan Ngatifah, N. 2006. Pengaruh Pemberian Giberelin Pada Media Vacint dan Went terhadap Perkecambahan Biji Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* BL) Secara In Vitro. *Biogenesis*. 14(1): 15-21.
- Bewley, J., D. and Black, M. 1994. Physiology of Develomental and Germination. Springer US. 446 pages.
- Bhoite, H., A. and Palshikar, G., S. 2014. Plant Tissue Culture : A Review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2(6): 565–572.
- Boucheron, E., A., Guivarc'h, A., Azmi, A., Dewitte, W., Onckelen, H., V., Chriqui, D. 2002. Competency of *Nicotiana tabacum* L. stem tissues to dedifferentiate is associated with differential levels of cell cycle gene expression and endogenous cytokinins. *Planta*. 215: 267-278.
- Borcsh, T., Hilu, K., W., Quandt, D., Wilde, V., Neinhuis, C. Barhlott, W. 2003. Noncoding plastid trnI-trnV sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperm. *Journal of evolutionary biology*. 16(4): 558-576.
- Brock, G., Vasyi, P., Susmita, D., and Somnath, D. 2008. cIValid: An R Packagefor Cluster Validation. *Journal of Statistical Software*. 25(4): 1-22.
- Brukhin, V. and Morozova, N. 2011. Plant Growth and Development Basic Knowledge and Current Views. *Math. Model. Nat. Phenom*. 6(2): 1-53.
- Chang, C., C., Lin H., C., Chen H., H., Chaw, S., M. 2006. The Chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (orchidaceae): Comparative analysis of evolutionary rate with that of Grasses and its Phylogenetic Implication. *Mol. Bio. Evol*. 23(2): 279-291.
- Cafasso, D., Widmer, A., andCozzolino, S. 2005. Chloroplast DNA Inheritance In The Orchid *Anacamptis palustris* Using Single-seed Polymerase Chain Reaction. *Journal of Heredity*. 96(1): 66–70.
- CBOL. 2013. A DNA Barcode For Land Plants. *Molecular Ecology Resources*. 106(31): 1–4.
- Direktorat jendral Hortikultura. 2008. Standart operasional prosedur anggrek *Dendrobium*. Departemen pertanian.
- Doyle, J., J. and Doyle, J., L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical bulletin*. 19(1): 11-15.
- Dwiatmini, K,. 2013. Keragaan Karakter Kualitatif Hasil Persilangan Anggrek *Phalaenopsis*. *J.Hort*. 23(4): 291–299.

- Dwiyani, R., Purwantoro, A., Indrianto, A., Semiarti, E. 2009. Peningkatan kecepatan pertumbuhan embrio anggrek *Vanda tricolor* Lindl. pada medium diperkaya ekstrak tomat. *Prosiding Bioteknologi*.
- Farook, F. Attanayake, R., N., Senanayake, S., P. 2016. Optimization of a genomic DNA extraction technique for genetic diversity studies of selected orchids evs. with ornamental value. *International Research Symposium on Pure and Applied Sciences*. BO-17.
- Fauziah, R., Fitmawati, Sofiyanti, N. 2015. Optimasi isolasi DNA dan amplifikasi sekuen gen *trnL-F* intergeneric spacer cpDNA Mangga (*Mangifera*). Universitas Riau: 1-10.
- Ferdiani, D., I., Devi, F., L., Koentjana, J., P., Milasari, A., F., Nur'Aini, I., dan Semiarti, E. 2015. Molecular Characterization of Natural Orchid in South Slopes of Mount Merapi, Sleman regency, Yogyakarta. *AIP Conference Proceedings*. 1677.
- Firgianto, R. and Kasutjianingati, K. 2018. Characterization of Morphology from Orchid *Vanda* sp. as a Genetic Information Source for Preservation and Agribusiness of Orchids in Indonesia. *1st International Conference on Food and Agriculture*, December. IOP Publishing.
- Freitas, A., S., Da Anunciacao, R., R., D'oleivera-Matielo, C., B., and Stefenon, V., M. 2018. Chloroplast DNA: A Promising Source of Information for Plant Phylogeny and Traceability. *Journal of Molecular Biology and Methods*. 2-5.
- Gao, Y., Zhou, Y., Xie., Y, Shen., S. 2018. Chloroplast genome sequence of the endangered Orchidaceae spesies *Dendrobium hancockii*. *Conservation Genect Resour* 10: 161-163.
- Giusti, M., and Wrolstad, R., E. 2001. Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc.
- Ginting B., Prasetio, W. dan Sutater, T. 2004. Media Tumbuh untuk Varietas Baru Anggrek *Dendrobium*. *Prosiding Seminar Nasional Florikultura*. Bogor: 4-5 Agustus: 65-70.
- Gnasekaran, P., Poobathy R., Mahmood M., Samian M., R. and Subramaniam, S. 2012. Effects of complex organic additives on improving the growth of PLBs of *Vanda Kasem's Delight*. *Australian Journal of Crop Science*. 6(8): 1245-1248.

- Gollagunta V, Adelberg J.,W, Rieck J, Rajapakse N. 2004. Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates, biomass and storage quality of micropropagated *Hosta*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77: 125–131.
- Gupta, A. 2016. Asymbiotic Seed Germination in Orchids: Role of Organic Additives. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology* .3(5): 143–147.
- Gupta, S., D. 2016. Liquid Medium Based Micropropagation of Monocotyledonous Ornamental. *Pointer Publishers, India* pp. 124-139.
- Handini, A., S., Sukma, D., dan Sudarsono. 2016. Analisis Keragaman Morfologi dan Biokimia pada Anggrek *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Jurnal Agronomi Indonesia*. 44(1): 62–67.
- Hao, D., C., Huang, B., L., Chen, S., L. and Mu, J. 2009. Evolution of the Chloroplast trnL-trnF Region in the Gymnosperm Lineages Taxaceae and Cephalotaxaceae. *Biochemical Genetics*. 47(5–6): 351–369.
- Harder, L. D., Johnson, S. D. 2008. Function and evolution of aggregated pollen in angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 169 (1): 59–78.
- Hartati. 2010. The Intergeneric crossing of *Phalaenopsis* sp. and *Vanda Tricolor*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 1(1): 26-30.
- Hartati, S., Budiyo, A., dan Cahyono, O. 2014. Peningkatan Ragam Genetik Anggrek *Dendrobium spp.* Melalui Hibridisasi Untuk Mendukung Perkembangan Anggrek di Indonesia. *Caraka Tani-Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian XXIX*(2): 101–105.
- Hartati, S., Darsana, L. 2015. Karakterisasi Anggrek Alam secara Morfologi dalam Rangka Pelestarian Plasma Nutfah. *J. Agron. Indonesia* 43 (2):133 - 139.
- Hartati, S. 2015. Analisis Keragaman Genetik Tetua dan hasil Persilangan Anggrek Hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.). Disertasi: Universitas Sebelas Maret.
- Hawkes. 1970. *Encyclopedia of cultivated orchids*. Faber and Faber limited, London. Hal.485.
- Hendaryono, D. P. S. dan A. Wijayani. 2000. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Henuhilli, V. 2007. Pewarisan Warna Bunga Pada Anggrek. Seminar Nasional MIPA. Yogyakarta 25 (Agustus).

- Hidayati, N. Z., Saptadi, D., Soetopo, L. 2016. Analisis Hubungan Kekerbatan 20 Spesies Anggrek Dendrobium Berdasarkan Karakter Morfologi. *Jurnal Produksi Tanaman* 4 (4): 291-297.
- Huh, Y., S., Lee, J., K., Nam, S., Y., Paek, K., Y., and Suh, G., U. 2016. Improvement of Asymbiotic Seed Germination and Seedling Development of *Cypripedium macranthos* Sw. With Organic Additives. *Journal of Plant Biotechnology*. 43(1): 138–145.
- Holt, S., D., Horova, P., Bures., J., Janecek., Cernoch, V. 2005. The trnL-F plastid DNA characters of three *Poa pratensis*. *Plant soil environment* 52(2): 94-99.
- Istiqomah, F., N., Tirta, I., M., Anggraeni, D. 2019. Discriminant Analysis for Cluster Validation in A Case Study of District Grouping in Jember Regency Based on Poverty. *Jurnal ILMU DASAR*. 20(2): 129-138.
- James, D., and Schmidt, A., M. 2004. Use of an intron region of a chloroplast tRNA gene (trnL) as a target for PCR identification of specific food crops including sources of potential allergens. *Food Research International* 37: 395-402.
- Julisaniah, N., I., Sulistyowati, L. dan Sugiharto, A., N. 2008. Analisis Kekerbatan Mentimun (*Cucumis sativus*) menggunakan metode RAPD PCR dan isozim. *Biodiversitas* 9(2): 99-102.
- Kaur, S., K., K. and Bhutani. 2012. Organic Growth Supplement Stimulants for In Vitro Multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Horti Science*, 39(1): 47-52.
- Kauth P., J., Vendrame W., A, Kane M., E. 2006. *In vitro* seed culture and seedlings development of *Calopogontuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 85: 91-102
- Kauth, P.J., Dutra, D., Johnson, T., R., Stewart, S., L., Kane, M., E., Vendrame, W. 2014. *Techniques and Applications of In Vitro Orchid Seed Germination*. Floriculture, ornamental and Plant Biotechnology Volume V. Global Science Books, UK.
- Kementan RI. (2014). Renstra Kementerian Pertanian Tahun 2015- 2019. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Kress, W., J., and Erickson, D., L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLoS ONE*. 2(6): 1-10.

- Kucera, B., Cohn, M, A., Metzger, G., L. 2005. Plant hormone interaction during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307.
- Kuria, P., Demo, P., Nyende, A.B., Kahangi, E.M. (2008). Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the in vitro micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology*. 7(3): 301- 307.
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., and Savolainen, V. 2008. DNA Barcoding The Floras of Biodiversity Hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(8): 2923–2928.
- Lee Y., I. Lu C., F, Chung M., C, Yeung E., C, Lee N. 2007. developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132: 246-252.
- Lee, Y., I., Hsu, S., Te, and Yeung, E., C. 2013. Orchid Protocorm-Like Bodies are Somatic Embryos. *American Journal of Botany*. 100(11): 2121–2131.
- Lestari, N., K., D. dan Deswiniyanti N., W. 2017. Kompatibilitas Persilangan Self dan Interspesifik Anggrek *Phalaenopsis pulcherrima* (lindl.) J.J. Smith. *Jurnal Media Sains* 1(1): 32-36.
- Lestari, D., A., Azrianingsih, R., dan Hendrian, H. 2018. Filogenetik Jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan Coding dan Non-coding sekuen DNA. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*. 3(1): 1-7.
- Liu T., H., A., Lin J., J, Wu R., Y. 2006. The effects of using Trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm like bodies. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 86: 125-129.
- Lin, C., F., Lay, H., L., Ni, C., L., Chen, C., C. 2013. Phenolic components of *Dendrobium antennatum*. *Chemistry of Natural compounds*. 49 (3): 520-522.
- Magyar, Z., De Veylder L, Atanassova A., Bako, L., Inze, D., Bogre, L. 2005. The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin dependent cell division. *Plant Cell* 17 (9): 2527-2541.
- Marwoto, B., Badriah, D., S., Dewanti, M., dan Sanjaya, L. 2012. Persilangan Interspesifik dan Intergenerik Anggrek *Phalaenopsis* Untuk Menghasilkan Hibrid Tipe Baru. *Prosiding Seminar Nasional Anggrek*. 101–116.
- Marshall, A., and Beehler, B. 2006. *The Ecology of Papua*. Jakarta: State Minister for Environment.



- Mbiyu, M., Pwaipwai, P., Muthoni, J., Kabira, J., Ngaruiya., J., Onditi,J., Muchira,C., Otieno, S. 2012.Comparing Liquid and Solid Media on the Growth of Plantlets from Three Kenyan Potato Cultivars. *American Journal of Experimental Agriculture*. 2(1): 81-89.
- Meier-Edens, R., Arduser M., Westhus, E., and Bernhardt, P. 2011. Pollination ecology of *Cypripedium reginae walter* (Orchidaceae): size matters. *Telopea*. 13(1-2): 327-340.
- Metwali, M., R., E., and Al-Magrhabi, O. 2012. Effectiveness of Tissue Culture Media Components on the Growth and Development of Cauliflower (*Brassica oleracea* var. Botrytis) Seedling Explants in vitro. *African Journal of Biotechnology*. 11(76): 14069–14076
- Mishiba K, Chin D., P., Mii M. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep*. 24: 297–303.
- Murai, N. 2014. Review: Plant Growth Hormone Cytokinins Control the Crop Seed Yield. *American Journal of Plant Sciences*. 5(14): 2178–2187.
- Musalamah dan Suyanto. 2007. Studi Pola Pewarisan Karakter Bentuk Daun Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) Prosiding: Inovasi Kacang-kacangan dan Umbi-umbian Mendukung Kemandirian Pangan dan Energi. 106-111.
- Netty, W. 2002. Optimasi Medium untuk Multiplikasi Tunas Kana (*Canna Hibryda* Hort) dengan Penambahan Sitokinin. *Biosains dan Bioteknologi Indonesia*. 2(1): 27-31.
- Novariant, H. 2008. Perakitan kelapa unggul melalui teknik molekuler dan impelementasinya terhadap peremajaan kelapa di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 1(4): 259-273.
- Nugroho, A. (2006). Mikropropagasi *Dendrobium* “Emma Pink” (Orchidaceae) pada Media Kultur In Vitro. *Bioteknologi*. 3(1): 27–33.
- Nugroho, Pratiwi, Wardoyo, Handani, Megawati, and Susandarini. 2016. Isolation of Bioactive Compounds from Two Orchid Species and Preliminary Test of Their Cytotoxicity Against T47D Breast Cancer Cells. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(1): 150-155.
- Ong, J., Y., and Torres, J., Z. 2019. Dissecting the mechanisms of cell division. *The journal of Biological chemistry* 294: 11382-11390.

- Pakum, W., Watthana, S., and Kongbangkerd, A. 2016. Influence of Medium Component on In Vitro Propagation of Thai's Endangered Orchid: *Bulbophyllum nipondhii* Seidenf. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 25(1): 37–46.
- Peter, C. I., Johnson, S. D. 2009. Autonomous self-pollination and pseudo-fruit set in South African species of *Eulophia* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany.* 75 (4): 791-797.
- Peyachoknagul, S., Mongkolsiriwatan, C., Wannapinpong, S., Huehne, P., S., & Srikulnath, K. 2014. Identification of Native *Dendrobium* Species in Thailand by PCR-RFLP of rDNA-ITS and Chloroplast DNA. *ScienceAsia:* 40(2): 113–120.
- Pierik, R. L. 1997. *In Vitro Culture of Higher Plant*. Bowton: Martinus Nijhoff Publisher.
- Poerba, Y., S. dan Martanti, D. 2008. Keragaman Genetik Berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA pada *Amorphopallus muelleri* Blume di Jawa. *Jurnal Biodiversity.* 9(4): 245-249.
- Prusch J., Schardt A., Schill, R. 2000. Adaptations of an orchid seed to water uptake and storage. *Plant Systematics and Evolution.* 220: 69-75
- Purwanto, A., Ambarwati, E., Setyaningsih, F. 2005. Kekerabatan Antar Anggrek Spesies Berdasarkan Sifat Morfologi Tanaman dan Bunga. *Ilmu pertanian.* 12(1): 1–11.
- Rahayu, S., E., dan Handayani. 2008. Keanekaragaman morfologi dan Anatomi pandanus (Pandaceae) di Jawa Barat. *Vis Vitalis.* 1(2): 29-44.
- Rianawati, S. 2017. Ragam Anggrek *Dendrobium* Indonesia yang Berpotensi Sebagai Induk Persilangan Komersial. *Iptek Hortikultura* 13: 27–32.
- Sabilu, Y., Indrawati, dan Hariani. 2017. Karakterisasi morfologi anggrek alam (orchidaceae) asal taman nasional rawa aopa watumohai (tnraw) koleksi kebun raya universitas halu oleo. *Biowallacea* 4(2): 645-654.
- Sailo, N., Rai, D., and De, C. 2014. Physiology of temperate and tropical orchids an overview. *International journal of scientific research.* 3(12): 1-8.
- Santos, C., and Pereira, F. 2017. Design and Evaluation of PCR Primers for Amplification of Four Chloroplast DNA Regions in Plants. *Conservation Genetics Resources.* 9(1): 9–12.

- Sarmah, D., Kolukunde, S., Sutradhar, M., Singh, B., K., Mandal, T., and Mandal, N. 2017. A Review on: In Vitro Cloning of Orchids. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(8): 1909–1927.
- Sauer, M., Robert, S., and Kleine-Vehn, J. 2013. Auxin: Simply Complicated. *Journal of Experimental Botany*. 64(9): 2565–2577.
- Serliana, R. 2017. Pertumbuhan Anggrek Hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl.) secara *In Vitro* Dengan Penambahan Ekstrak Tomat (*Solanum lycopersicum* L) dan Benzyl Amino Purine (BAP). *Protobiont*. 6(3): 310–315.
- Setiari, N., Purwantoro, A., Moeljopawiro, S., & Semiarti, E. 2018. Micropropagation of *Dendrobium phalaenopsis* Orchid Through Overexpression of Embryo Gene AtRKD4. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*. 40(2): 284–294.
- Setyawati, A., S., Kartikaningrum, S., Nurmalinda, Hayati, N., Q. 2012. Penyusunan Ideotipe anggrek *Dendrobium*, *Phalaenopsis* dan *Vanda*. Balai Penelitian Tanaman Hias. *Prosiding Seminar Nasional Anggrek*.
- Shekarriz, P. 2017. Coconut Water and Peptone Improve Seed Germination and Protocorm Like Body Formation of Hybrid *Phalaenopsis*. *Agriculture Science Development*. 3(10): 317-322.
- Shutar, R., K, Habibi, N, Purohit, S., D. 2011. Influence of agar concentration and liquid medium on in vitro propagation of *Boswellia serrata*. *Indian Journal of Biotechnology*. 10: 224-227.
- Sinta, M., M., Riyadi, I., dan Sumaryono. 2014. Identifikasi dan Pencegahan Kontaminasi pada Kultur Cair Sistem Perendaman Sesaat. *Menara Perkebunan*. 82(2): 64–69.
- Sivanaswari, Chalaparmal, Thohirah, L.,A., Fadelah, A., A., Abdullah, N. A. P. 2011. Hybridization of several *Aerides* Species and in vitro germination of its hybrid. *African Journal of Biotechnology*. 10(53): 10864-10870.
- Stewart S., L, Zettler L., W. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinqueseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany*. 72: 25-35.
- Stewart SL, Kane ME. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86:147-158.

- Sugiyarto, L., dan Umniyatie, S. 2016. Keanekaragaman Anggrek Alam dan Keberadaan Mikoriza Anggrek Di Dusun Turgo Pakem, Sleman Yogyakarta. *J. Sains Dasar*. 5(2): 71–80.
- Syafarudin, Randriani, E., Santoso, T., J. 2011. Efektivitas dan Efisiensi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA pada jambu mete. *Buletin RISTRI* 2(2): 151-160.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A. Willerslev, E. 2007. Power and Limitations of the Chloroplast trnL (UAA) Intron for Plant DNA Barcoding. *Nucleic Acids Research*. 35(3): 1-8.
- Tawaro, S., Suraninpong, P., and Chanprame, S. 2008. Germination and Regeneration of *Cymbidium findlaysonianum* Lindl. on a Medium Supplemented with Some Organic Sources. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 5(2): 125–135.
- Traas, J., Bohn-Courseau, I. 2005. Cell proliferation patterns at the shoot apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 587-592.
- Tsai, W., and Chu., C. 2008. Static Liquid Culture of *Doritaenopsis* Seedlings. *HORTSCIENCE* 43(1): 206–210.
- Tsai, C., Chiang, Y., Lin, Y., Liu, W. 2012. Plastid trnL intron polymorphisms among *Phalaenopsis* species used for identifying the plastid genome type of *Phalaenopsis* hybrid. *Scientia Horticulturae* 142: 84-91.
- Tuhuteru, S., Hehanussa, M., L., dan Raharjo, S., H., T. 2012. Pertumbuhan dan Perkembangan Anggrek *Dendrobium anosmum* Pada Media Kultur In Vitro dengan Beberapa Konsentrasi Air Kelapa. *Jurnal Ilmu Budidaya Tanaman*. 1(1): 1-12.
- Untari, R dan Puspaningtyas, D., M. 2006. The Effect of Some Organic Compounds and NAA application on the in vitro Growth of the Black Orchid (*Coelogyne pandurata* Lindl.). *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*. 7(4): 344–348.
- Wang, Y., Liu, C., Li, K., Sun, F., Hu, H., Li, X., Zhao, Y., Han, C., Zhang, W., Duan, Y., Liu, M. 2007. Arabidopsis EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Mol. Biol.* 64(6): 633-644.
- Widayati, A., W. 2011. Profil DNA anggrek hibrida (*Vanda tricolor* Lindl X *Vanda limbata* blume) Pada daerah Intergenerik trnL-F DNA Kloroplas. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Widiastoety, D., Solvia, N., dan Soedarjo, M. 2010. Potensi anggrek *Dendrobium* dalam Meningkatkan Varietas dan Kualitas Anggrek Bunga Potong. *Jurnal Litbang Pertanian*. 29(3):101–106.

- Widiastoety, D. dan Nurmalinda. 2010. Pengaruh Suplemen Nonsintetik terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek Vanda. *Hortikultura*. 20(1): 60-66.
- Winkle, S., C and Pullman, G., S. 2005. Achieving desired plant growth regulator levels in liquid plant tissue culture media that include activated carbon. *Plant cell reports* 24(4): 201-208.
- Wise, R., R. 2006. *The Diversity of Plastid Form and Function*. Springer. Printed in Netherland. 3-21.
- Yam, T. W., and Arditti, J. 2009. History of Orchid Propagation: A Mirror of the History of Biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*. 3(1): 1–56.
- Yulita, K., S. 2007. Structural Mutation of trnL intron (UAA) in Dipterocarpaceae. *Berita Biologi*. 8(6): 433-444.
- Yu, H and Goh, C., J. 2001. Molecular Genetics of Reproductive Biology in Orchids. *Plant Physiology* 127: 1390–1393
- Zulfahmi. 2013. Penanda DNA untuk Analisis Genetik Tanaman. *J Agroteknologi*. 3(2): 41–52.
- Zulkhaidah, Muslimin, Alam, A., S., dan Toknok, B. 2010. Peningkatan Mutu Tanaman Hias Anggrek Alam Phalaenopsis Melalui Kegiatan Persilangan. *Abditani: Jurnal Pengabdian Masyarakat*. (1): 68–71.

No	Bagian Tanaman	Deskriptor	Skor Karakter								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	umum	Ukuran tanaman	Sangat kecil		kecil		sedang		Besar		
2		Bentuk pertumbuhan	Monopodial memanjat	Monopodial herba	simpodial						
3		Penampang melintang daun	pensil	Bilateraly compressed	plikata	Kondu plikata					
4		Bibir: tipe kalus	lamellata	Kompleks	sederhana						
5		Spur	Tidak ada								
6		Jumlah polinia	dua	empat	delapan						
7		Posisi pembungaan	dasar	samping	ujung						
8	Pseudo bulb	ketegakan	tegak		Semi tegak		horizontal		Semi menggantung		menggantung
9		Panjang	Sangat pendek		pendek		sedang		panjang		
10		Ukuran	Sangat kecil		kecil		sedang		Besar		
11		Ketebalan	Sangat tipis		Tipis		sedang		Tebal		
12		Penampang membujur	Berbentuk pita	Berbentuk lanset	lonjong	Bujur telur	bulat	Bulat telur			
13		Penampang melintang	Bujur telur	bulat	menyudut						
14	daun	Panjang			pendek		sedang		Panjang		
15		Lebar			Sempit		sedang		lebar		
16		Bentuk	Berbentuk pita	Berbentuk lanset	Berbentuk lanset sungsang	lonjong	Berbentuk sendok	Bulat telur	Bulat telur sungsang	jorong	Berbentuk jantung
17		Bentuk ujung	lancip	meruncing	Berujung runcing	tumpul	Bentuk pepat	romping	Ujung membelah		
18		Simetri ujung	Asimetris	Simetris							
19		Tekstur permukaan	gundul	merona	memisai	mengewol	menempung	berbingkahan	berkeriput	Berpapil	
20		susunan	Tergulung bersama	Rangkap							

21	Bunga	Tipe pembungaan	Berbunga tunggal	Perbungaan terbatas	Berpaku-paku	Tandan	Malai	Bertukal	Payung			
22		Ketegakan tangkai bunga	Tegak		Semi tegak		horizontal		Semi menggantung			
23		Diameter tangkai bunga			kecil		sedang		Besar			
24		Panjang tangkai bunga			pendek		sedang		Panjang			
25		Panjang rachis			pendek		sedang		Panjang			
26		Penampakan sepal dan petal	Berlekuk ke dalam	membentang	Berlekuk keluar							
27		Aroma bunga	Tidak ada	ada								
28		Jumlah kuntum bunga			sedikit		sedang		Banyak			
29		Lebar bunga			sempit		sedang		Lebar			
30		Panjang bunga			pendek		sedang		Panjang			
31		Susunan petal	terbuka	bersentuhan	Saling menumpang							
32		Resupinasi	Tidak ada	ada								
33		Arah menghadap bunga	Satu arah	Dua arah	Segala arah							
34		Panjang ovary			pendek		sedang		panjang			
35		Panjang braktea			pendek		sedang		panjang			
36		Bentuk braktea	V	U								
37		Sepal	Bentuk sepal	Berbentuk pita	Bulat telur	jong	Bulat telur sungsang	bulat	Berbentuk lanset	Lonjong		
38			Panjang			pendek		sedang		panjang		
39			Lebar			sempit		sedang		lebar		
40			Bentuk ujung	lancip	Meruncing dengan sisi yang tajam	Berujung suntih dangkal	tumpul	Bentuk pepat				
41			Penampang melintang	cekung	datar	cembung						
42			Corak warna	merata	bercorak	bertepi	bergaris	berjaring	berbintik	Bercorak dan bergaris	Bergaris dan	Bertepi dan bergarias

										berbintik	
43	Petal	Corak warna	merata	bercorak	bertepi	bergaris	berjaring	berbintik	Bercorak dan bergaris	Bergaris dan berbintik	Bertepi dan bergarias
44		Bentuk petal	Berbentuk pita	Bulat telur	jorong	Bulat telur sungsang	Berbentuk belah ketupat	Semi-bulat	Berbentuk sendok		
45		Panjang petal			pendek		sedang		Panjang		
46		Lebar petal			sempit		sedang		lebar		
47		Bentuk ujung petal	lancip	meruncing	Berujung suntih dangkal	tumpul	Bentuk padat				
48		Penampang melintang	cembung	datar	cekung						
49		Perpuntiran			lemah		sedang		kuat		
50		Jumlah warna	satu	dua	tiga	Lebih dari tiga					
51		Corak warna	merata	bercorak	bertepi	bergaris	berjaring	berbintik	Bercorak dan bergaris	Bergaris dan berbintik	Bertepi dan bergarias
52		Labellum	Panjang			Pendek		Sedang	Panjang		
53	Lebar				Sempit		sedang	lebar			
54	Untuk Dendrobium		jorong	membulat	Jorong melintang						
55	Untuk Dendrobium		segitiga	Bulat telur	Trapezium menyempit	Trapezium melebar					
56	Untuk Dendrobium		Berbentuk ginjal	Belah ketupat	Jorong melintang	Jorong					
57	Corak keping tengah		merata	bercorak	bertepi	bergaris	berjala	berbintik	Bercorak dan bergaris	Bergaris dan berbintik	Bertepi dan bergarias
58	Labellum		Corak keping sisi	merata	bercorak	bertepi	bergaris	berjala	berbintik	Bercorak dan bergaris	Bergaris dan berbintik
59		Ada tidaknya kalus	Tidak ada								
60		Letak lekuk				pangkal		tengah		ujung	
61	Akar	Tipe akar	Akar udara	Akar tanah							



62	Buah	Tipe	kapsul	berry						
63		Diameter			sempit		sedang		lebar	
64		Panjang			sempit		sedang		panjang	



No	Bagian Tanaman	Deskriptor	Skor Karakter								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	umum	Ukuran tanaman					sedang				
2		Bentuk pertumbuhan			simpodial						
3		Penampang melintang daun		Bilaterally compressed							
4		Bibir: tipe kalus	lamellata								
5		Spur	Tidak ada								
6		Jumlah polinia		empat							
7		Posisi pembungaan		samping							
8	Pseudo bulb	ketegakan			Semi tegak						
9		Panjang			pendek						
10		Ukuran			kecil						
11		Ketebalan			Tipis						
12		Penampang membujur		Berbentuk lanset							
13		Penampang melintang		bulat							
14	daun	Panjang				sedang					
15		Lebar			Sempit						
16		Bentuk					Bulat telur				
17		Bentuk ujung		meruncing							
18		Simetri ujung		Asimetris							
19		Tekstur permukaan	gundul								
20		susunan		Rangkap							
21	Bunga	Tipe pembungaan				Tandan					
22		Ketegakan tangkai bunga			Semi tegak						
23		Diameter tangkai bunga			Kecil						

24		Panjang tangkai bunga					sedang				
25		Panjang rachis					sedang				
26		Penampakan sepal dan petal		membentang							
27		Aroma bunga	Tidak ada								
28		Jumlah kuntum bunga					sedang				
29		Lebar bunga			Sempit						
30		Panjang bunga							Panjang		
31		Susunan petal	terbuka								
32		Resupinasi		Ada							
33		Arah menghadap bunga			Segala arah						
34		Panjang ovary					sedang				
35		Panjang braktea					sedang				
36		Bentuk braktea	V								
37	Sepal	Bentuk sepal		Bulat telur							
38		Panjang							panjang		
39		Lebar			Sempit						
40		Bentuk ujung	lancip								
41		Penampang melintang		Datar							
42		Corak warna	merata								
43	Petal	Corak warna	merata								
44		Bentuk petal	Berbentuk pita								
45		Panjang petal								Panjang	
46		Lebar petal			Sempit						
47		Bentuk ujung petal	lancip								
48		Penampang melintang		Datar							
49		Perpuntiran			Lemah						
50		Jumlah warna		Dua							

51		Corak warna	merata							
52	Labellum	Panjang			Pendek					
53		Lebar			Sempit					
54		Untuk Dendrobium (bentuk bibir)	jorong							
55		Untuk Dendrobium (bentuk keping sisi)				Trapezium melebar				
56		Untuk Dendrobium (bentuk keping tengah)		Belah ketupat						
57		Corak keping tengah						Bercorak dan bergaris		
58		Corak keping sisi	merata							
59		Ada tidaknya kalus	Tidak ada							
60		Letak lekuk					tengah			
61		Tipe akar	Akar udara							
62	Buah	Tipe	kapsul							
63		Diameter			sempit					
64		Panjang					sedang			

No	Bagian Tanaman	Deskriptor	Skor Karakter								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	umum	Ukuran tanaman					sedang				
2		Bentuk pertumbuhan			simpodial						
3		Penampang melintang daun		Bilateraly compressed							
4		Bibir: tipe kalus	lamellata								
5		Spur	Tidak ada								
6		Jumlah polinia		empat							
7		Posisi pembungaan		samping							
8	Pseudo bulb	ketegakan			Semi tegak						
9		Panjang			sedang						
10		Ukuran			sedang						
11		Ketebalan			sedang						
12		Penampang membujur					Bulat telur				
13		Penampang melintang		bulat							
14	daun	Panjang						panjang			
15		Lebar				sedang					
16		Bentuk							jong		
17		Bentuk ujung					Bentuk pepat				
18		Simetri ujung		Simetris							
19		Tekstur permukaan					Berbingkahan				
20		susunan		Rangkap							
21	Bunga	Tipe pembungaan				Tandan					
22		Ketegakan tangkai bunga			Semi tegak						
23		Diameter					sedang				



50		Jumlah warna		Dua							
51		Corak warna		bercorak							
52	Labellum	Panjang				Sedang					
53		Lebar						lebar			
54		Untuk Dendrobium (bentuk bibir)		membulat							
55		Untuk Dendrobium (bentuk keping sisi)				Trapezium melebar					
56		Untuk Dendrobium (bentuk keping tengah)		Belah ketupat							
57		Corak keping tengah				Bergaris					
58		Corak keping sisi	merata								
59		Ada tidaknya kalus	Tidak ada								
60			Letak lekuk						ujung		
61		Akar	Tipe akar	Akar udara							
62	buah	Tipe	kapsul								
63		Diameter				sedang					
64		Panjang					sedang				

## Lampiran 3. Bagan Kultur *in-vitro* dan Peta Kontaminasi

Tahap 1. Tebar Biji  
(3 bulan)

Tebar Biji (10 botol kultur)



Tahap 2. Pembesaran  
(1 bulan)

Pembesaran

1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10		6	7	8	9	10
11	12	13	14	15		11	12	13	14	15
16	17	18	19	20		17	17	18	19	20
21	22	23	24	25		21	22	23	24	25

Media padat

Media cair

Peta kontaminasi

1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10		6	7	8	9	10
11	12	13	14	15		11	12	13	14	15
16	17	18	19	20		16	17	18	19	20
21	22	23	24	25		21	22	23	24	25

Media padat

Media cair

Keterangan: ■ = kontaminasi media, ■ = satuan percobaan yang digunakan untuk pengukuran berat protokorm, ■ = satuan percobaan yang digunakan untuk regenerasi planlet.

Media padat : 8 botol kultur (@100 protokorm) = 800 protokorm

Media cair : 6 botol kultur (@100 protokorm) = 600 protokorm

Media padat : 8 botol kultur yang berisi 800 protokorm disubkultur dalam media regenerasi dengan tiap botol berisi 20 protokorm. Total terdapat 40 botol kultur.



Media cair : 6 botol kultur yang berisi 600 protokorm disubkultur dalam media regenerasi dengan tiap botol berisi 20 protokorm. Total terdapat 30 botol kultur.

Tahap 3. Regenerasi Planlet  
(5 bulan)

Regenerasi Planlet



1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6
6	7	8	9	10	7	8	9	10	11	12
11	12	13	14	15	13	14	15	16	17	18
16	17	18	19	20	19	20	21	22	23	24
21	22	23	24	25	25	26	27	28	29	30
26	27	28	29	30						
31	32	33	34	35						
36	37	38	39	40						

Media Padat

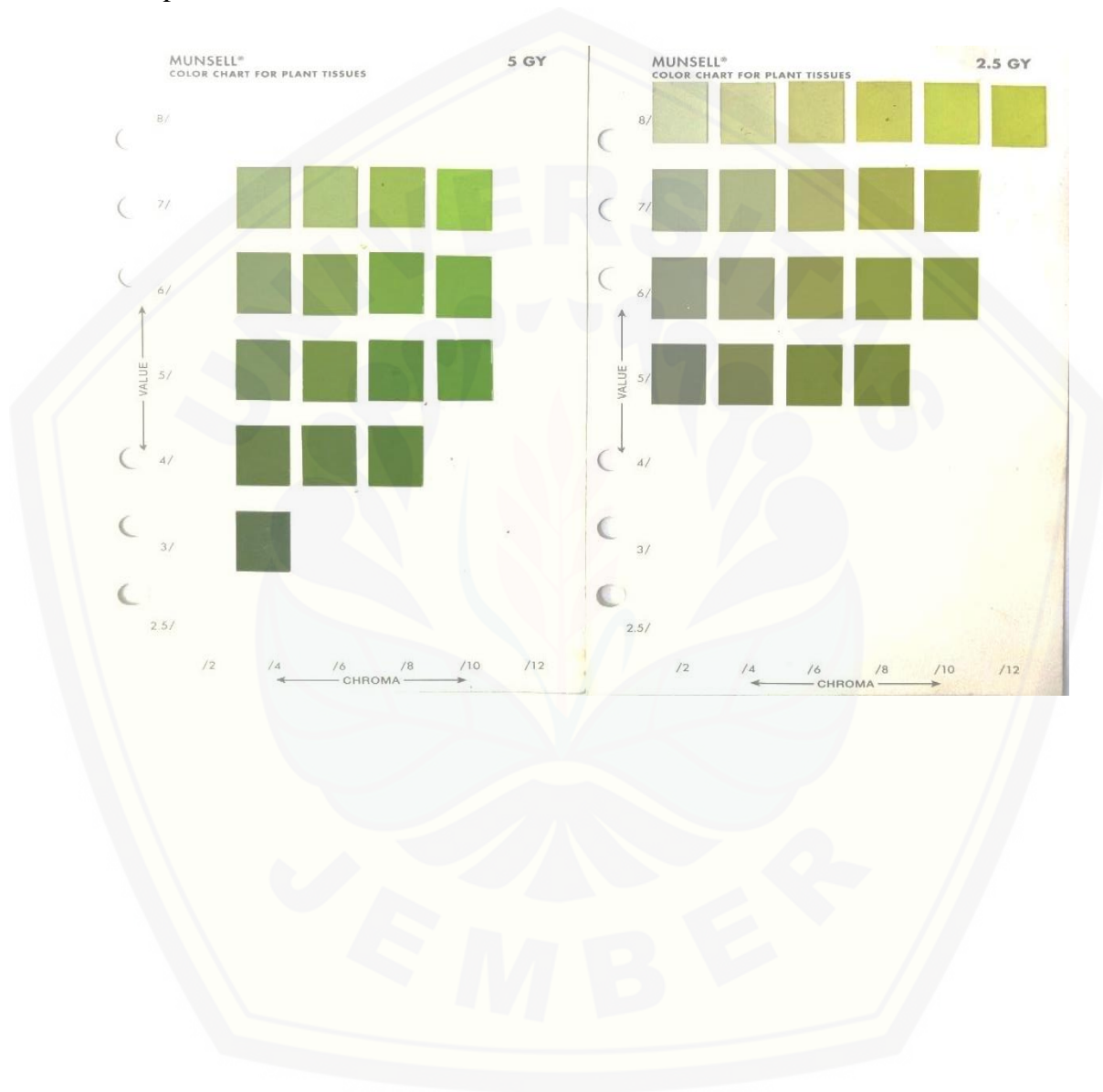
Media Cair

Peta Kontaminasi

1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6
6	7	8	9	10	7	8	9	10	11	12
11	12	13	14	15	13	14	15	16	17	18
16	17	18	19	20	19	20	21	22	23	24
21	22	23	24	25	25	26	27	28	29	30
26	27	28	29	30						
31	32	33	34	35						
36	37	38	39	40						

Keterangan: ■ = kontaminasi media, ■ = satuan percobaan yang digunakan untuk bahan analisis molekuler, ■ = satuan percobaan yang digunakan untuk aklimatisasi.

Lampiran 4. *Munsell color chart*



## Lampiran 5. Contoh analisis data penelitian

### Parameter Pengamatan Aklimatisasi

#### AKLIMATISASI EKSPAN MEDIA PADAT

ULANGAN KE	RATA-RATA					
	jml. Daun	jml. Akar	pg. Daun	pg. Akar	tinggi planlet	berat segar
1	8.65	10.6	2.38	3.45	3.79	0.63
2	8.05	8.6	2.2	2.81	3.47	0.42
3	7.8	8.9	2.31	2.93	3.265	0.389
4	8.7	11.55	2.17	2.95	3.465	0.4405
5	7.4	8.85	2.1	2.285	2.75	0.3485
6	8.5	9.4	2.095	2.425	2.835	0.3295
7	8.1	8.65	1.855	2.11	2.895	0.28
8	9.2	9.35	2.17	2.27	3.32	0.29
9	9.95	10.1	2.225	2.75	3.415	0.378
RATA-RATA	8.48	9.56	2.17	2.66	3.25	0.39
Sd	0.77	1.01	0.15	0.43	0.35	0.11

#### AKLIMATISASI EKSPAN MEDIA CAIR

ULANGAN KE	RATA-RATA					
	jml. Daun	jml. Akar	pg. Daun	pg. Akar	tinggi planlet	berat segar
1	9.05	12.05	1.89	3.80	3.61	0.56
2	10.35	12.85	2.56	4.285	4.025	0.65
3	9.05	10.15	2.345	2.585	3.715	0.528
4	7.3	8.95	2.55	3.435	3.965	0.3955
5	9.65	10.7	3.145	3.76	4.6	0.557
6	8.75	8.45	2.54	3.59	3.99	0.444
7	9.4	8.85	1.93	2.975	3.365	0.4105
8	9.7	10.85	2.98	3.89	4.44	0.5585
9	9.15	7.5	2.525	3.35	3.745	0.405
RATA-RATA	9.16	10.04	2.50	3.52	3.94	0.50
Sd	0.84	1.75	0.41	0.51	0.39	0.09

Variabel Pengamatan : Jumlah Daun

Uji F

Padat		Cair	
ULANGAN KE	jml. Daun	ULANGAN KE	jml. Daun
1	8.65	1	10.6
2	8.05	2	8.6
3	7.8	3	8.9
4	8.7	4	11.55
5	7.4	5	8.85
6	8.5	6	9.4
7	8.1	7	8.65
8	9.2	8	9.35
9	9.95	9	10.1
RATA-RATA	8.48	RATA-RATA	9.56
Sd	0.77	Sd	1.01
VARIANS	0.589375		1.011528
F HITUNG	1.716271945		
F TABEL	3.438101233		
F HITUNG < F TABEL			
VARIANS HOMOGEN			

H0 = jumlah daun eksplan media padat sama dengan jumlah eksplan media cair (tidak berbeda)

H1 = jumlah daun eksplan media padat tidak sama dengan jumlah eksplan media cair (terdapat perbedaan)

Uji T

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	8.65	10.6
Mean	8.4625	9.425
Variance	0.669107143	0.980714286
Observations	8	8
Pooled Variance	0.824910714	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	14	
t Stat	2.119469941	
P(T<=t) one-tail	0.026204168	
t Critical one-tail	1.761310115	
P(T<=t) two-tail	0.052408337	
t Critical two-tail	2.144786681	

T stat (T hitung) < T Critical two-tail (T tabel)

H0 diterima

H0 = jumlah daun eksplan media padat sama dengan jumlah eksplan media cair (tidak berbeda)

H1 = jumlah daun eksplan media padat tidak sama dengan jumlah eksplan media cair (terdapat perbedaan)

Kesimpulan:

Terima H0, tolak H1

jumlah daun tidak berbeda nyata

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian



Karakterisasi Morfologi



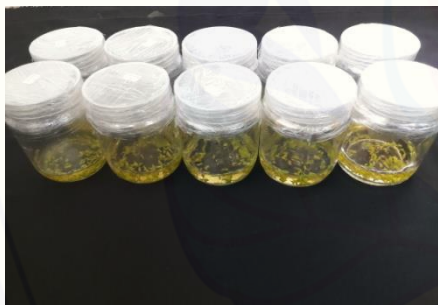
Sterilisasi Peralatan dan Media



Media Tebar Biji



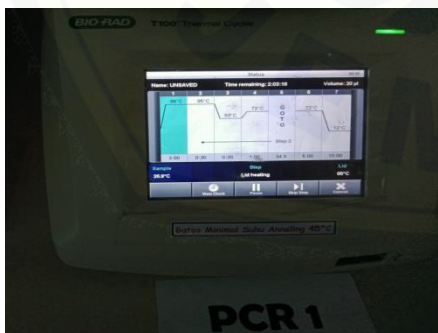
Inokulasi pada media cair



Kultur cair protokorm angrek hibrida



Penimbangan berat basah-kering



Analisis PCR



Produksi planlet angrek hibrida