

Optimasi Isolasi Protoplas Mesofil Daun Anggrek *Paraphalaenopsis laycockii*

EDY SETITI WIDA UTAMI *) DAN SUCIPTO HARIYANTO

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga
Kampus C UNAIR, Mulyorejo, Surabaya. 60115

*) Email : edysetiti@yahoo.com

ABSTRACTS

Optimalization protoplast isolation of the leaves mesophyll orchid *Paraphalaenopsis laycockii*. The objectives of the research was to investigate the effect of combination treatment of sucrose concentrations and incubation time on protoplast isolation of the leaves mesophyll orchid of *Paraphalaenopsis laycockii*. The factorial experiment consisted of two factors that was arranged by completely randomized design (CRD) with ten replications. The first factor was concentrations of sucrose which consists of three levels namely 0.4 M, 0.5 M and 0.6 M. The second factor was incubation time which consists of four levels namely 2 hours, 4 hours, 6 hours and 8 hours. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. The results showed that there was effect of treatment for all variables observed. The highest protoplast density and number of viable protoplasts achieved in the combined treatment of 0.6 M sucrose and 4 hours of incubation time.

Keywords: protoplast isolation, leaves mesophyll, Paraphalaenopsis laycockii

PENDAHULUAN

Anggrek komersial yang dikembangkan saat ini pada umumnya merupakan tanaman hibrida hasil persilangan konvensional (Nurmalinda *et al.*, 2011). Hibrida anggrek memiliki warna bunga dan pola warna yang bervariasi yang sangat penting untuk industri bunga potong. Meskipun telah sukses menghasilkan anggrek hibrida interspesifik, namun aplikasi teknik hibridisasi konvensional untuk menghasilkan hibrida anggrek intergenerik masih sulit. Hibridisasi somatik melalui fusi protoplas memungkinkan dihasilkannya anggrek hibrida intergenerik yang secara seksual tidak kompatibel (Davey *et al.*, 2005). Peningkatan kualitas anggrek yang diperoleh melalui fusi protoplas sangat

penting dalam program pemuliaan untuk mengembangkan kultivar baru (Trigiano and Gray, 2000).

Untuk mendapatkan protoplas sebagai bahan fusi diperlukan protokol yang efisien pada isolasi protoplas (Kanchanapoom *et al.*, 2001). Keberhasilan isolasi protoplas dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor dimaksud adalah umur dan jenis eksplan, komposisi dan konsentrasi enzim, waktu inkubasi eksplan dalam larutan enzim, jenis dan konsentrasi osmotikum (Rao *et al.*, 1995). Zat yang digunakan sebagai osmotikum pada saat isolasi protoplas adalah sorbitol, manitol, glukosa dan sukrosa (Bhojwani and Razdan, 1983). Khentry *et al* (2006) melaporkan bahwa manitol 0,3 M adalah paling efektif sebagai osmotikum

untuk isolasi protoplas daun anggrek *Dendrobium Sonia "Bom 17"*, namun Thomas (2009) menyatakan bahwa manitol 0,6 M adalah osmotikum terbaik untuk isolasi protoplas mesofil daun *Tylophora indica* (Burm. f.). Puspitasari *et al* (2006), melaporkan bahwa sorbitol 25 g/L adalah paling efektif sebagai osmotikum untuk isolasi protoplas mesofil daun *Centella asiatica* (L.). Waktu inkubasi yang diperlukan untuk melisis dinding sel bervariasi. Khentry *et al* (2006) melaporkan waktu inkubasi 5 jam dalam larutan enzim adalah paling tepat untuk isolasi protoplas daun anggrek *Dendrobium Sonia "Bom 17"*. Hong *et al* (2012) melaporkan bahwa perendaman 3 jam merupakan waktu inkubasi yang tepat untuk melisis dinding sel mesofil daun *Brachypodium distachyon*. Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa jenis dan konsentrasi osmotikum yang digunakan dan perlakuan selama proses isolasi seperti waktu inkubasi dalam larutan enzim untuk setiap jenis tanaman yang dipakai adalah berbeda.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protoplas dari mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii* dengan menggunakan kombinasi enzim Cellulase 'Onozuka'R-10 dan Macerozyme R-10 (Phyto Technology Laboratories, U.S) dengan perlakuan konsentrasi osmotikum sukrose dan waktu inkubasi yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Fakultas Sains dan Teknologi dan Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga, Surabaya.

Pada penelitian ini menggunakan *seedling* anggrek *Paraphalaenopsis laycockii* berumur 8 bulan hasil kultur *in vitro* biji yang diperoleh dari "Simanis Orchid" Lawang, Jawa Timur. Sebagai sumber eksplan adalah daun yang terletak pada urutan ke-2 dan ke-3 dari pucuk, dan sebagai eksplan adalah mesofil daun. Untuk isolasi protoplas dipakai enzim Cellulase 'Onozuka'R-10 dan Macerozyme R-10 (Phyto Technology Laboratories, U.S).

Pembuatan larutan enzim: Sukrose sebanyak 0,4 M; 0,5 M dan 0,6 M masing-masing dimasukkan ke dalam tabung vial yang telah berisi 10 mL enzim Cellulase 0,5% + Macerozyme 0,1% ditambah $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1470 mg dan dilarutkan. pH larutan enzim diatur sehingga menjadi 5,6-5,8.

Pembuatan larutan pencuci: Menimbang sukrose 0,4 M; 0,5 M; 0,6 M dan 1470 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ masing masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL akuades dan dilarutkan. pH larutan enzim diatur sehingga menjadi 5,6-5,8.

Pembuatan larutan pemurni: Menimbang sukrose 0,4 M; 0,5 M; 0,6 M masing masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL akuades dan dilarutkan. pH larutan enzim diatur sehingga menjadi 5,6-5,8.

Pembuatan larutan pewarna: Larutan stok Fluorescein diacetate (FDA) dibuat dengan melarutkan 5 mg FDA dalam 1 mL aseton. Mengambil larutan stok FDA sebanyak 0,1 mL dan dicampur dengan 10 mL larutan pemurni dan selanjutnya digunakan sebagai larutan pewarna untuk menguji viabilitas protoplas (Babaoglu, 2000).

Isolasi protoplas: Daun dari *seedling* anggrek *Paraphalaenopsis laycockii* ditimbang 1 gram dan diulang 12 kali. Lapisan epidermis atas dan bawah daun disayat menggunakan silet. Mesofil daun kemudian dipotong melintang dengan lebar (± 1 mm) dengan bantuan *blade* diatas *petridish* dan digunakan sebagai eksplan. Eksplan sebanyak 1 gram masing-masing dimasukkan ke dalam tabung vial yang telah berisi larutan enzim. Tabung vial ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 8 jam. Setelah inkubasi suspensi protoplas disaring dengan menggunakan nilon filter. Protoplas yang mengapung diambil dengan menggunakan mikropopet dan dimasukkan ke dalam botol vial yang berisi larutan pencuci. Protoplas selanjutnya dimurnikan dengan mengambil protoplas yang terapung pada permukaan larutan pencuci dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke

dalam larutan pemurni (Khentry *et al.*, 2006). Protoplas diambil menggunakan mikropipet, diataruh di atas *haemocytometer* dan ditutup dengan gelas penutup. Sebagai parameter dihitung densitas protoplas dan jumlah protoplas viabel di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 10×10 (Tee *et al.*, 2010). Densitas protoplas adalah jumlah total dari protoplas viabel dan protoplas non viabel per mL larutan. Protoplas non viabel memiliki bentuk yang tidak bulat dan tampak berwarna merah ketika diamati dengan menggunakan mikroskop fluorescein (Gambar 2.A1 dan 2.B1). Protoplas dinyatakan viabel jika protoplas tampak bulat sempurna dan ber fluorescein kuning kehijauan ketika diamati dengan menggunakan mikroskop fluorescein (Gambar 2.A2 dan 2. B2). Densitas protoplas ditentukan dengan menggunakan persamaan menurut (Marienfield laboratory glassware, 2010):

$$S = \frac{\bar{x}}{L \times t \times P} \times 10^3$$

Keterangan:

S = jumlah protoplas

\bar{x} = rata-rata jumlah protoplas dari bilik yang diamati

L = 1 mm^2 (luas *haemocytometer* $1 \text{ mm}^2/25$ bilik hitung $\times 25$ bilik yang dihitung)

t = 0,1 mm (tinggi *haemocytometer*)

P = pengenceran

10^3 = konstanta perubahan dari mm^3 menjadi mL

Rancangan penelitian dan analisis data

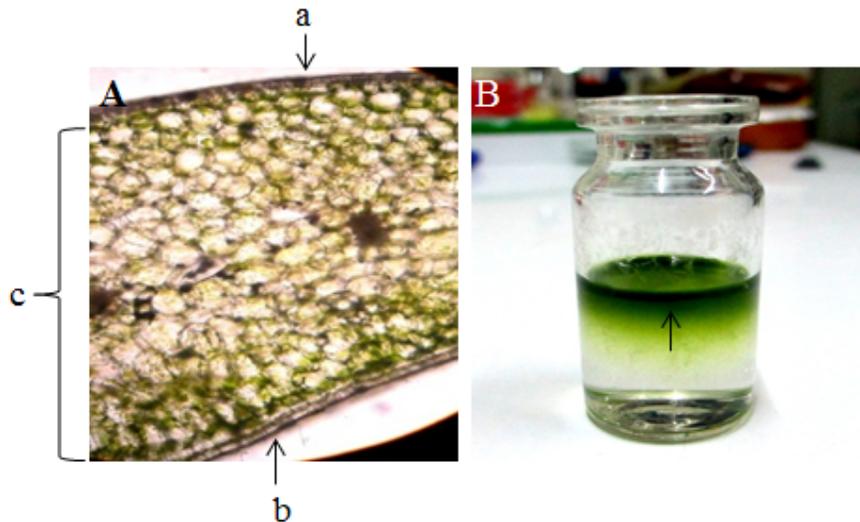
Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial. Faktor 1 adalah konsentrasi sukrose yang terdiri atas 3 aras yaitu 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M dan faktor 2 adalah waktu inkubasi dengan variasi lama

waktu 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 8 jam. Data hasil isolasi dianalisis dengan analisis Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney ($p < 0,05$). Analisis statistik dilakukan dengan komputer menggunakan program SPSS 17.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan terhadap irisan melintang daun *Paraphalaenopsis laycockii* yang dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan preparat segar yang disajikan pada Gambar 1A tampak jaringan mesofil tersusun sel-sel berbentuk poligonal dan ruang antar sel. Sel-sel penyusun mesofil tampak masih lengkap dengan dinding selnya. Dinding sel tampak jelas dan mempunyai warna lebih gelap dibanding isi sel. Bentuk sel yang poligonal dengan ruang antar sel akan memudahkan masuknya larutan enzim kedalam jaringan mesofil daun diikuti pelisisian dinding sel menjadi lebih mudah, sehingga mesofil daun banyak digunakan sebagai sumber protoplas. Kanchanapoom *et al.* (2001), Tee *et al.*

(2010), Khentry *et al.* (2006) dan Pindel (2007) juga menggunakan mesofil daun *Dendrobium pompadour*, *Dendrobium crumenatum*, *Dendrobium "Sonia Bom 17"* dan *Cymbidium* sebagai sumber protoplas. Demikian pula Thomas (2009) berhasil meregenerasikan protoplas mesofil daun *Tylophora indica* (Burm. f.) membentuk plantlet. Sonntag *et al* (2009) menggunakan mesofil daun sebagai sumber protoplas untuk fusi protoplas *Lupinus angustifolius* dan *Lupinus subcarnosus* dan Young Hong *et al.* (2012) mengisolasi protoplas dari mesofil daun *Brachypodium distachyon* sebagai bahan untuk transient gene expression sedangkan Khatri *et al* (2010) juga menggunakan mesofil daun *Musa sp* sebagai sumber protoplas.



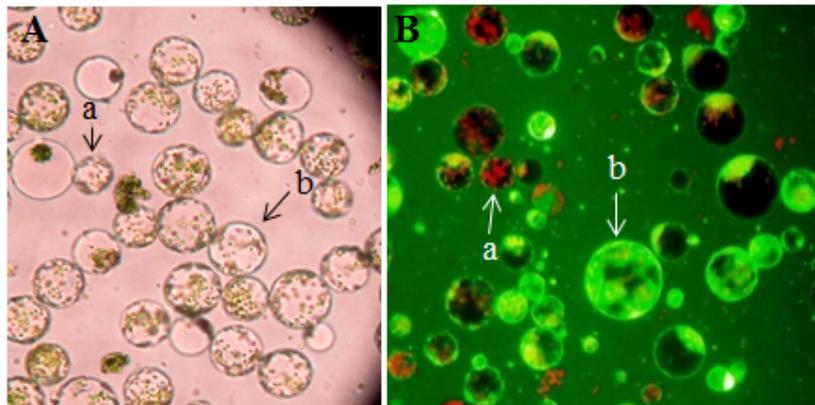
Gambar 1. A. Irisan melintang daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii*. a. epidermis atas, b. epidermis bawah, c. Jaringan mesofil sebelum diisolasi, tampak sel-sel mesofil berbentuk poligonal; B. Protoplas hasil isolasi. Tanda panah menunjukkan protoplas yang mengapung dipermukaan larutan pemurni yang mengandung osmotikum sukrosa.

Hasil pengamatan secara visual terhadap potongan mesofil daun setelah direndam dalam larutan enzim dengan kombinasi enzim Cellulase 0,5% dan

Macerozym 0,1% selama 2, 4, 6, dan 8 jam pada berbagai konsentrasi sukrose tampak butiran-butiran protoplas melayang-layang di bagian permukaan atas larutan enzim sebagai

lapisan yang nampak hijau gelap dibanding larutan enzim (Gambar 1B.). Hal ini didukung pada pengamatan mikroskopis terhadap protoplas hasil isolasi, protoplas tampak bulat berbentuk seperti bola (Gambar 2.Ab dan 2.Bb). Bentuk protoplas yang menyerupai bola menunjukkan bahwa dinding sel sudah tidak ada lagi. Pengamatan terhadap protoplas nampak protoplas dilindungi membran plasma yang tipis, berbentuk cincin dan tampak organela-

organela di dalam sitoplasma protoplas. Kenampakan membran plasma yang tipis, transparan dan berbentuk cincin mengindikasikan bahwa sel-sel tersebut telah kehilangan dinding selnya. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi enzim Cellulase 0,5% dan Macerozym 0,1% dapat dipergunakan untuk melisiskan dinding sel mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii*.



Gambar 2. Protoplas hasil isolasi. A. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya: a. Protoplas non viabel tampak tidak bulat; b. Protoplas viabel, tampak bulat; B. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop fluorescein: a. Protoplas non viabel tampak tidak bulat dan berwarna merah; b. Protoplas viabel, tampak bulat dan berfluorescein kuning kehijauan

Rata-rata densitas protoplas dan densitas protoplas viabel hasil isolasi anggrek *Paraphalaenopsis laycockii* setelah diinkubasi dalam larutan enzim Cellulase 0,5% dan Macerozym 0,1% dengan kombinasi perlakuan lama waktu inkubasi dan konsentrasi osmotikum disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Dari berbagai konsentrasi larutan osmotikum yang diuji yaitu sukrosa 0,4 M, 0,5 M dan 0,6 M, pada umumnya densitas protoplas dan protoplas viabel tertinggi diperoleh ketika daun di inkubasi dalam larutan enzim selama 4 jam (Tabel 1 dan 2). Daun yang direndam dalam larutan enzim yang mengandung sukrosa 0,4 M selama 4 jam menghasilkan densitas protoplas

$8,0 \pm 0,6 \times 10^5$ protoplas/mL dengan protoplas viabel $6,3 \pm 0,6 \times 10^5$ protoplas/mL lebih tinggi dibanding waktu inkubasi yang lain. Daun yang direndam dalam larutan enzim yang mengandung sukrosa 0,5 M selama 4 jam menghasilkan densitas protoplas $8,3 \pm 1,3 \times 10^5$ protoplas/mL dengan protoplas viabel $6,3 \pm 0,6 \times 10^5$ protoplas/mL lebih tinggi dibanding waktu inkubasi yang lain,

demikian pula daun yang direndam dalam larutan enzim yang mengandung sukrosa 0,6 M selama 4 jam menghasilkan densitas protoplas $20,0 \pm 5,3 \times 10^5$ protoplas/mL dengan protoplas viabel $10,0 \pm 1,4 \times 10^5$ protoplas/mL lebih tinggi dibanding waktu inkubasi yang lain, ini mengindikasikan bahwa waktu inkubasi yang tepat untuk isolasi protoplas mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii* adalah 4 jam. Hasil penelitian ini sama dengan hasil yang pernah dilaporkan Khentry *et al.* (2006) yang mengisolasi

protoplas mesofil daun anggrek *Dendrobium sonia* “Bom 17” dengan menggunakan larutan osmotikum manitol, bahwa waktu inkubasi yang optimal untuk isolasi adalah 4 jam. Demikian pula Tee *et al.* (2010) yang telah berhasil mengisolasi protoplas mesofil daun anggrek *Dendrobium crumenatum* namun menggunakan larutan osmotikum sorbitol diperoleh densitas protoplas viabel tertinggi $28,6 \times 10^4$ protoplas/mL pada waktu inkubasi 4 jam.

Tabel 1. Rerata densitas protoplas hasil isolasi dari mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii* yang direndam dalam kombinasi enzim Cellulace 0,5% + Macerozym 0,1% pada berbagai konsentrasi sukrose dan waktu inkubasi yang berbeda (n=10) (densitas proptolas x 10^5 protoplas/mL \pm Sd)

Konsentrasi sukrose (M)	Waktu inkubasi (jam)			
	2	4	6	8
0,4	5,3 ^{abc} \pm 1.4	8,0 ^{ef} \pm 0,6	7,0 ^{cdef} \pm 0,7	6,8 ^{cdef} \pm 0,9
0,5	8,0 ^{ef} \pm 0,5	8,3 ^f \pm 1,3	4,2 ^a \pm 0,9	4,3 ^{ab} \pm 1,2
0,6	7,3 ^{def} \pm 1.4	20,0 ^g \pm 5,3	6,3 ^{cde} \pm 1,6	6,0 ^{bcd} \pm 0,9

Keterangan : Angka rerata yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda signifikan menurut uji Mann-Whitney (p<0,05).

Tabel 2. Rerata densitas protoplas viabel hasil isolasi dari mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii* yang direndam dalam kombinasi enzim Cellulace 0,5% + Macerozym 0,1% pada berbagai konsentrasi sukrose dan waktu inkubasi yang berbeda (n=10) (densitas proptolas viabel x 10^5 protoplas/mL \pm Sd)

Konsentrasi sukrose (M)	Waktu inkubasi (jam)			
	2	4	6	8
0,4	4,3 ^c \pm 1.2	6,3 ^d \pm 0,6	6,0 ^d \pm 0,7	4,9 ^c \pm 0,7
0,5	6,2 ^d \pm 0,5	6,3 ^d \pm 0,6	6,3 ^d \pm 0,6	1,0 ^a \pm 0,3
0,6	6,2 ^d \pm 1.4	10,0 ^e \pm 1,4	1,9 ^b \pm 0,4	1,0 ^a \pm 0,3

Keterangan : Angka rerata yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata menurut uji Mann-Whitney (p<0,05).

Dari berbagai konsentrasi larutan osmotikum yang diuji yaitu sukrosa 0,4 M, 0,5 M dan 0,6 M, pada umumnya densitas protoplas dan protoplas viabel tertinggi diperoleh ketika daun di inkubasi dalam larutan enzim selama 4 jam (Tabel 1 dan 2). Daun yang direndam dalam larutan enzim yang mengandung sukrosa 0,4 M selama 4 jam menghasilkan densitas protoplas $8,0 \pm 0,6 \times 10^5$ protoplas/mL dengan protoplas viabel $6,3 \pm 0,6 \times 10^5$ protoplas/mL lebih tinggi dibanding waktu inkubasi yang lain. Daun yang direndam dalam larutan enzim yang mengandung sukrosa 0,5 M selama 4 jam menghasilkan densitas protoplas $8,3 \pm 1,3 \times 10^5$ protoplas/mL dengan protoplas viabel $6,3 \pm 0,6 \times 10^5$ protoplas/mL lebih tinggi dibanding waktu inkubasi yang lain, demikian pula daun yang direndam dalam larutan enzim yang mengandung sukrosa 0,6 M selama 4 jam menghasilkan densitas protoplas $20,0 \pm 5,3 \times 10^5$ protoplas/mL dengan protoplas viabel $10,0 \pm 1,4 \times 10^5$ protoplas/mL lebih tinggi dibanding waktu inkubasi yang lain, ini mengindikasikan bahwa waktu inkubasi yang tepat untuk isolasi protoplas mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii* adalah 4 jam. Hasil penelitian ini sama dengan hasil yang pernah dilaporkan Khentry *et al.* (2006) yang mengisolasi protoplas mesofil daun anggrek *Dendrobium sonia* “Bom 17” dengan menggunakan larutan osmotikum manitol, bahwa waktu inkubasi yang optimal untuk isolasi adalah 4 jam. Demikian pula Tee *et al.* (2010) yang telah berhasil mengisolasi protoplas mesofil daun anggrek *Dendrobium crumenatum* namun menggunakan larutan osmotikum sorbitol diperoleh densitas protoplas viabel tertinggi $28,6 \times 10^4$ protoplas/mL pada waktu inkubasi 4 jam.

Hasil perhitungan terhadap densitas protoplas dan protoplas viabel pada semua konsentrasi sukrosa yang diuji menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi densitas protoplas dan protoplas viabel mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena protoplas yang di inkubasi dalam waktu yang lama berpotensi menyebabkan kerusakan membran protoplas. Hal ini sama dengan hasil penelitian Raikar *et al.* (2008) pada hasil isolasi protoplas *Lotus corniculatus*, densitas protoplas tertinggi diperoleh pada perlakuan waktu inkubasi 6 jam kemudian menurun pada waktu inkubasi 8 jam. Ling *et al.* (2009) menyatakan bahwa waktu inkubasi merupakan faktor yang menentukan keberhasilan isolasi protoplas. Apabila waktu inkubasi pendek, protoplas viabel yang dihasilkan sedikit dan apabila waktu inkubasi terlalu panjang maka protoplas akan pecah.

Diantara larutan sukrosa yang diuji (sukrosa 0,4 M, 0,5 M dan 0,6 M), hasil densitas protoplas tertinggi $20,0 \pm 5,3 \times 10^5$ protoplas/mL dengan protoplas viabel $10,0 \pm 1,4 \times 10^5$ protoplas/mL diperoleh ketika daun di inkubasi dalam larutan enzim yang mengandung sukrosa 0,6 M selama jam dan berbeda signifikan dengan konsentrasi larutan sukrosa yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa sukrosa 0,6 M dan waktu inkubasi 4 jam merupakan larutan osmotikum dan waktu inkubasi yang tepat untuk isolasi protoplas mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii*.

SIMPULAN

1. Kombinasi enzim Cellulace 0,5% dan Macerozym 0,1% dapat dipergunakan untuk mengisolasi protoplas mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii*.

2. Ada pengaruh perlakuan kombinasi sukrosa dan waktu inkubasi terhadap densitas protoplas dan protoplas viabel *Paraphalaenopsis laycockii*
3. Kombinasi perlakuan sukrosa 0,6 M dan waktu inkubasi 4 jam merupakan kombinasi yang optimal untuk isolasi protoplas dari mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii*
4. Fluorescein diacetate (FDA) dapat digunakan untuk menguji viabilitas protoplas mesofil daun anggrek *Paraphalaenopsis laycockii*

DAFTAR PUSTAKA

- Babaoglu, M. 2000. Protoplast isolation in Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): determination of optimum explant sources and isolation conditions. *Turk J Bot.* 24: 177-185.
- Bhojwani, S.S., and Razdan. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publisher. Amsterdam.
- Davey, M.R., P. Anthony, J.B. Power, and K.C. Lowe. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotech. Adv.* 23: 131-171.
- Hong, S.Y., P.J. Seo, S.H. Cho, and C.M. Park. 2012. Preparation of leaf mesophyll protoplasts for transient gene expression in *Brachypodium distachyon*. *J. Plant Biol.* 55: 390-397.
- Kanchanapoom, K., S. Jantaro, and D. Rakchad. 2001. Isolation and fusion of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium pompadour*. *Sci. Asia.* 27: 29-34.
- Khatri, A., M. A. Dahot, I.A. Khan, and G.S. Nizamani. 2010. An efficient method of protoplast isolation in Banana (*Musa spp*). *Pakistan Journal Botany.* 42(2): 1267-1271.
- Khentry, Y., A. Paradornuvat, S.Tantiwiwati, S. Phansiri, and N. Thaveechai. 2006. Protoplast isolation and culture of *Dendrobium sonia* "Bom 17". *Journal Nature Science.* 40: 361-369.
- Ling, A.P.K., C.P.L. Ong, C.C. Tee, and S. Hussein. 2009. Establishment isolation protocols of *Orthosiphon stamineus*. *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture.* 3(3): 587-596.
- Nurmalinda., S. Kartikaningrum, N.Q. Hayati, dan D. Widiastoety. 2011. Preferensi konsumen terhadap anggrek *Phalaenopsis*, *Vanda*, dan *Dendrobium*. *J. Hort.* 21(4): 372-384.
- Pindel, A. 2007. Optimization of isolation conditions of *Cymbidium* protoplast. *Folia Horticulturae.* 19(2): 79-22.
- Puspitasari, I., S. Haryanti, and E. Prihastanti. 2006. Efektifitas konsentrasi sorbitol dalam medium purifikasi dalam menghasilkan jumlah sel viabel pada isolasi sel mesofil daun pegagan *Centella asiatica* (L.) Urban. *Buletin Anatomi dan Fisiologi.* Vol XIV. No 2: 30-38.
- Raikar, S.V., R.H. Braun, C. Bryant, A.J. Conner, and M.C. Christey. 2008. Efficient isolation, culture and regeneration of *Lotus corniculatus* protoplasts. *Plant Biotechnol Rep.* 2: 171-177.
- Rao, K.S. and A.H. Prakash. 1995. A simple method for the isolation of plant protoplasts. *J. Biosci.* 20: 645-655.
- Sonntag, K., B.R. Wehling, and A. Wehling. 2009. Protoplast isolation and culture for somatic hybridization of *Lupinus angustifolius* and *Lupinus subcarnosus*.

- Plant Cell Tiss Organ Cult.* 96: 297-305.
- Tee, C.S., P.S. Lee, A.L.P. Kiong, and M. Mahmood. 2010. Optimisation of protoplasts isolation protocols using in vitro leaves of *Dendrobium crumenatum* (pigeon orchid). *African Journal of Agricultural Research.* 5(19): 2685-2693.
- Thomas, T.D. 2009. Isolation, callus formation and plantlet regeneration from mesophyll protoplast of *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill: an important medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 45: 591-598.
- Trigiano, R.N., and D.J. Gray. 2000. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, 2nd edition., CRC Press., Boca Raton, USA.
- Young Hong, S., Seo, P.J., Hae Cho, S and Mo Park, C. 2012. Preparation of leaf mesophyll protoplasts for transient gene expression in *Brachypodium distachyon*. *J. Plant Biol.* 55: 390-397.