

ISBN: 978-979-8257-55-1

SERI TEKNOLOGI

PERBANYAKAN TANAMAN HIAS SECARA *IN VITRO*

Budi Winarto



**PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN HORTIKULTURA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
KEMENTERIAN PERTANIAN**

2014



Science Innovation Network
www.itbang.deptan.go.id

SERI TEKNOLOGI PERBANYAKAN TANAMAN HIAS SECARA *IN VITRO*

Budi Winarto



PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN HORTIKULTURA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
KEMENTERIAN PERTANIAN
2014

ISBN: 978-979-8257-55-1

Diterbitkan oleh :

PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN HORTIKULTURA

Jln. Raya Ragunan 29A Pasar Minggu-Jakarta Selatan 12540 Indonesia

Telp: +62(21)7805768, 7892205 Fax: +62(21) 7805135, 7892205

E-mail: puslitbanghorti@litbang.deptan.go.id, pushorti@yahoo.com

Website:<http://hortikultura.litbang.deptan.go.id>

Kata Sambutan

Atas perkenan dan ridho Allah subhanahuwata ala buku Seri Teknologi Perbanyakkan Tanaman Hias Secara *In Vitro* dapat diterbitkan. Buku ini menjadi bukti, tekad dan peran Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura, melalui kerja keras Balai Penelitian dalam menyediakan teknologi-teknologi unggulan yang dapat dimanfaatkan oleh berbagai pihak dalam pengembangan tanaman hias di Indonesia. Penerbitan buku ini diharapkan juga memberikan contoh dan motivasi bagi peneliti Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura yang lain untuk menunjukkan hasil kerja yang telah dilakukan guna membangun dan meningkatkan peran Balitbangtan di bidang pertanian di Indonesia. Untuk itu kami mengucapkan terima kasih dan memberi penghargaan kepada penulis atas penerbitan seri buku teknologi ini.

Saya berharap, semua pihak dapat mengakses dan memanfaatkan buku ini untuk berbagai kepentingan, baik pengembangan ilmu pengetahuan, aplikasi teknologi untuk produksi benih berkualitas melalui kultur *in vitro* maupun peningkatan kualitas dan ketrampilan sumber daya manusia (SDM). Saya menyadari bahwa buku ini adalah terbitan pertama yang masih belum sempurna. Oleh karena itu, saran dan kritik yang bersifat membangun sangat kami harapkan untuk menyempurnakan buku ini pada terbitan selanjutnya.

Jakarta, Agustus 2014
Kepala Pusat,



Dr. Ir. M. Prama Yufdy, MSc

Kata Pengantar

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas keberhasilan penyusunan buku Seri Teknologi Perbanyakkan Tanaman Hias Secara *In Vitro* ini. Buku ini merupakan kumpulan hasil kerja dan pengalaman melaksanakan kegiatan penelitian pada berbagai macam tanaman hias, seperti: Anthurium, Anyelir, Dendrobium, Gerbera, Krisan, Leather leaf fern, Lisianthus, Mawar, Phalaenopsis, Philodendron dan Ruscus yang telah dilakukan dan berhasil dikembangkan di Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi) sejak 2000 hingga 2014. Sebagian besar teknologi tersebut sudah, sedang dan akan dipublikasikan di jurnal nasional dan internasional yang terakreditasi dan kredibel. Setiap teknologi merupakan hasil dari serangkaian proses penelitian yang dilakukan secara bertahap berdasarkan kaidah-kaidah penelitian, pengolahan data yang baku dan pengambilan kesimpulan yang representative; mulai dari tahap inisiasi, regenerasi, proliferasi, pengakaran hingga aklimatisasi. Setiap teknologi memiliki *repeatability* dan *reproducibility* yang cukup tinggi, jika semua persyaratan yang dibutuhkan terpenuhi.

Penulis berharap buku ini bermanfaat dan dapat menjadi sumber bacaan, ide, dan referensi yang baik dalam mengembangkan ilmu pengetahuan, teknologi perbanyakkan tanaman secara *in vitro* dan meningkatkan ketrampilan SDM. Buku ini adalah terbitan pertama dan masih terdapat banyak kekurangan dan kelemahan. Oleh karena itu penulis mengundang dan mengharapkan saran, masukan dan kritikan yang bersifat membangun untuk menyempurnakan buku ini.

Segunung, Agustus 2014
Penulis

Daftar Isi

Kata Sambutan	iii
Kata Pengantar	iv
Daftar Isi	v
Daftar Gambar	vii
Daftar Singkatan	viii
Daftar Istilah	ix
Pendahuluan	1
1. Perbanyakan dan metode perbanyakan tanaman secara <i>in vitro</i>	3
2. Teknologi perbanyakan <i>Anthurium andreanum</i> Linden ex André secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif	7
3. Teknologi kultur anther <i>Anthurium andreanum</i> Linden ex André	16
4. Teknologi perbanyakan Anyelir (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.	28
5. Teknologi perbanyakan Anyelir (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler.	35
6. Teknologi perbanyakan <i>Dendrobium</i> ‘Zahra FR 62’ secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi protocorm like bodies (plbs).	41
7. Teknologi perbanyakan <i>Gerbera jamesonii</i> Bolus secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk	49
8. Aplikasi thin cell layer (TCL) dan adenine sulfat dalam perbanyakan <i>Gerbera jamesonii</i> Bolus secara <i>in vitro</i>	58
9. Teknologi perbanyakan Krisan (<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat) secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk	67
10. Teknologi perbanyakan Leather leaf fern [<i>Rumohra adiantiformis</i> (G. Forst.) Ching] secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk	75
11. Teknologi perbanyakan Lisianthus [<i>Eustoma grandiflorum</i> (Raf.) Shinn] secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif	83

12.	Teknologi perbanyakan mawar (<i>Rosa hybrida</i> L.) secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.	91
13.	Teknologi perbanyakan <i>Phalaenopsis</i> secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-1: Kultur Tunas Pucuk	99
14.	Teknologi perbanyakan <i>Phalaenopsis</i> secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-2: Kultur Nodus Tangkai Bunga.	108
15.	Teknologi perbanyakan <i>Philodendron</i> secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif	116
16.	Teknologi perbanyakan <i>Ruscus hypophyllum</i> L. secara <i>in vitro</i> melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.	122
	Penutup.	130
	Indek Tanaman	131

Daftar Gambar

1. Teknologi perbanyakan *A. andreanum* ‘Tropical’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif 15
2. Teknologi kultur anther *A. andreanum* ‘Tropical’ 26
3. Variasi ploidi tanaman hasil kultur anther *A. andreanum* ‘Tropical’ 27
4. Teknologi perbanyakan *D. caryophyllus* ‘Maldives’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif 34
5. Teknologi perbanyakan *D. caryophyllus* ‘Maldives’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler. 40
6. Teknologi perbanyakan *Dendrobium* ‘Zahra FR 62’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi plbs. 48
7. Teknologi perbanyakan *G. jamesonii* ‘Carambol’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk 57
8. Aplikasi thin cell layer (TCL) dan adenine sulfat dalam perbanyakan *G. jamesonii* ‘Nuance’ secara *in vitro* 66
9. Teknologi perbanyakan *C. morifolium* ‘Pasopati’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk 74
10. Teknologi perbanyakan *R. adiantiformis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk 82
11. Teknologi perbanyakan *E. grandiflorum* ‘White Lavender’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif 90
12. Teknologi perbanyakan *R. hybrida* ‘Kiss’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif. 98
13. Teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-1: Kultur Tunas Pucuk 107
14. Teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik. 115
15. Teknologi perbanyakan *Philodendron* ‘Moon Light’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler 121
16. Teknologi perbanyakan *R. hypophyllum* L. secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif. 129

Daftar Singkatan

2,4-D	- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	- N6-benzyladenine
g	- gram
ha	- hektar
HgCl ₂	- Merkuri Klorida
IAA	- Indole-3-acetic acid
IBA	- Indole-3-butyric acid
l	- liter
MS	- Murashige dan Skoog
MW	- Medium Winarto
NAA	- α -naphthalene acetic
NaOCl	- Natrium hypochlorida
NPK	- Nitrogen-Phospor-Kalium
NWT	- New Winarto dan Teixeira
mg	- mili gram
ml	- mili liter
plbs	- protocorm like bodies
TCL	- Thin cell layer
lTCL	- Longitudinal thin cell layer
tTCL	- Transversal thin cell layer
TDZ	- thidiazuron
WT	- Winarto dan Teixeira
vvm	- vessel volumes per minute
v/v/v	- volume/volume/volume
$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	- micro-molar per meter persegi per detik

Daftar Istilah

Aklimatisasi	Proses adaptasi dan pemindahan tanaman hasil kultur <i>in vitro</i> dari kondisi terkontrol (laboratorium) ke kondisi <i>ex vitro</i> (lapangan) dengan bantuan manusia.
Androgenesis	Proses unik secara biologi dari taman berbunga, di mana mikrospora dan/atau bagian organ dari bunga jantan (anther) dapat diinduksi dan membentuk tanaman haploid dan/atau haploid ganda.
Eksplan	bahan tanaman yang digunakan dalam kultur <i>in vitro</i> , yang berupa potongan bagian tanaman seperti: daun, batang, akar, tunas pucuk, embrio, plbs, nodus, spadik, anther, dll.
Embriogenesis	Proses pembentukan embrio baik secara langsung maupun tak langsung yang berasal dari dari sel somatik
Empulur	Bagian terdalam dari tanaman berpembuluh, yang terdiri dari sel-sel parenkim dan lunas
Kalus	suatu kumpulan sel amorphous (tidak berbentuk dan belum terdeferensiasi) yang terjadi dari sel-sel jaringan tanaman yang membelah diri secara terus menerus
Kontaminan	Mikroorganisme, baik dalam bentuk bakteri maupun jamur yang muncul dalam kultur <i>in vitro</i> tanaman sebagai akibat pelaksanaan sterilisasi dan kultur yang tidak maksimal
Meristem	Bagian tanaman yang terdapat pada titik tumbuh baik terminal (meristem pucuk) maupun lateral (meristem interkalar) yang aktif membelah secara terus menerus
Plantlets	Tanaman kecil hasil kegiatan kultur <i>in vitro</i> yang telah memiliki akar, batang dan daun secara lengkap

Pencoklatan eksplan	Terjadinya perubahan bahan tanaman yang dikultur secara <i>in vitro</i> dari kondisi normal menjadi coklat hingga kehitaman yang disebabkan oleh adanya senyawa fenolik yang dihasilkan oleh sel/jaringan tanaman. Pada kondisi tertentu pencoklatan eksplan dapat menyebabkan terjadinya kematian bahan tanaman yang dikultur secara <i>in vitro</i> .
Pra-perlakuan	Kegiatan pra-sterilisasi yang dilakukan di luar laminar air flow cabinet
Protocorm like bodies	Embrio yang terbentuk dari sel-sel somatik dan/atau embriogenik zigotik (biji) yang umum ditemukan dalam kultur <i>in vitro</i> anggrek
Sterilisasi	Kegiatan membebaskan bahan tanaman dari adanya mikroorganisme dalam bentuk bakteri dan jamur menggunakan disinfektan, seperti: Alkohol, HgCl ₂ , NaOCl, dll. yang dilakukan dalam laminar air flow cabinet.
Subkultur	menanam kembali bahan tanaman baik pada kondisi awal maupun hasil kultur pada medium yang baru, baik cair maupun semi padat
Totipotensi sel	Kemampuan sel untuk beregenerasi dan membentuk tanaman secara lengkap
Tunas adventif	Tunas yang berasal dari sel somatic tanaman yang memiliki kompetensi untuk diinduksi dan diregenerasi untuk membentuk tanaman secara utuh
Tunas aksiler	Tunas yang berada pada bagian titik tumbuh bagian samping/nodus tanaman

Tunas pucuk

Tunas yang berada pada bagian titik tumbuh tanaman

Variasi somaklonal

Perubahan eksplan/plantlet/embrio/plb baik penampilan (fenotipik) maupun genetik yang terjadi dalam kultur jaringan sebagai akibat dari penggunaan hormon atau aktivitas subkultur yang berlebihan

Pendahuluan

Pada era globalisasi, persaingan antar negara produsen florikultura makin ketat mengingat masing-masing negara ingin menguasai peluang pasar yang terbuka lebar. Produk florikultura nasional harus berdaya saing tinggi agar tetap mampu bertahan di tengah persaingan yang makin ketat. Hal ini dapat dicapai melalui penerapan sistem pertanian industrial berbasis sumber daya nasional. Di dalam sistem pertanian industrial tersebut, aplikasi teknologi inovatif merupakan bagian yang sangat penting untuk meningkatkan efisiensi, efektivitas proses produksi, kesinambungan pasokan produk, distribusi produk, peningkatan nilai tambah, penetapan harga dan pendapatan. Mengingat peran inovasi sangat strategis dalam pembangunan pertanian, maka Kementerian Pertanian mengamanahkan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian untuk melakukan kegiatan penelitian dan pengembangan yang visioner dalam menghasilkan teknologi inovatif berdaya saing tinggi berbasis sumber daya nasional.

Dukungan inovasi sangat diperlukan dalam pembangunan industri florikultura yang berdaya saing. Ketersediaan inovasi unggul merupakan faktor kunci dalam pengembangan subsektor florikultura industrial yang berkelanjutan. Inovasi teknologi harus bermanfaat dalam meningkatkan kapasitas produksi dan produktivitas, sehingga dapat memacu pertumbuhan produksi dan peningkatan daya saing. Inovasi teknologi juga diperlukan dalam pengembangan produk (*product development*) untuk peningkatan nilai tambah, diversifikasi produk dan transformasi produk sesuai dengan preferensi konsumen.

Reformasi penyelenggaraan penelitian dan pengembangan pertanian untuk mendukung tersedianya inovasi yang lebih maju dalam kerangka sistem pertanian industrial yang berkelanjutan terus dilakukan oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Balitbangtan). Reformasi tersebut diharapkan menghasilkan terobosan inovasi yang diperlukan untuk mengantisipasi perubahan lingkungan strategis yang berlangsung cepat. Penciptaan terobosan inovasi hanya dapat dilakukan bilamana penyelenggaraan litbang florikultura berubah dari *business as usual* ke arah penelitian yang berorientasi pada pemecahan masalah secara cepat dengan memanfaatkan potensi sumberdaya dan kelembagaan

yang tersedia. Selain itu paradigma baru Balitbangtan menekankan adanya revitalisasi peran strategis penelitian dan pengembangan dalam pembangunan pertanian (*impact recognition*) dan upaya mendapatkan hasil penelitian bernilai tambah ilmiah (*scientific recognition*) sejalan dengan status sebagai lembaga penelitian berkelas dunia (*a world class research institute*). Perubahan lingkungan strategis global harus dijawab dengan meningkatkan prioritas dan kualitas hasil penelitian dan pengembangan yang berorientasi pasar global.

Balitbangtan melalui Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi), Unit Palaksana Teknis (UPT) yang berada di bawah Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura (Puslitbanghort), telah melaksanakan penelitian di berbagai bidang ilmu sesuai dengan prioritas masalah. Pada saat ini telah diperoleh hasil antara lain berupa (1) varietas unggul baru anggrek (*Phalaenopsis*, *Dendrobium* dan *Spathoglottis*), krisan, anyelir, mawar, lili, gladiol, gerbera dan tanaman hias tropis, seperti sedap malam, *Alpinia purpurata*, *Tapeinochillos annanasease*, dan *Zingiber spektabile*, (2) benih dan teknologi perbenihan, teknologi produksi dan modifikasi lingkungan, serta (3) teknologi pengendalian OPT.

Inovasi teknologi, khususnya terkait dengan perbanyakkan tanaman hias secara *in vitro*, merupakan salah satu komponen penting dalam membangun industri florikultura yang berdaya saing. Inovasi tersebut sangat dibutuhkan, terutama untuk membantu menyediakan benih-benih tanaman hias berkualitas, tepat jumlah, tepat waktu, dan berkesinambungan guna meningkatkan kualitas dan produktivitas, nilai tambah, daya saing dan pendapatan pelaku agribisnis florikultura. Beberapa teknologi perbanyakkan tanaman hias secara *in vitro* telah berhasil dikembangkan di Balithi, terkait dengan Anthurium, Anyelir, Dendrobium, Gerbera, Krisan, Leather leaf fern, Lisianthus, Mawar, Phalaenopsis, Philodendron dan Ruscus. Aplikasi beberapa teknologi tersebut telah membantu diseminasi varietas unggul baru yang telah dihasilkan oleh Balithi dan meningkatkan ketersediaan benih berkualitas bagi petani Krisan, Anggrek, Leather leaf fern, dan Gerbera di berbagai sentra pengembangan tanaman hias di Indonesia. Inovasi teknologi tersebut juga telah diaplikasikan dalam rangka pengembangan sumber daya manusia (SDM) melalui berbagai pelatihan yang telah dan akan dilakukan oleh Balithi untuk petani, kelompok tani, peneliti, pelaku

usaha, pelajar, dan mahasiswa, serta staf dari Dinas Pertanian di berbagai daerah melalui kerjasama yang disepakati.

Mengingat peran dan dampak yang signifikan dari inovasi teknologi perbanyakan tanaman hias secara *in vitro* dalam (1) penyediaan benih berkualitas, (2) diseminasi hasil penelitian dan (3) pengembangan SDM pelaku agribisnis florikultura, maka kompilasi teknologi perbanyakan tanaman hias secara *in vitro* yang diterbitkan dalam bentuk buku menjadi sangat penting artinya. Diharapkan buku ini bermanfaat dan dapat menjadi sumber bacaan, ide dan referensi yang baik untuk berbagai tujuan terkait dengan pengembangan industri florikultura yang berdaya saing. Uraian yang singkat, padat, jelas, dan informatif pada setiap teknologi yang ditulis dalam buku ini diharapkan dapat membantu dan mempermudah setiap pembaca mendapat dan mengambil manfaat dari buku ini.

1. Perbanyakan dan metode perbanyakan tanaman secara *in vitro*

Perbanyakan tanaman secara *in vitro*

Perbanyakan tanaman secara *in vitro* (kultur jaringan tanaman) adalah sebuah kegiatan menjaga dan menumbuhkan jaringan (kalus, sel, protoplas) dan organ tanaman (daun, tunas pucuk/lateral, batang, akar dan embrio) pada kondisi aseptik (Hartmann *et al.*, 1997; George *et al.*, 2007). Teknik ini digunakan untuk berbagai tujuan seperti: memperbanyak tanaman, memodifikasi genotype tanaman, memproduksi biomasa dan metabolit sekunder, mempelajari patologi tanaman, konservasi plasma nutfah dan penelitian-penelitian ilmiah lainnya. Teknik ini juga telah diaplikasikan pada berbagai jenis tanaman, baik tanaman semusim maupun menahun, tanaman herbaceous maupun berkayu. Aplikasi perbanyakan tanaman secara *in vitro* ini memiliki kelebihan dan kelemahan (Suryowinoto, 1996; Hartmann *et al.*, 1997; George *et al.*, 2007).

Kelebihan perbanyakan tanaman secara *in vitro*, diantaranya:

- Menggunakan potongan-potongan kecil dari bagian tanaman (daun, tunas, batang, akar, kalus, sel) untuk menghasilkan tanaman baru yang utuh.
- Membutuhkan ruang yang kecil, energi dan tenaga yang lebih efisien untuk menjaga, menumbuhkan dan meningkatkan jumlah

tanaman

- Karena perbanyakan tanaman dilakukan dalam kondisi aseptik, bebas dari pathogen, maka saat kultur tanaman berhasil dilakukan tidak akan terjadi kehilangan tanaman karena serangan penyakit dan tanaman yang dihasilkan dari kultur jaringan (pada kondisi tertentu) juga bebas dari bakteri, jamur dan mikroorganisme pengganggu yang lain.
- Dengan metode khusus (kultur meristem), teknik ini dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman yang bebas dari virus.
- Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan vegetatif tanaman, seperti: nutrisi (media), konsentrasi zat pengatur pertumbuhan (ZPT), kadar gula, cahaya, temperatur, kelembaban, dll. lebih mudah diatur.
- Dapat diaplikasikan pada berbagai jenis tanaman yang memiliki pertumbuhan yang lambat dan sulit diperbanyak secara vegetatif.
- Produksi tanaman menggunakan teknik ini dapat dilakukan sepanjang tahun tanpa tergantung oleh perubahan musim.
- Dapat menyimpan tanaman hasil perbanyakan dalam waktu yang lama

Kelemahan perbanyakan tanaman secara *in vitro*:

- Membutuhkan ketrampilan yang memadai, peralatan, bahan dan biaya yang mahal, serta sarana pendukung yang mencukupi,
- Membutuhkan metode yang khusus dan optimum untuk menunjang keberhasilan aplikasinya pada tiap species dan tanaman,
- Meski dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak dari bagian kecil tanaman, pada kondisi tertentu dapat menghasilkan adanya penyimpangan karakter-karakter tanaman (*undesirable characteristics*) dan kelainan genetik (*genetic aberrant*),
- Mengingat tanaman hasil kultur *in vitro* terbiasa tumbuh pada medium yang cukup dengan sumber karbon, kelembaban yang tinggi dan memiliki kemampuan fotosintesis yang rendah, maka untuk memindahkan tanaman dari kondisi *in vitro* ke kondisi *ex vitro* diperlukan proses aklimatisasi dan adaptasi agar tanaman

tidak mudah mati akibat kehilangan air dan dapat tumbuh normal pada kondisi *ex vitro*.

Tahapan dalam perbanyakkan tanaman secara *in vitro* dibagi dalam 5 tahapan, yaitu: (1) seleksi tanaman induk dan penyiapannya, (2) kultur aseptik, (3) perbanyakkan/penggandaan propagule (kalus/tunas/embrio), (4) pengakaran dan (5) aklimatisasi plantlets. Dari ke-5 tahapan tersebut, kultur aseptik merupakan tahapan paling kritikal dan sulit dalam perbanyakkan tanaman secara *in vitro*. Selanjutnya dalam perbanyakkan tanaman secara *in vitro*, tidak semua jenis tanaman memerlukan ke-5 tahapan tersebut. Pada tanaman tertentu (krisan, anyelir) tahap pengakaran tidak diperlukan.

Keberhasilan perbanyakkan tanaman secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya: genotype tanaman; jenis, asal dan umur eksplan; media, zat pengatur tumbuh (ZPT), sumber karbon, bahan aditif, cahaya, suhu, kelembaban, dll. (Debergh dan Zimmerman, 1991; Hartmann *et al.*, 1997; George *et al.*, 2007). Selain itu, keberhasilan kultur jaringan tanaman juga dipengaruhi oleh tersedianya sumber tanaman dan eksplan yang cukup.

Metode perbanyakkan tanaman secara *in vitro*

Perbanyakkan tanaman secara *in vitro* dapat dilakukan melalui beberapa metode, diantaranya adalah pembentukan (1) tunas aksiler dan (2) tunas adventif. Pembentukan tunas aksiler dapat dilakukan menggunakan (1) tunas pucuk (kultur tunas atau meristem) dan (2) tunas lateral (kultur nodus). Aplikasi pembentukan tunas aksiler pada perbanyakkan tanaman secara *in vitro* dapat menghasilkan tanaman baru yang identik dengan induknya (*true-to-type*) pada persentase yang sangat tinggi. Sedangkan aplikasi pembentukan tunas adventif menghasilkan tanaman baru dengan persentase *true-to-type* yang lebih rendah, terlebih jika terdapat aplikasi ZPT tanaman yang berlebihan.

Selain metode tersebut, dalam perbanyakkan tanaman secara *in vitro* juga dikenal kultur kalus, sel dan protoplast. Kultur kalus merupakan metode kultur jaringan tanaman yang sangat penting dibanding metode yang lain. Kultur kalus dapat dikembangkan ke arah: (1) pembentukan

akar, tunas maupun plantlet melalui organogenesis dari satu maupun kelompok sel, (2) kultur suspensi sel saat kalus ditumbuhkan dalam kultur cair, (3) pembentukan embrio somatik (*somatic embryogenesis*) dari satu maupun kelompok sel, dan (4) sel dapat diberi perlakuan untuk menghasilkan kultur protoplas dengan menghilangkan dinding selnya (Hartmann *et al.*, 1997). Kultur kalus juga merupakan metode kultur jaringan yang penting dalam pemuliaan tanaman karena dapat menginduksi adanya variasi somaklonal sebagai akibat dari aplikasi penggunaan ZPT.

Aplikasi beberapa metode perbanyakan tanaman secara *in vitro* tersebut yang dilakukan secara bertahap dan terstruktur dengan memerhatikan berbagai faktor yang berpengaruh dapat menghasilkan teknologi perbanyakan. Mengingat setiap jenis tanaman dan/atau eksplan memiliki respon dan membutuhkan kondisi yang spesifik dalam kultur jaringan, maka setiap jenis tanaman dan/atau eksplan akan menghasilkan teknologi perbanyakan yang berbeda antara satu dengan yang lainnya, seperti yang diuraikan dalam buku ini. Teknologi terdiri dari atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi dan penyiapan eksplan, (3) inisiasi tunas adventif/aksiler/embrio/plb, (4) regenerasi dan/atau perbanyakan tunas adventif/aksiler/embrio/plb, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets.

Daftar Pustaka

1. Debergh, P.C., Zimmerman, R.H., 1991, 'Micropropagation: Technology and Application', Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 484 p.
2. George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J., 2007, 'Plant Propagation by Tissue Culture', 3rd Edition, Volume 1, The Background, Exegetic, Basingstone, UK, 508 p.
3. Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., Geneve, R.L., 1997, 'Plant Proagation: Principles and Practices', Sixth Edition, Prentice-Hall, Inc. Simon & Schuster/ Aviacom Company, Upper Saddle River, New Jersey, 769 p.
4. Suryowinoto, M., 1996, 'Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro', Penerbit Kanisius, Yogyakarta, 252 hal.

2. Teknologi perbanyakan *Anthurium andreanum* Linden ex André secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif

Pendahuluan

Anthurium andreanum Linden ex André merupakan tanaman hias penting, di berbagai negara, termasuk Indonesia. Tanaman ini dimanfaatkan oleh konsumen baik sebagai bunga potong maupun tanaman pot (Martin *et al.*, 2003; Raad *et al.*, 2012). Spesies dan hybrid anthurium memiliki bunga yang sangat menarik, warna yang bervariasi, daya simpan yang lama dengan daun yang eksotik (Aswath dan Biswas, 1999; Budhiprawira dan Saraswati, 2006). Struktur yang umumnya disebut bunga merupakan kombinasi antara spathe (modifikasi daun dengan beragam warna) dan spadik berisi ratusan bunga-bunga kecil yang tersusun berurutan membentuk spiral pada tongkol bunga yang memanjang (Kamemoto dan Kuehnle, 1996).

Secara konvensional tanaman ini diperbanyak melalui biji, pemisahan anakan, dan stek batang (Atak and Çelik, 2009; Raad *et al.*, 2012). Perbanyakan biji menghasilkan keturunan yang beragam, sementara pemisahan anakan dan stek batang menghasilkan tanaman baru yang identik dengan tanaman induknya dalam jumlah yang rendah (Viégas *et al.*, 2007). Untuk tujuan komersial dan penyediaan tanaman dalam jumlah yang lebih banyak dan seragam, cara konvensional tersebut tidak dapat digunakan. Teknologi perbanyakan secara *in vitro* memiliki peluang yang lebih baik untuk diaplikasikan dan mengatasi keterbatasan tersebut.

Beberapa teknologi perbanyakan anthurium secara *in vitro* telah dikembangkan dan dilaporkan oleh peneliti sebelumnya, seperti pada *A. andreanum* 'Fleming' (Viégas *et al.*, 2007), 'Agnihotri' (Bejoy *et al.*, 2008), 'Arizona' dan 'Sumi' (Atak dan Çelik, 2009), 'Nitta' (Alam *et al.*, 2010), 'Casino' dan 'Antadra' (Raad *et al.*, 2012). Sementara pada varietas Tropical belum pernah dilaporkan.

Teknologi perbanyakan *A. andreanum* 'Tropical' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif yang telah berhasil dikembangkan (Winarto, 2007; Winarto, 2010). Teknologi tersebut terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan,

(3) inisiasi tunas adventif, (4) regenerasi dan perbanyakan tunas adventif, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 1).

Teknologi perbanyakan *A. andreanum* ‘Tropical’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.

Bahan dan alat

Bahan

- *Anthurium andreanum* ‘Tropical’
- Medium Winarto-Teixeira (WT), New Winarto-Teixeira (NWT) (Winarto *et al.*, 2011) dan Murashige dan Skoog (1962) (Semua komponen media menggunakan bahan pro-analisis dari Merck-Darmstadt-Jerman dan Sigma-Aldrich-Jerman)

Komposisi Medium	WT	NWT	1/2MS
Makro elemen	mg/l	mg/l	mg/l
NH ₄ NO ₃	550	750	825
KNO ₃	1.250	1.750	900
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	250	-
MgSO ₄	180	200	195
CaCl ₂	300	-	220
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	200	150	-
KH ₂ PO ₄	150	125	85
Mikro elemen			
H ₃ BO ₃	5,7	4,75	6,2
KI	0,65	0,45	0,83
MnSO ₄ · H ₂ O	15,5	12,5	16,9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7,5	6,5	10,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2	0,1	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02	0,01	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02	0,01	0,025

Na ₂ EDTA ·2H ₂ O	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,5	27,5	27,5
Vitamin			
Glycine	-	-	2,0
Myo-inositol	110	125	100
Nicotinic acid	-	-	0,5
Pyridoxine-HCl	-	-	0,5
Thiamine-HCl	0,5	0,55	0,1

- Thidiazuron (TDZ= 0,5-1,5 mg/l), N6-benzyladenine (BA= 0,5-1 mg/l), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D= 0,1-0,5 mg/l) dan α -naphthalene acetic acid (NAA= 0,01-0,02 mg/l) (ZPT berasal dari Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l; Ducefa-Biochemie, RV Harleem-The Netherland)
- 1% dan 0,5% (5,25% NaOCl; Bayclin-Johnson Home Hygiene Products Ltd, Jakarta, Indonesia)
- Sukrosa (30 g/l; Merck)
- Alkohol 70%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil; Benlox 50 WP, Dharma Guna Wibawa Ltd, Jakarta, Indonesia)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat; Agrept 20WP, Mastalin Mandiri Ltd, Jakarta, Indonesia)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- NPK (20:15:15, Nusa Tani, Ltd, Jakarta)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/balsam/jam

- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *A. andreanum* 'Tropical' yang tumbuh subur, sehat dan berumur 1-1,5 tahun. Tanaman donor ditanam dalam polybag/pot plastik [diameter 30 cm, berisi campuran arang sekam, sekam, dan humus bambu/bahan organik (1:1:1, v/v/v)]. Tanaman donor ditempatkan dalam rumah kaca/rumah plastik dan dipelihara melalui melalui penyiraman dan pemupukan. Pupuk cair (2 g/l NPK 20:15:15) diaplikasikan setiap 3 hari sekali. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Daun muda yang masih menggulung hingga yang baru membuka dipanen pada saat pagi hari dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Daun muda yang masih menggulung atau baru diberi pra-perlakuan dengan meletakkan eksplan di bawah air mengalir selama 1-2 jam. Eksplan selanjutnya direndam dalam 1% larutan pestisida (50% benomyl dan 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit sambil digojok, kemudian dibilas beberapa kali dengan air hingga bersih. Eksplan kemudian dibawa ke dalam laminar air flow cabinet dan disterilisasi dengan 70% alkohol selama 5 menit, 1% (5,25% NaOCl) yang telah ditambah dengan beberapa tetes Tween 20 selama 10 menit, 0,5% NaOCl selama 5 menit dan terakhir dengan dibilas dengan air destilata steril 5-6x (@ 3-5 menit). Eksplan ditiriskan beberapa saat dalam botol sterilisasi yang ditutup ujungnya dengan tisu steril untuk mengurangi jumlah air yang menempel pada permukaan eksplan.

Setelah sterilisasi, eksplan diambil dan diletakkan diatas cawan Petri steril. Pinggir eksplan yang rusak dipotong dan dibuang menggunakan pisau kultur. Daun kemudian dipotong-potong dengan ukuran $\pm 1-1,5$ cm dan $0,5-1$ cm untuk petiol. Eksplan dilukai menggunakan ujung pisau kultur untuk meningkatkan potensi inisiasi kalus, ditanam pada media inisiasi dengan posisi terbalik dan sedikit ditekan.

Inisiasi tunas adventif

Inisiasi tunas adventif dilakukan dengan cara menanam eksplan baik potongan daun maupun petiol pada medium NWT yang ditambah dengan $0,1$ mg/l 2,4-D, $0,02$ mg/l NAA, $1,5$ mg/l TDZ, $0,75$ mg/l BA, 30 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite. Kultur disimpan dalam ruang gelap selama $1,5-2$ bulan. Kalus umumnya akan terbentuk pada semua bagian eksplan yang mengalami pelukaan. Ukuran kalus bervariasi tergantung respon tiap varietas. Kalus yang terbentuk adalah kalus organogenik yang mudah diregenerasi membentuk tunas adventif.

Regenerasi dan perbanyak tunas adventif

Regenerasi tunas adventif dilakukan dengan cara memindahkan dan memecah ukuran kalus (jika ukuran ± 1 cm panjang, lebar dan tinggi) dan menanam kembali kalus tersebut pada media yang sama dengan media inisiasi. Kultur disimpan di bawah kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas ~ 13 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Regenerasi kalus membentuk tunas adventif biasanya dimulai dengan munculnya bakal tunas $10-15$ hari setelah kultur. Bakal tunas akan terus bertumbuh dan membentuk tunas dengan 1 daun $20-25$ hari setelah kultur. Jumlah tunas dan daun terus bertambah seiring dengan pertambahan waktu penyimpanan. Tunas dengan $2-3$ daun diamati setelah 2 bulan penyimpanan. Sedangkan perbanyak tunas dilakukan dengan memindahkan dan memecah ukuran kalus dengan bakal tunas + tunas pada medium WT atau NWT yang ditambah $0,5$ mg/l TDZ, $0,25$ mg/l BA, $0,01$ mg/l NAA, 30 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite dan disimpan pada kondisi inkubasi yang sama selama ± 2 bulan. Pada tahap ini pertambahan jumlah tunas terus terjadi dengan kecepatan penggandaan

yang bervariasi tergantung respon varietas. Subkultur kalus dengan tunas dapat dilakukan berulang setiap 2 bulan sekali hingga 5-8 kali. Subkultur disarankan untuk dihentikan saat tunas sudah mulai membentuk akar.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 daun ke medium WT atau NWT tanpa ZPT atau medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 20 g/l sukrosa dan 7 g/l agar Swallow. Kultur tunas kemudian disimpan dalam kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Akar umumnya mulai terbentuk 10-15 hari setelah kultur. Jumlah akar yang terbentuk per tunas berkisar antara 2-4 akar dengan panjang yang bervariasi setelah 2 bulan masa inkubasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 2-4 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar dengan cara mencuci akar di bawah air mengalir. Akar plantlets kemudian direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit dan tiriskan di atas kertas koran atau tisu. Plantlets ditanam dalam bak-bak plastik yang berisi arang sekam yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup bak plastik dengan plastik transparan, letakkan di tempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Setelah 1,5-2 bulan masa aklimatisasi, tanaman dapat dipindah dalam polybag (diameter 10 cm) yang berisi media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1, v/v) atau arang sekam, sekam dan humus bambu/pupuk organik (1:1:1, v/v/v). Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 80-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakkan *A. andreaenum* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan. Waktu yang

dibutuhkan \pm 2 tahun. Titik kritis teknologi terletak pada tahap inisiasi kalus dan munculnya kontaminasi laten yang disebabkan oleh bakteri. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 5-10 tunas. Jika rata-rata tunas yang dihasilkan adalah 5 tunas tiap subkultur, 5 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan \pm 15.000 tunas dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 13.500 plantlets akan dihasilkan setelah 16 bulan. Teknologi ini berhasil diaplikasikan pada *A. andreaeanum* 'Carnaval', 'Casino', 'Laguna', 'Amigo', 'Midori', Klon-klon Balithi, Klon-klon hasil persilangan petani dan *Anthurium* lokal. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, regenerasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi ZPT (dinaikkan atau diturunkan) dan penggunaan arang aktif kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih *anthurium*. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Atak, Ç., Çelik, O, 2009, 'Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants', *Pak.J. Bot.*, vol. 41, pp.1155-1161
2. Aswath, C., Biswas, B., 1999, 'Anturium', pp: 198-213. *In: Biotechnology of Horticultural Crops*. Parthasarathy, V.A., Bose, T.K., Das, P. (Eds.), vol. 3, Naya Prokash, India.
3. Bejoy, M., Sumitha, V.R., Anish, N.P., 2008, 'Foliar regeneration in *Anthurium andraeanum* Hort. cv. 'Agnihotri'', *Biotech.*, vol. 7, pp. 134-138.
4. Budhiprawira, S., Saraswati, D., 2006, 'Anturium', Penebar Swadaya, Jakarta, 92 Halaman
5. Kamemoto, H., Kuehne, A.R., 1996, 'Breeding anturium in Hawaii', University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii.
6. Martin, K.P., Joseph, D., Madassery, J., Philip, V.J., 2003, 'Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* L. Hort. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, vol. 39, no. 5, pp. 500-504.

7. Viégas, J., da Rocha, M.T.R., Ferreira-Moura, I., Corrêa, M.G.S., da Silva, J.B., dos Santos, N.C., Teixeira da Silva, J.A., 2007, 'Anthurium andraeanum (Linden ex Andre') culture: *in vitro* and *ex vitro*', *Floriculture Ornamental Biotech.*, vol. 1, pp.61-65.
8. Winarto, B., 2007, 'Respon pembentukan tunas aksiler dan adventif pada kultur *Anthurium* secara *in vitro*', *J. Hort.*, vol. 17, no. 1, pp. 17-25.
9. Winarto, B., 2010, 'Peningkatan pertumbuhan dan regenerasi eksplan hasil kultur anther *Anthurium* melalui perbaikan media kultur', *J. Hort.*, vol. 20, no. 4, pp. 342-351.



Gambar 1. Teknologi perbanyakan *A. andreaeum* 'Tropical' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif. a. Daun muda dan tangkai yang digunakan sebagai sumber eksplan, b. Potongan daun dan tangkai bunga steril yang siap ditanam pada medium inisiasi, c. Daun dengan respon pembentukan kalus yang tinggi dengan bakal tunas yang sangat banyak 1,5 bulan setelah inkubasi, d. Kalus hasil inisiasi tangkai daun 25 hari setelah kultur, e. Tunas adventif hasil regenerasi kalus 2 bulan setelah inkubasi terang, f. Regenerasi kalus dari tangkai daun yang beregenerasi membentuk tunas 1,5 bulan setelah kultur, g. Tunas adventif hasil perbanyakan pada medium NWT yang ditambah dengan 0,5 mg/l TDZ dan 0,25 mg/l BA, h. Plantlets yang siap untuk diaklimatisasi, i. Plantlet yang disiapkan untuk aklimatisasi, j. Perlakuan plantlet dengan 1% larutan pestisida, k. Plantlets yang berhasil diaklimatisasi pada medium arang sekam, l. *A. andreaeum* 'Tropical' hasil kultur jaringan.

3. Teknologi kultur anther *Anthurium andreanum* Linden ex André

Pendahuluan

Anthurium andreanum adalah tanaman biseksual dan menyerbuk silang (Augustine, 2009; Caroll, 2007). Peluang tanaman menyerbuk sendiri sangat rendah karena fase betina masak lebih kurang satu bulan lebih awal dibanding fase jantannya. Pemuliaan *anthurium* umumnya dilakukan menggunakan seleksi biji hasil hibridisasi. Tanaman baru dengan karakter unggul diperoleh dengan mengandalkan kombinasi gen kedua tetuanya (Kamemoto dan Kuehnle, 1996). Hibridisasi secara konvensional ini umumnya memerlukan waktu yang cukup lama. Pada *A. andreanum* dibutuhkan waktu sekitar 6-7 bulan sejak penyerbukan hingga biji masak, sementara itu 10-12 bulan untuk *A. scherzerianum*. Biji tidak dapat disimpan dan harus segera ditanam. Seleksi dan evaluasi tanaman F1 dapat dilakukan setelah 2-3 tahun sejak penanaman biji. Kondisi ini menyebabkan kemajuan program pemuliaan *anthurium* menjadi sangat lambat. Hibridisasi menghasilkan populasi tanaman yang bersegregasi dengan karakter bunga yang beragam. Namun umumnya 1/3 populasi segrekan tersebut dibuang sebelum berbunga karena penampilannya inferior (Geier, 1990). Induksi mutasi menggunakan radiasi sinar gamma 5 hingga 15 Gy juga telah dilakukan, tetapi belum memberikan hasil yang optimal (Puchooa dan Sookun, 2003)

Teknologi haploid adalah aplikasi teknologi kultur jaringan yang dilakukan untuk meregenerasi kalus dan/atau embrio haploid dari gamet jantan (*androgenesis*) dan betina (*gynogenesis*) hingga menghasilkan tanaman haploid dan/atau haploid ganda (galur murni) (Maluszynski *et al.*, 2003ab). Teknologi ini merupakan cara paling cepat untuk menghasilkan galur murni suatu tanaman (Kush dan Virmani, 2003). Teknik kultur anther pertama kali diperkenalkan oleh Guha dan Maheshwari (1964, 1966) pada *Datura innoxia* Mill, kemudian berkembang pesat dan diaplikasikan pada berbagai jenis tanaman (Maluszynski *et al.*, 2003ab). Totipotensi sel gamet jantan dan dinding anthera berpengaruh terhadap pembentukan tanaman haploid. Pada kondisi yang sesuai, perkembangan sel polen dapat diubah dari pembentukan polen (*jalur gametofitik*) ke pembentukan embrio (*jalur sporofitik*) hingga menghasilkan tanaman

haploid dan/atau haploid ganda (Supena, 2004), baik yang dihasilkan melalui induksi/penggandaan kromosom maupun terjadi secara spontan.

Tanaman haploid ganda dan teknologi pendukungnya sangat bermanfaat di berbagai bidang seperti: (1) pemuliaan hibrida, (2) pemuliaan mutasi, (3) perbenihan, (4) transformasi/rekayasa tanaman dan (4) pemetaan gen (Kush dan Virmani, 1996; Maluszynski *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2003; Forster dan Thomas, 2003; Shim dan Kasha, 2003; Szarejsko, 2003). Di bidang pemuliaan, penerapan teknologi ini dapat mempercepat diperolehnya homozigositas pada satu atau lebih generasi untuk menunjang pemuliaan hibrida (Thomas *et al.*, 2003). Pada pemuliaan mutasi, aplikasi teknologi haploid ganda dapat dilakukan untuk skrining mutan dominan dan resesif pada generasi pertama setelah perlakuan mutagen, yang pada gilirannya dapat mempersingkat waktu dalam produksi mutan galur murni, meningkatkan efisiensi seleksi mutan dengan menggunakan metode seleksi *in vitro* pada level haploid dan haploid ganda (Radzan, 1993; Maluszynski *et al.*, 1996; Szarejsko, 2003). Selain itu teknologi haploid dapat digunakan untuk seleksi resistensi tanaman terhadap penyakit didalam rumah kaca dan mempelajari penurunan karakter-karakter kualitatif (Radzan, 1993). Pada perbenihan, persilangan 2 tanaman haploid ganda akan menghasilkan biji dengan keseragaman yang sangat tinggi (>95%). Pada bidang transformasi / rekayasa tanaman, mikrospora yang diisolasi dari anthera sangat potensial untuk penembakan gen, dan seleksi transgen secara *in vitro* (Shim dan Kasha, 2003). Sedangkan pada pemetaan gen, tanaman haploid ganda dapat digunakan untuk memperbaiki variasi genetik setelah satu siklus rekombinasi (Forster dan Thomas, 2003).

Pada tanaman hias, teknik kultur anthera telah berhasil dikembangkan pada lili (Han *et al.*, 1997), Cyclamen (Ishizaka, 1998), dan bunga matahari (Saji dan Sujatha, 1998). Aplikasi dan pengembangan teknologi haploid pada famili Araceae, khususnya anturium masih sangat terbatas. Kultur ovul pada *Spatiphyllum* telah dilakukan oleh Eeckhaut *et al.* (2001), namun keberhasilannya masih sangat rendah. Sedangkan kultur anther pada *anthurium* belum pernah dilaporkan.

Teknologi kultur anther pada *A. andreanum* 'Tropical' merupakan terobosan teknologi yang berhasil dikembangkan di Blithi. Teknologi ini dikembangkan dan terus diperbaiki sejak 2003 dan berhasil pada 2009

(Winarto, 2009). Berbagai studi terkait dengan pengembangan teknologi kultur anther *Anthurium* telah dipublikasikan (Winarto dan Rachmawati, 2007; Winarto, 2010; 2011a; 2011b; 2013; 2014; Winarto *et al.*, 2009; 2010a; 2010b; 2010c; 2010d; 2011a, 2011b; Winarto dan Mattjik, 2009a; 2009b; Winarto dan Teixeira, 2012). Teknologi ini meliputi pengelolaan (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) isolasi anther dan inisiasi kalus, (4) regenerasi dan perbanyakkan tunas adventif, (5) penyiapan plantlets dan (6) aklimatisasi plantlets (Gambar 2 dan 3)

Teknologi kultur anther *A. andreanum* ‘Tropical’

Bahan dan alat

Bahan

- *A. andreanum* ‘Tropical’
- Medium New Winarto-Teixeira (NWT) (Winarto *et al.*, 2011) dan Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- Thidiazuron (TDZ= 0,5-1,5 mg/l), N6-benzyladenine (BA= 0,5-1 mg/l), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D= 0,1-0,5 mg/l) dan α -naphthalene acetic acid (NAA= 0,01-0,02 mg/l) (Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l; Ducefa) atau phytagel (3 g/l; Sigma)
- 1% dan 0,5% (5,25% NaOCl; Bayclin)
- Sukrosa (30 g/l; Merck)
- Alkohol 70%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil; Benlox 50 WP)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat; Agrept 20WP)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- NPK (20:15:15, Nusa Tani)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/balsam/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (15 dan 25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *A. andreanum* ‘Tropical’ yang tumbuh subur dan sehat, berumur 1-1,5 tahun. Tanaman donor ditanam dalam polybag/pot plastik [diameter 30 cm, berisi campuran arang sekam, sekam, dan humus bambu/bahan organik (1:1:1, v/v/v)]. Tanaman donor ditempatkan dalam rumah kaca/rumah plastik dan dipelihara melalui melalui penyiraman dan pemupukan. Pupuk cair (2 g/l NPK 20:15:15) diaplikasikan setiap 3 hari sekali. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Spadik *A. andreanum* ‘Tropical’ yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah spadik di mana 50% stigmanya berada pada tahap reseptif optimal. Spadik dipanen saat pagi hari.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Spadik yang telah dipanen diberi pra-perlakuan dengan meletakkan eksplan di bawah air mengalir selama \pm 1 jam. Eksplan selanjutnya direndam dalam 1% larutan pestisida (50% benomyl dan 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit sambil digojok, dibilas beberapa kali dengan air hingga bersih. Eksplan kemudian dibawa ke dalam laminar air flow cabinet dan disterilisasi dengan 80% alkohol selama 3 menit, 1% natrium hipoklorida (5,25% NaOCl) yang telah ditambah dengan beberapa tetes

Tween 20 (3-5 tetes) selama 10 menit, 0,5% NaOCl selama 10 menit dan terakhir dengan dibilas dengan air destilata steril 5-6x (@ 3-5 menit). Eksplan ditiriskan beberapa saat dalam botol sterilisasi yang ditutup ujungnya dengan tisu steril untuk mengurangi jumlah air yang menempel pada permukaan eksplan.

Setelah sterilisasi, eksplan diambil dan diletakkan di atas cawan Petri steril. Daerah transisi spadik (ditunjukkan dengan adanya area perubahan warna bunga) dipotong dengan panjang ± 2 cm (1 cm ke arah pangkal dan 1 cm ke arah ujung spadik, di mana daerah transisi menjadi acuan pemotongannya). Potongan spadik kemudian ditempatkan di bawah stereo mikroskop pada pembesaran 20-40x untuk proses isolasi anther.

Isolasi anther dilakukan dengan cara membuka petal bunga secara bertahap dimulai dari bagian yang dekat dengan daerah potongan. Setelah semua petal dibuang, anther kemudian diambil dan dipotong pada bagian tengahnya dan langsung ditanam pada media inisiasi kalus. Isolasi setengah anther pada bagian ujung harus dilakukan dengan cepat dan segera ditanam untuk menekan dan mengurangi resiko terjadinya kematian anther akibat pencoklatan dan kontaminasi oleh bakteri.

Inisiasi dan pembesaran kalus

Inisiasi kalus dilakukan dengan cara menanam setengah anther pada medium NWT yang ditambah dengan 0,1 mg/l 2,4-D, 0,02 mg/l NAA, 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BA, 30 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite. Kultur kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 1,5-2 bulan. Kalus umumnya akan terbentuk pada permukaan anther yang mengalami pelukaan. Ukuran kalus bervariasi tergantung respon tiap varietas. Kalus yang terbentuk umumnya adalah kalus organogenik yang mudah diregenerasi membentuk tunas adventif. Pembesaran kalus dilakukan dengan cara subkultur berulang kalus hasil inisiasi awal pada medium yang sama hingga kalus mencapai ukuran ± 1 cm dalam kondisi inkubasi terang, 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan

Regenerasi dan perbanyakan tunas adventif

Regenerasi tunas adventif kalus hasil kultur anther kondisinya hampir sama dengan kalus hasil kultur daun dan petiol. Regenerasi kalus dilakukan dengan cara memindahkan dan memecah ukuran kalus (jika ukuran ± 1 cm panjang, lebar dan tinggi) dan menanam kembali kalus tersebut pada media yang sama dengan media inisiasi. Kultur selanjutnya disimpan dalam kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Regenerasi kalus membentuk tunas adventif biasanya dimulai dengan munculnya bakal tunas (10-15 hari) setelah kultur. Bakal tunas akan terus bertumbuh dan membentuk tunas dengan 1 daun (20-25 hari) setelah kultur. Jumlah tunas dan daun terus bertambah seiring dengan pertambahan waktu penyimpanan. Tunas dengan 2-3 daun mudah diamati setelah 2 bulan penyimpanan. Sedangkan perbanyakan tunas dilakukan dengan memindahkan dan memecah ukuran kalus dengan bakal tunas dan tunas pada medium NWT yang ditambah 0,5 mg/l TDZ, 0,25 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA, 30 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite dan disimpan pada kondisi inkubasi yang sama dalam waktu ± 2 bulan. Pada tahap ini pertambahan jumlah tunas terus terjadi dengan kecepatan penggandaan yang bervariasi tergantung respon varietas. Subkultur kalus dengan tunas dapat dilakukan berulang setiap 2 bulan sekali hingga 5-8 kali. Subkultur disarankan untuk dihentikan saat tunas sudah mulai membentuk akar.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 daun ke medium NWT tanpa ZPT atau medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 20 g/l sukrosa dan 7 g/l agar Swallow. Kultur tunas disimpan dalam kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Akar umumnya mulai terbentuk 10-15 hari setelah kultur. Jumlah akar yang terbentuk per tunas berkisar antara 2-4 akar dengan panjang yang bervariasi setelah 2 bulan masa inkubasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 2-4 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar dengan cara mencuci akar di bawah air mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan di atas kertas koran atau tisu. Plantlets ditanam dalam bak-bak plastik yang berisi arang sekam yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup bak plastik dengan plastik transparan, letakkan di tempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Setelah 1,5-2 bulan masa aklimatisasi, tanaman dapat dipindah dalam polybag (diameter 10 cm) yang berisi media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1, v/v) atau arang sekam, sekam dan humus bambu/pupuk organik (1:1:1, v/v/v). Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 80-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi kultur anther *A. andreanum* 'Tropical' telah berhasil dikembangkan melalui proses yang panjang, sejak inisiasi hingga analisis kromosom tanaman hasil aklimatisasi. Titik kritis teknologi terdapat pada tahap isolasi anther dan kultur inisiasi yang rentan terhadap kontaminasi dan pencoklatan eksplan. Plantlets hasil regenerasi kalus hasil kultur anther ternyata menghasilkan tanaman dengan variasi ploidi dengan rasio 23%-29% haploid, 5-10% euploid, 56-69% diploid dan 3-4% triploid (Gambar 3) dan variasi warna bunga yang berbeda dari merah tua, merah cerah, oranye, ungu dan putih (Winarto *et al.*, 2010d; 2011a). Tanaman haploid hasil regenerasi kalus anther dapat digandakan kromosomnya membentuk tanaman haploid ganda dengan memberi perlakuan tunas dengan 0,25% colchicine selama 7 hari dengan cara perendaman (Winarto, 2013). Induksi kalus pada kultur anther dapat ditingkatkan hingga 55-77% dengan meningkatkan (1) konsentrasi sukrosa dari 30 ke 60 g/l (Winarto *et al.*, 2009), (2) mengaplikasikan 0,5 mg/l 2,4-D and 2 mg/l TDZ (Winarto *et al.*, 2010b), 250 mg/l glutamine (Winarto, 2011a) dan menambahkan 700 mg/l amonium nitrate kedalam

medium ½ WT (Winarto, 2013b). Teknologi ini berhasil diaplikasikan pada berbagai varietas lain seperti: ‘Carnaval’, ‘Casino’, ‘Laguna’, ‘Safari’, dan *Anthurium* lokal. Modifikasi komposisi medium inisiasi, regenerasi dan proliferasi, baik pada konsentrasi ZPT maupun komponen media yang lain (dinaikkan atau diturunkan) kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini pada kultur anther jenis anthurium yang berbeda.

Daftar Pustaka

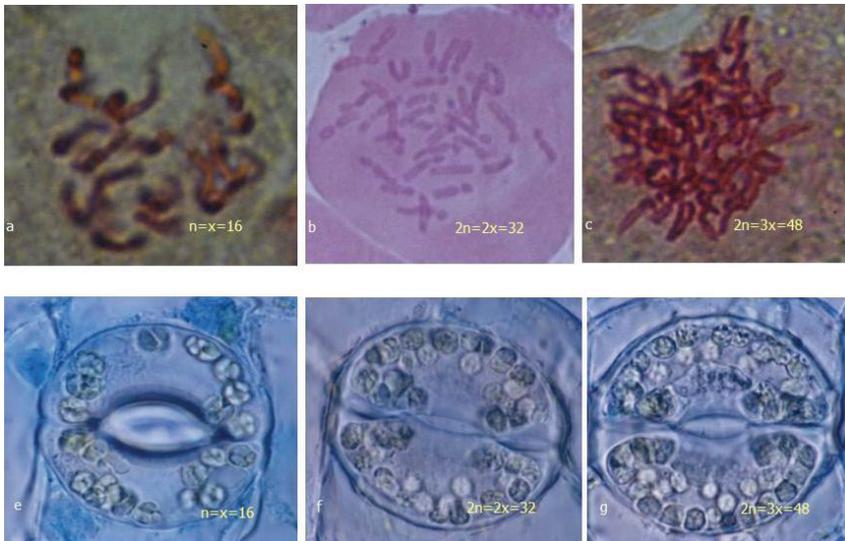
1. Augustine, S.T., 2009, ‘Taxonomy and Biology of Anturium’, View 28 September 2009 at: <http://sta.uwi.edu/anturium/strengths_opportunities.asp>
2. Carroll, N., 2007, ‘The Pollination of *Anturium* Flowers’, View 28 September 2009 at: <<http://www.aroid.org/TAP/Articles/anthpollination.php>>
3. Eeckhaut, T., Werbrouck, S., Dendauw, J., van Bockstaele, E., Debergh, P., 2001, ‘Induction of homozygous *Spatiphyllum wallisii* genotypes through gynogenesis’, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 67, pp. 181-189.
4. Forster, B.P., Thomas, W.T.B., 2003, ‘Doubled haploide in genetic mapping and genomics’, *In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejsko, I. (Eds.), Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual*, pp: 367-390, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston/London.
5. Geier, T., 1990, ‘Anturium’, *In: Aminirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S. (Eds.), Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species*, vol. 5, pp. 228-252, McGraw-Hill, New York.
6. Guha, S., Maheshwari, S.C., 1964, ‘*In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*’, *Nature*, vol. 204, pp. 496.
7. Guha, S., Maheshwari, S.C., 1966, ‘Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura innoxia*’, *Nature*, vol. 212, pp. 97-98.
8. Han, D.S., Niimi, Y., Nakano, M., 1997, ‘Regeneration of haploid plants from anther cultures of the Asiatic Irbid lily ‘Connecticut King’’, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 47, pp. 153-158.
9. Ishizaka, H., 1998, ‘Production of microspore-derived plants by anther culture of an interspecific F1 hybrid between *Cyclamen persicum* and *C. purpurascens*’, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 54, pp. 21-28.
10. Kamemoto, H., Kuehnle, A.R., 1996, ‘Breeding anturium in Hawaii’, University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii.
11. Kush, G.S., Virmani, S.S., 1996, ‘Haploids in plant breeding’, *In: Mohan Jain, S., Sopory, S.K., Veileux, R.E. (Eds.), In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, vol. 1, pp. 11-33, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht / Boston / London

12. Maluszynski, M., Szarejsko, I., Sigurbjornsson, B., 1996, 'Haploidy and mutation techniques. *In*: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (Eds.), *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants. Vol.1. pp: 67-93. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
13. Maluszynski, M., Kasha, K.J., Szarejsko, I., 2003, 'Published protocols for other crop plant species', *In*: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejsko, I., (Eds.), *Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual*, pp. 309-336, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston/London.
14. Puchooa, D., Sookun, D., 2003, 'Induced mutation and *in vitro* culture of *Anturium andreanum*. AMAS. Food and Agricultural Research Council, Reduit, Mauritius, pp. 17-27.
15. Radzan, M.K., 1993, 'An Introduction to Plant Tissue Culture', Intercept, Andover, Hampshire, UK, 398.
16. Saji, K.V., Sujatha, M., 1998, 'Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.)', *Euphytica*, vol. 103, pp. 1-7.
17. Shim, Y.S., Kasha, K.J., 2003, 'Barley microspora transformation protocol by biolistic gun', *In*: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejsko, I. (Eds.), *Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual*, pp. 363-366, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston/London.
18. Supena, E.D.J., 2004, 'Innovation in Microspora Embryogenesis in Indonesian Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.) and *Brassica napus* L.', Ph.D. Thesis, Wageningen University, Netherlands.
19. Thomas, W.T.B., Forster, B.P., Gertsson, B., 2003, 'Doubled haploids in breeding', *In*: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejsko, I. (Eds.), *Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual*, pp: 337-350, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston/London.
20. Winarto, B., 2009, 'Androgenesis: a breakthrough effort for preparing haploid or double-haploid plants in *Anthurium*', PhD thesis, Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture, Bogor Agriculture Institute, Bogor, Indonesia, 235 p.
21. Winarto, B., 2010, 'Improving growth and regeneration of explants derived from anther culture of *Anthurium* via improving culture media', *J. Hort.*, vol. 20, no. 4, pp. 342-351.
22. Winarto, B., 2011a, 'Effect of glutamine and serine on anther culture of *Anthurium andreanum* cv. 'Tropical'', *J. Hort.*, vol. 21, no. 4, pp. 295-305.
23. Winarto, B., 2011b, 'Chromosome staining and its application on determining ploidy level of plantlets derived from anther culture of *Anthurium*', *J. Hort.*, vol 21, no. 2, pp. 113-123.
24. Winarto, B., 2013a, 'Effect of basic medium and ammonium nitrate on formation and regeneration of calli and shoot multiplication derived from anther culture of *anthurium*', *J. Hort.*, vol. 23, no 1, pp. 9-20.

25. Winarto, B., 2013b, 'Studi penyiapan akar berkualitas untuk uji kromosom dan penggandaan kromosom plantlet hasil kultur anther *Anthurium andreanum* Linden ex André) cv. Tropical', *J. Hort.*, vol. 23, no. 3, pp. 203-217.
26. Winarto, B., 2014, 'Anther culture study on *Anthurium andreanum* cv. 'Casino', Laguna' and Safari'', Proceedings of National Floriculture Seminar, Indonesian Center for Horticulture Research and Development, IOCRI, Pacet-Cianjur, Indonesia, 29 August 2013, pp. 290-300.
27. Winarto, B., Hayati, N.A., Purwito, A., Marwoto, B., 2009, 'Effect of sucrose and glucose on successful induction and regeneration of callus derived from anther culture of *Anthurium*', *J. Biol. Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 165-172.
28. Winarto, B., Hayati, N.A., Purwito, A., Marwoto, B., 2010a, 'Improvement of selected induction media on callus induction in anther culture of *Anthurium* and a histological study on its callus formation', *J. Nat. Indonesia*, vol. 12, no. 2, pp. 93-101.
29. Winarto, B., Hayati, N.A., Purwito, A., Marwoto, B., 2010b, 'Application of 2,4-D and TDZ in formation and regeneration of callus derived from anther culture of anthurium', *J. Hort.*, vol. 20, no. 1, pp. 1-9.
30. Winarto, B., Mattjik, N.A., 2009a, 'Response of *Anthurium andreanum* Linden ex André cv. Carnaval anther in medium with various combinations of plant growth regulator concentrations', *J. Agron. Indonesia*, vol. 37, no.2, pp. 138-144.
31. Winarto, B., Mattjik, N.A., 2009b, 'Studies on anther culture of local accessions of *Anthurium*', *J. Hort.*, vol. 19, no. 4, pp. 386-395.
32. Winarto, B., Mattjik, N.A., Purwito, A., Marwoto, B., 2010c, 'Improvement of selected induction culture media on callus induction in anther culture of *Anthurium* and a histological study on its callus formation', *J. Nat. Indonesia*, vol. 12, no. 2, pp. 93-101.
33. Winarto, B., Mattjik, N.A., Teixeira da Silva, J.A., Purwito, A., Marwoto, B., 2010d, 'Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andreanum* Linden ex André) regenerants derived from anther culture', *Sci. Hort.*, vol. 127, pp. 86-90.
34. Winarto, B., Rachmawati, F., 2007, 'Preliminary study of anther culture of *Anthurium*', *J. Hort.*, vol. 17, no. 2, pp. 127-137.
35. Winarto, B., Rachmawati, F., Pramanik, D., Teixeira da Silva, J.A., 2011a, 'Morphological and cytological diversity of regenerants derived from *anthurium* anther culture', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 105, no. 3, pp. 363-374.
36. Winarto, B., Rachmawati, F., Teixeira da Silva, J.A., 2011b, 'New basal media for half-anther culture of *Anthurium andreanum* Linden ex André cv. Tropical', *Plant Growth Regul.*, vol. 65, no. 3, pp. 513-529.
37. Winarto, B., Teixeira da Silva, J.A., 2012, 'Influence of isolation technique of half-anthers and of initiation culture medium on callus induction and regeneration in *Anthurium andreanum*', *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, vol. 110, no. 3, pp. 401-411.



Gambar 2. Teknologi kultur anther *A. andranum* ‘Tropical’. a. Kultur anther pada awal kultur, b. Kalus yang teregenerasi dari kultur anther ± 2 bulan setelah kultur, c. Kalus hasil kultur anther ± 4 bulan setelah kultur, d. Kalus hasil kultur anther yang telah mengalami 2 kali subkultur dan diinkubasi di bawah kondisi terang dan siap untuk diregenerasi membentuk tunas (± 8 bulan setelah inkubasi), e. Kalus hasil kultur anther yang beregenerasi membentuk tunas ± 2 bulan setelah kultur, f. Tunas hasil perbanyakan tunas adventif pada medium WT yang ditambah dengan 0,5 mg/l TDZ dan 0,25 mg/l BA 2 bulan setelah kultur, g. Tunas yang sudah diakarkan dan siap digunakan untuk diaklimatisasi (2 bulan setelah kultur), h. Kondisi plantlet hasil kultur anther yang telah diaklimatisasi (± 3,5 bulan setelah aklimatisasi), i. Variasi kondisi tanaman hasil kultur anther yang telah di-repotting (± 6,5 bulan setelah aklimatisasi), j. Tanaman haploid ganda hasil penggandaan kromosom ± 3 bulan setelah aklimatisasi, k. Warna bunga *A. andranum* ‘Tropical’, l-q. Variasi warna bunga yang dihasilkan dari aplikasi teknologi kultur anther.



Gambar 3. Variasi ploidi tanaman hasil kultur anther *A. andreaum* 'Tropical'. a. Jumlah kromosom sel pada tanaman haploid, b. Jumlah kromosom sel pada tanaman diploid, c. Jumlah kromosom sel pada tanaman triploid, e. Jumlah kloroplas pada daun tanaman haploid, f. Jumlah kloroplas pada daun tanaman diploid dan g. Jumlah kloroplas pada daun tanaman triploid.

4. Teknologi perbanyakan Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.) secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.

Pendahuluan

Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.) merupakan salah satu bunga potong penting yang dibudidayakan di seluruh dunia dan masuk dalam peringkat puncak bunga potong dunia (Duhoky *et al.*, 2009). Bunga anyelir memiliki bentuk yang menarik, variasi ukuran, kaya warna baik tunggal maupun banyak warna (*multicolors*) dengan daya simpan yang cukup lama (Danial *et al.*, 2009), namun pengembangan tanaman ini, termasuk di Indonesia sering diperhadapkan pada masalah keterbatasan benih yang berkualitas.

Secara tradisional tanaman ini diperbanyak secara vegetatif dengan cara penyetekan. Cara ini tidak efisien untuk pengembangan tanaman skala komersial karena rendahnya kualitas dan jumlah benih yang dihasilkan (Onamu *et al.*, 2003). Di samping itu penyiapan benih dengan cara ini sering diperhadapkan pada masalah penurunan kualitas, vigoritas dan ukuran bunga akibat infeksi virus yang menyerang tanaman induk yang digunakan dalam penyediaan benih (Onamu *et al.*, 2003; Danial *et al.*, 2009). Oleh karena teknologi perbanyakan benih yang berkualitas menjadi kebutuhan penting dalam pengembangan tanaman anyelir pada skala komersial.

Beberapa teknologi perbanyakan anyelir secara *in vitro* telah berhasil dikembangkan dan dilaporkan. Teknologi tersebut diaplikasikan menggunakan variasi sumber eksplan seperti: tunas pucuk, nodus daun, sepal, petal, reseptakel dan tangkai stilus pada medium Murashige dan Skoog (MS) dan modifikasinya, serta penambahan hormon BA (0,2-4 mg/l) (Ali *et al.*, 2008; Karami, 2008; Danial *et al.*, 2009; Duhoky *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2011). Teknologi tersebut berhasil diaplikasikan pada *D. caryophyllus* 'Nelson', 'Sagres', 'Spirit' and 'Impulse' (Karami, 2008), namun belum dilaporkan pada *D. caryophyllus* 'Maldives'. Teknologi tersebut umumnya menggunakan metode proliferasi tunas aksiler, sementara yang menggunakan metode proliferasi tunas adventif hanya dilaporkan oleh Kantia dan Kothari (2002) pada *D. chinensis* dan Kanwar dan Kumar (2009) pada *D. caryophyllus* 'Indios'.

Metode perbanyakan *D. caryophyllus* 'Maldives' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif berhasil dikembangkan dan dipublikasikan (Winarto *et al.*, 2005). Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas adventif, (4) perbanyakan tunas adventif, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 4).

Teknologi perbanyakan *D. caryophyllus* 'Maldives' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.

Bahan dan alat

Bahan

- *D. caryophyllus* 'Maldives'
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck)
- N6-benzyladenine (BA= 0,1 mg/l) dan α -naphthalene acetic acid (NAA= 0,01-0,02 mg/l) (Sigma)
- Agar Type 900 (Selangor, Malaysia)
- 1% dan 2% (5,25% NaOCl)
- Sukrosa (30 g/l) (Merck)
- Alkohol 70%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Benlate (1%, 50% benomil)
- Media pot (arang sekam dan humus)
- NPK (20:15:15)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol kultur (Erlenmeyer 100 ml)
- Botol sterilisasi (Erlenmeyer 1000 ml)
- Pinset (25 cm)

- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 cm)
- Polibag (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *D. caryophyllus* 'Maldives' dalam bentuk stek tunas lateral yang berumur \pm 6 bulan. Stek ditanam dalam polybag (diameter 20 cm) yang berisi campuran arang sekam dan humus (1:1, v/v) dan ditempatkan dalam rumah kaca. Tanaman donor dipelihara melalui melalui penyiraman dan pemupukan. Pupuk cair (2 g/l NPK 20:15:15) diaplikasikan setiap 3 hari sekali. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Pemotongan tunas pucuk secara berulang dilakukan untuk mempertahankan tanaman tetap dalam vase pertumbuhan vegetatif. Tunas lateral dengan 2-3 daun dipanen dari tanaman induk dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tunas lateral yang dipanen diberi pra-perlakuan dengan 1% larutan sabun selama 10 menit sambil digojok, dibilas dengan air mengalir selama 30 menit. Selanjutnya eksplan disterilisasi dengan alkohol 70% selama 5 menit, 1% larutan natrium hipoklorit (NaOCl) selama 10 menit dan 2% NaOCl selama 5 menit, setelah itu dibilas dengan air destilasi steril 4-5 kali (@ 5 menit). Eksplan yang sudah steril selanjutnya ditiriskan dalam cawan petri steril dan siap digunakan.

Setelah sterilisasi, daun pertama (\pm 1 cm, warna kuning kehijauan) yang masih muda diambil dan dipisahkan dari batang secara hati-hati menggunakan pinset dan pisau kultur. Daun kemudian dipotong secara memanjang menjadi dua bagian dan diambil bagian pangkalnya \pm 0,5 cm. Daun dilukai dengan pisau kultur untuk meningkatkan potensi regenerasi sel membentuk kalus, selanjutnya ditanam dalam media inisiasi dengan posisi terbalik (van Altvorst *et al.*, 1994; Perez-Tornero *et al.*, 2000).

Inisiasi tunas adventif

Inisiasi tunas adventif dilakukan dengan cara menanam potongan daun yang telah dipersiapkan pada medium MS yang ditambah dengan 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA, 30 g/l sukrosa dan 9 g/l agar Type 900. Kultur disimpan dalam ruang inkubasi di bawah kondisi terang dengan 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama 6 minggu. Bakal tunas adventif mulai terbentuk ± 10 hari setelah kultur pada bagian pangkal potongan eksplan. Jumlah dan ukuran tunas adventif makin bertambah dan terlihat jelas pada 14-16 hari setelah kultur. Tunas dengan 3-5 daun mudah diamati 6 minggu setelah kultur.

Perbanyak tunas adventif

Perbanyak tunas adventif dilakukan dengan cara memindahkan dan memecah eksplan dengan bakal tunas ke medium MS yang mengandung 0,1 mg/l BA dan 0,02 mg/l NAA, 30 g/l sukrosa dan 9 g/l agar Type 900. Kultur diinkubasi dengan kondisi inkubasi yang sama dengan tahap inisiasi selama 6 minggu. Subkultur tunas adventif dapat dilakukan 4 kali dengan periode subkultur setiap 6 minggu. Subkultur lebih dari 4 kali tidak disarankan karena dapat menurunkan kualitas tunas yang dihasilkan.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 pasang daun dan 2-3 cm tinggi tunas pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah 30 g/l sukrosa dan 9 g/l agar Type 900. Kultur tunas diinkubasi pada kondisi yang sama seperti tahap sebelumnya. Bakal akar mulai terbentuk 5-7 hari setelah kultur. Jumlah dan panjang akar makin bertambah seiring dengan waktu inkubasi. Pada medium tersebut persentase pengakaran, jumlah akar dan panjang akar yang optimal dapat diamati 1 bulan setelah kultur.

Aklimatisasi plantlets

Tunas berakar yang diperoleh setelah inkubasi selama 20 hari pada media $\frac{1}{2}$ MS diambil secara hati-hati dari botol kultur, dicuci dengan air

mengalir untuk menghilangkan agar yang melekat pada akar, kemudian direndam dalam larutan Benlate 1% (50% benomil) selama 1 menit. Selanjutnya plantlet ditanam dalam pot plastik untuk semaian benih (ukuran 30 x 60 cm dengan 72 lubang) yang diisi dengan campuran humus dan arang sekam (1:1, v/v). Pot plastik selanjutnya ditutup dengan plastik transparan selama 7 hari pertama aklimatisasi. Plantlet diaklimatisasi di ruang inkubasi selama 1 bulan dan dipindahkan ke polibag (diameter 20 cm) yang berisi media yang sama dan dipindahkan ke rumah kaca.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakan *D. caryophyllus* ‘Maldives’ secara *in vitro* mulai tahap inisiasi hingga aklimatisasi berhasil dikembangkan dalam waktu \pm 1,9 tahun. Titik kritis terdapat pada tahap inisiasi dan aklimatisasi plantlets. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 4-8 tunas. Jika rata-rata tunas yang dihasilkan adalah 5 tunas tiap subkultur, 4 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 3.000 tunas dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 2.700 plantlets akan dihasilkan setelah 8 bulan. Teknologi ini berhasil diaplikasikan pada berbagai varietas anyelir hasil pemuliaan Balithi, seperti: ‘Brenda’, ‘Laura’ dan ‘Sitari’. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, proliferasi, khususnya konsentrasi ZPT (dinaikkan atau diturunkan) kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih anyelir. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Ali, A., Afrasiab, H., Naz, S., Rauf, M., Iqbal, J., 2008, ‘An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus*)’, *Pak. J. Bot.*, vol. 40, no. 1, pp. 111-121.

2. Danial, G.H., Yousif, A.N., Omar, 2009, 'Clonal propagation of *Dianthus caryophyllus* L. through tissue culture', The 2nd Kurdistan Conference on Biological Sciences, J. Duhok Univ., vol. 12. no. 1 (Special Issue), pp. 91-95, University of Duhok 6-8 May, 2008.
3. Duhoky, M.M.S., Salman, M.A., Amin, M.E.M., 2009, 'Micropropagation of carnation *Dianthus caryophyllus* L.', The 2nd Kurdistan Conference on Biological Sciences, J. Duhok Univ., vol. 12. no. 1 (Special Issue), pp. 61-66, University of Duhok 6-8 May, 2008.
4. Hassan, A.K.M., Munshi, J.L., Sultana, R., Jahan, M.A.A., Khatun, R., 2011, 'High Frequency *In Vitro* Regeneration of *Dianthus caryophyllus* L., a Herbaceous Perennial Ornamental Plant', *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, vol. 46, no. 4, pp. 495-498.
5. Kantia, A., Kothari, S.L., 2002, 'High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L.', *Sci. Hort.*, vol. 96, pp. 205-212
6. Karami, O., 2008, 'Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)', *OnLine J. Biol. Sci.*, vol. 8, no. 4, pp. 68-72.
7. Onamu, R., Obukosia, S.D., Musembi, N., Hutchinson, M.J., 2003, 'Efficacy of thidiazuron in in vitro propagation of carnation shoot tips: Influence of dose and duration of exposure', *Afr. Crop. Sci. J.*, vol. 11, no. 2, pp. 125-132.
8. Winarto, B., Aziz, M.A., Rashid, A.A., Ismael, M.R., 2005, Perbanyakan Anyelir Secara *In Vitro* Melalui Induksi Pembentukan Tunas Adventif', *J. Hort.* 15(1): 17-25.



Gambar 4. Teknologi perbanyakan *D. caryophyllus* 'Maldives' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif. a. Tunas pucuk yang digunakan sebagai sumber eksplan, b. Potongan eksplan daun muda yang telah dilukai dan siap dikultur, c. Kondisi eksplan daun 5-7 hari setelah kultur, d. Tunas adventif yang teregenerasi ± 14 hari setelah kultur, e. Pertumbuhan tunas adventif ± 22 hari setelah kultur, f. Kondisi dan jumlah tunas adventif 6 minggu setelah kultur, g. Tunas adventif saat disubkultur untuk tujuan perbanyakan, h. Tunas adventif hasil perbanyakan 6 minggu setelah kultur, i. Kondisi akar yang dihasilkan pada tunas yang dikultur pada medium $\frac{1}{2}$ MS, j. Plantlets 1 bulan setelah aklimatisasi, k. Tanaman hasil aklimatisasi 3 bulan setelah tanam.

5. Teknologi perbanyakan Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.) secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler.

Pendahuluan

Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.) merupakan salah satu bunga potong penting di Indonesia yang diperbanyak melalui penyetekan. Cara ini tidak efisien untuk pengembangan tanaman skala komersial karena rendahnya kualitas dan jumlah benih yang dihasilkan (Onamu *et al.*, 2003). Di samping itu penyiapan benih dengan cara ini sering diperhadapkan pada masalah penurunan kualitas, vigoritas dan ukuran bunga akibat infeksi virus yang menyerang tanaman induk yang digunakan sebagai sumber benih (Onamu *et al.*, 2003; Danial *et al.*, 2009). Oleh karena teknologi perbanyakan benih yang berkualitas menjadi kebutuhan penting dalam pengembangan tanaman anyelir pada skala komersial.

Beberapa teknologi perbanyakan anyelir secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler telah dilaporkan pada *D. caryophyllus* 'Yair' (Onamu *et al.*, 2003), 'Chabaud' (Pareek *et al.*, 2004), 'Nelson', 'Sagres', 'Spirit' and 'Impulse' (Karami, 2008), 'Eskimo Mogr' dan 'Innove Orange Bogr' (Kharrazi *et al.*, 2011); namun belum dilaporkan pada *D. caryophyllus* 'Maldives'.

Protokol perbanyakan *D. caryophyllus* 'Maldives' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan (Winarto *et al.*, 2003). Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas aksiler, (4) perbanyakan tunas aksiler, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 5)

Teknologi perbanyakan *D. caryophyllus* 'Maldives' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler.

Bahan dan alat

Bahan

- *D. caryophyllus* 'Maldives'
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck)

- N6-benzyladenine (BA= 0,1 mg/l) dan α -naphthalene acetic acid (NAA= 0,01-0,02 mg/l) (Sigma)
- Agar Type 900 (Selangor, Malaysia)
- 1% dan 2% (5,25% NaOCl)
- Sukrosa (30 g/l) (Merck)
- Alkohol 70%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Benlate (1%, 50% daconil)
- Media pot (arang sekam dan humus)
- NPK (20:15:15)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol kultur (Erlenmeyer 100 ml)
- Botol sterilisasi (Erlenmeyer 1000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 cm)
- Polibag (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *D. caryophyllus* 'Maldives' dalam bentuk stek tunas lateral yang berumur \pm 6 bulan. Stek ditanam dalam polybag (diameter 20 cm) yang berisi campuran arang sekam dan humus (1:1, v/v) dan ditempatkan dalam rumah kaca. Tanaman donor dipelihara melalui melalui penyiraman dan pemupukan. Pupuk cair (2 g/l NPK 20:15:15) diaplikasikan setiap 3 hari sekali. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri

maupun jamur. Pemotongan tunas pucuk secara berulang dilakukan untuk mempertahankan tanaman tetap dalam vase pertumbuhan vegetatif. Tunas lateral dengan 2-3 daun dipanen dari tanaman induk dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tunas lateral yang dipanen dari tanaman stok, disterilisasi dengan larutan sabun 5% selama 10 menit, dibilas dengan air mengalir selama 30 menit. Selanjutnya eksplan disterilisasi dengan alkohol 70% selama 5 menit, 1% larutan sodium hipoklorit (NaOCl) selama 10 menit dan 2% larutan NaOCl selama 5 menit, setelah itu dibilas dengan air destilasi steril 4-5 kali (@ 5 menit). Eksplan yang sudah steril selanjutnya ditiriskan di cawan petri steril dan siap digunakan.

Setelah sterilisasi, semua daun yang melekat pada batang dibuang secara hati-hati menggunakan pinset dan pisau kultur. Nodus batang yang ke-1 yang terletak tepat di bawah tunas pucuk kemudian dipotong dengan panjang ukuran ± 1 cm dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Inisiasi tunas aksiler

Inisiasi tunas aksiler dilakukan dengan cara menanam nodus ke-1 yang telah dipersiapkan pada medium MS yang ditambah dengan 1 mg/l BA dan 0,05 mg/l NAA, 30 g/l sukrosa dan 9 g/l agar Type 900. Kultur daun kemudian disimpan dalam ruang inkubasi di bawah kondisi terang dengan 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama 6 minggu. Bakal tunas aksiler yang ada di daerah nodus mulai tumbuh ± 5 hari setelah kultur. Jumlah dan ukuran tunas aksiler makin bertambah dan terlihat jelas pada 14-16 hari setelah kultur. Tunas dengan 3-5 daun mudah diamati 6 minggu setelah kultur.

Perbanyakan tunas aksiler

Perbanyakan tunas aksiler dilakukan dengan cara mengisolasi dan menanam nodus 1 hasil inisiasi pada medium MS yang sama dengan tahap inisiasi. Kultur diinkubasi dengan kondisi inkubasi yang sama

dengan tahap inisiasi selama 6 minggu. Subkultur tunas adventif dapat dilakukan 4 kali dengan periode subkultur setiap 6 minggu. Subkultur lebih dari 4 kali tidak disarankan karena dapat menurunkan kualitas tunas yang dihasilkan.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 pasang daun dan 2-3 cm tinggi tunas pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah 30 g/l sukrosa dan 9 g/l agar Type 900. Kultur tunas diinkubasi pada kondisi yang sama seperti tahap sebelumnya. Bakal akar mulai terbentuk 5-7 hari setelah kultur. Jumlah dan panjang akar makin bertambah seiring dengan waktu inkubasi. Pada medium tersebut persentase pengakaran, jumlah akar dan panjang akar yang optimal dapat diamati 1 bulan setelah kultur.

Aklimatisasi plantlets

Tunas berakar yang diperoleh setelah inkubasi selama 20 hari pada media $\frac{1}{2}$ MS diambil secara hati-hati dari botol kultur, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan agar yang melekat pada akar, kemudian direndam dalam larutan Benlate 1% (50% benomil) selama 1 menit. Selanjutnya plantlet ditanam dalam pot plastik untuk semaian benih (ukuran 30 x 60 cm dengan 72 lubang) yang diisi dengan campuran humus dan arang sekam (1:1, v/v). Pot plastik selanjutnya ditutup dengan plastik transparan selama 7 hari pertama aklimatisasi. Plantlet diaklimatisasi di ruang inkubasi selama 1 bulan dan dipindahkan ke polibag (diameter 20 cm) yang berisi media yang sama dan dipindahkan ke rumah kaca.

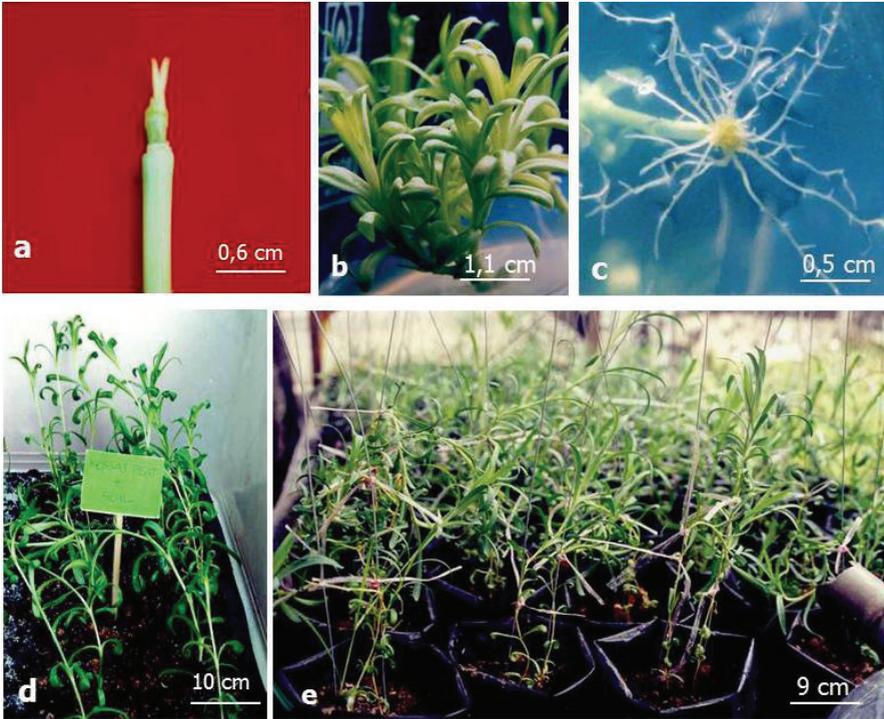
Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakan *D. caryophyllus* 'Maldives' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan. Waktu yang dibutuhkan \pm 1,6 tahun. Masalah yang sering terjadi adalah munculnya vitrifikasi. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 3-7 tunas. Jika rata-rata tunas yang dihasilkan

adalah 5 tunas tiap subkultur, 4 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 3.000 tunas dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 2.700 plantlets akan dihasilkan setelah 8 bulan. Teknologi ini berhasil diaplikasikan pada berbagai varietas anyelir hasil pemuliaan Balithi, seperti: 'Brenda', 'Laura' dan 'Sitari'. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, proliferasi, khususnya konsentrasi ZPT (dinaikkan atau diturunkan) kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih anyelir. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Danial, G.H., Yousif, A.N., Omar, 2009, 'Clonal propagation of *Dianthus caryophyllus* L. through tissue culture', The 2nd Kurdistan Conference on Biological Sciences, J. Duhok Univ., vol. 12. no. 1 (Special Issue), pp. 91-95, University of Duhok 6-8 May, 2008.
2. Karami, O., 2008, 'Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)', *OnLine J. Biol. Sci.*, vol. 8, no. 4, pp. 68-72.
3. Kharrazi, M., Nemati, H., Tehranifar, A., Bagheri, A., Sharifi, A., 2011, 'In Vitro Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Focusing on the Problem of Vitrification', *J. Biol. Environ. Sci.*, vol. 5, no. 13, pp. 1-6.
4. Onamu, R., Obukosia, S.D., Musembi, N., Hutchinson, M.J., 2003, 'Efficacy of thidiazuron in in vitro propagation of carnation shoot tips: Influence of dose and duration of exposure', *Afr. Crop. Sci. J.*, vol. 11, no. 2, pp. 125-132.
5. Pareek, A., Kantia, A., Kothari, S.L., 2004, 'In vitro cloning of ornamental species of *Dianthus*', *Indian J. Biotechnol.*, vol. 3, pp. 263-266.
6. Winarto, B., Aziz, M.A., Rashid, A.A., Ismael, M.R., 2003, In vitro propagation of carnation (*Dianthus carophyllus* L. 'Maldives') through axillary proliferation form nodal explants', *J. Agrotropika*, vol 8, no. 1, pp. 5-13.



Gambar 5. Teknologi perbanyakan *D. caryophyllus* 'Maldives' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler a. Tunas pucuk yang digunakan sebagai sumber eksplan, b. Nodus eksplan dengan tunas aksiler pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah 1 mg/l BA dan 0,05 mg/l NAA. c. Kondisi akar yang dihasilkan pada tunas yang dikultur pada medium $\frac{1}{2}$ MS, d. Plantlets 1 bulan setelah aklimatisasi, e. Tanaman hasil aklimatisasi 3 bulan setelah tanam.

6. Teknologi perbanyakan *Dendrobium* 'Zahra FR 62' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi protocorm like bodies (plb).

Pendahuluan

Dendrobium merupakan salah satu anggrek penting dan bernilai ekonomi tinggi di Indonesia. Anggrek ini mendominasi agribisnis anggrek di pasar lokal maupun untuk tujuan ekspor. Untuk tujuan ekspor, anggrek ini memiliki nilai ekspor tertinggi (34 %), diikuti *Oncidium* (26 %), *Cattleya* (20 %), *Vanda* (17 %), dan *Phalaenopsis* (3 %) (Direktoral Jendral Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian Deptan, 2005). Di pasar lokal, anggrek ini dijual dengan harga mulai Rp. 25.000,00 – 185.000,00 per pot, seedling mulai Rp. 8.000,00 remaja mulai Rp. 17.000,00 (Sani Orchids, 2014). Anggrek ini dibudidayakan secara luas di Indonesia dan menguasai lebih dari 50 % bisnis anggrek secara umum. Total luas lahan di Indonesia \pm 1.117.334 m² dengan produktivitas \pm 20.727.891 tangkai/tahun pada 2012 (BPS, 2014). Jenis anggrek ini semakin populer dan banyak diminati pasar (Kuehnle, 2007; Yusnita, 2012). Permintaan pasar terus meningkat, namun kendala pengembangan terkait dengan penyediaan benih berkualitas masih menjadi permasalahan dasar yang belum dapat diselesaikan.

Secara konvensional, *Dendrobium* umumnya diperbanyak melalui pemisahan anakan dan stek, induksi tunas aksiler maupun keiki. Cara tersebut umumnya hanya menghasilkan bibit dalam jumlah yang terbatas, beragam dengan waktu yang lama (Goh, 1990; Arditti, 1992), karena itu aplikasi teknologi perbanyakan masa secara *in vitro* lebih potensial dan menjanjikan dalam penyediaan bibit berkualitas (Park *et al.*, 2002). Pada *Dendrobium* beberapa teknologi perbanyakan masa secara *in vitro* telah diaplikasikan pada *Dendrobium* 'Chiangmai Pink' (Chung *et al.*, 2005 dan 2007), *D. microbulbon* (Sharma *et al.*, 2007), *D. transparens* (Sunitabala dan Kishor, 2009), *D. primulinum* (Pant dan Tapa, 2012), *D. aggregatum* (Vijayakumar *et al.*, 2012). Teknologi tersebut dikembangkan menggunakan variasi sumber eksplan, seperti: tunas pucuk, potongan batang semu, nodus, daun, biji; sementara media dasar yang digunakan

adalah Murashige dan Skoog (MS) dengan variasi modifikasinya, sedangkan teknologi perbanyakan *Dendrobium* 'Zahra FR 62' secara *in vitro* belum pernah dilaporkan.

Teknologi perbanyakan *Dendrobium* 'Zahra FR 62' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi protocorm like bodies (plbs) telah berhasil dikembangkan (Winarto *et al.*, 2013). Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi plbs, (4) perbanyakan plbs, (5) perkecambahan dan penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 6)

Teknologi perbanyakan *Dendrobium* 'Zahra FR 62' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi protocorm like bodies (plb).

Bahan dan alat

Bahan

- *Dendrobium* 'Zahra FR 62'
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- ZPT Thidiazuron (TDZ, 0,3-1 mg/l), N6-benzyladenine (BA, 0,05-0,5 mg/l), α -naphthalene acetic acid (NAA, 0,1 mg/l) (Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)
- 0.05% HgCl₂ (Merck)
- Sukrosa (30 g/l) (Merck)
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Tween 20 (Applichem)
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang kayu dan potongan pakis)
- NPK (20:15:15)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Erlenmeyer 100 ml
- Bioreactor 3L
- Alat pengukur aliran udara (Airflow meter)
- Botol chicken brand/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Pot plastik/tanah (diameter 15 dan 25 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *Dendrobium* 'Zahra FR 62 yang tumbuh subur dan sehat, berumur 1-1,5 tahun. Tanaman donor ditanam dalam pot-pot plastik [diameter 25 cm, berisi campuran arang kayu dan potongan pakis (1:1, v/v)]. Tanaman donor ditempatkan dalam rumah kaca/rumah plastik dan dipelihara melalui melalui penyiraman dan pemupukan. Tanaman disiram setiap pagi dan dipupuk cair (2 g/l NPK 20:15:15) diaplikasikan setiap 3 hari sekali untuk mendukung pertumbuhan vegetatif tanaman. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Tunas-tunas lateral (\pm 1 cm) yang muncul dibagian pangkal batang semu dari tanaman donor selanjutnya dipanen dan digunakan sumber eksplan

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tunas lateral yang dipanen selanjutnya diberi pra-perlakuan dengan meletakkan eksplan di bawah air mengalir selama 1-2 jam. Eksplan selanjutnya direndam dalam 1% larutan Tween 20 selama 30 menit

sambil digojok, kemudian dibilas beberapa kali dengan air hingga bersih. Eksplan dibawa ke dalam laminar air flow cabinet dan disterilisasi menggunakan 0.05% HgCl₂ yang telah ditambah beberapa tetes Tween 20 selama 10 menit sambil digojok. Eksplan kemudian dibilas dengan air destilata steril 5-6x (@ 3-5 menit) dan ditiriskan beberapa saat dalam botol sterilisasi yang ditutup ujungnya dengan tisu steril untuk mengurangi jumlah air yang menempel pada permukaan eksplan.

Setelah sterilisasi, tunas diambil dan diletakkan di atas cawan Petri steril. Beberapa seludang/bakal daun yang menutupi tunas pucuk selanjutnya dibuang menggunakan pisau kultur. Tunas pucuk kemudian dipotong dengan ukuran ± 4 mm dan siap digunakan sebagai sumber eksplan untuk inisiasi plbs.

Inisiasi plbs

Inisiasi plbs dilakukan dengan menanam tunas pucuk pada medium ½ MS semi padat yang mengandung 1 mg/l TDZ, 0,5 mg/l BA, 20 g/l sukrosa, 2 g/l gelrite dan diinkubasi pada kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas ~ 13 μmol/m²/s selama ± 2 bulan selama 2-3 bulan. Subkultur berulang setiap 15 hari sekali dilakukan untuk meningkatkan dan mempercepat proses inisiasi plbs. Inisiasi plbs melalui pembentukan kalus pada bagian pangkal tunas pucuk mulai terlihat 2,5 bulan setelah kultur. Tunas dengan bakal plbs selanjutnya dipindahkan pada medium ½ MS cair yang ditambah 0,3 mg/l TDZ dan 0,1 mg/l NAA. Subkultur secara periodik setiap 15 hari sekali tetap dilakukan untuk meningkatkan kecepatan pertumbuhan dan perkembangan plbs. Pada tahap ini dapat dihasilkan 5-10 clump plbs yang siap untuk digunakan pada tahap perbanyakan.

Perbanyakan plbs

Perbanyakan plbs dilakukan dengan mensubkultur clump hasil inisiasi kedalam medium ½ MS yang ditambah 0,05 mg/l BA, 20 g/l sukrosa. Pada tahap perbanyakan awal clumps dan medium ½ MS cair ditempatkan dalam Erlenmeyer 100 ml, 2,5 g/25 ml medium, dan subkultur secara periodik 1 bulan sekali dilakukan untuk meningkatkan

jumlah clumps dan mengubah bentuk clump menjadi plbs. Setelah mengalami periode subkultur 5-6 kali jumlah plbs makin bertambah banyak dan dapat digunakan untuk tahap perbanyakan ke-2 menggunakan bioreactor 3 L. Untuk perbanyakan plbs dalam bioreactor, 10 g plbs/500 ml medium dengan 10 vessel volumes per minute (vvm) atau 15 g plbs/500 ml dengan 5 vvm dapat digunakan untuk perbanyakan plbs. Pada tahap ini subkultur plbs dapat dilakukan 3-4 kali. Baik perbanyakan menggunakan Erlenmeyer maupun bioreactor kultur plbs ditempatkan pada kondisi terang dengan 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Setelah perbanyakan menggunakan bioreactor, plbs siap untuk dikecambahkan.

Perkecambahan dan Penyiapan plantlets

Perkecambahan plbs dilakukan dengan menanam plbs dalam medium $\frac{1}{2}$ MS semi padat dengan vitamin penuh tanpa hormon yang diinkubasi pada kondisi yang sama selama 2 bulan. Pada tahap ini plbs umumnya mulai berkecambah 15 hari setelah kultur. Pada akhir inkubasi plbs berkecambah tumbuh dan berkembang membentuk 2-3 daun, namun belum berakar. Subkultur setiap 1,5-2 bulan kecambah plbs pada medium dan kondisi yang sama akan meningkatkan pertumbuhan dan kemampuan kecambah menghasilkan akar. Pada subkultur pertama, sebagian kecambah plbs umumnya dapat membentuk akar 1-2 akar per kecambah. Jumlah daun dan akar dapat meningkat hingga 3-5 daun dan 2-4 akar pada akhir subkultur ke-2.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 3-5 daun dan 2-4 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar dengan cara mencuci akar di bawah air mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan diatas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam pot-pot plastik yang berisi potongan pakis yang telah dibasahi dan cukup

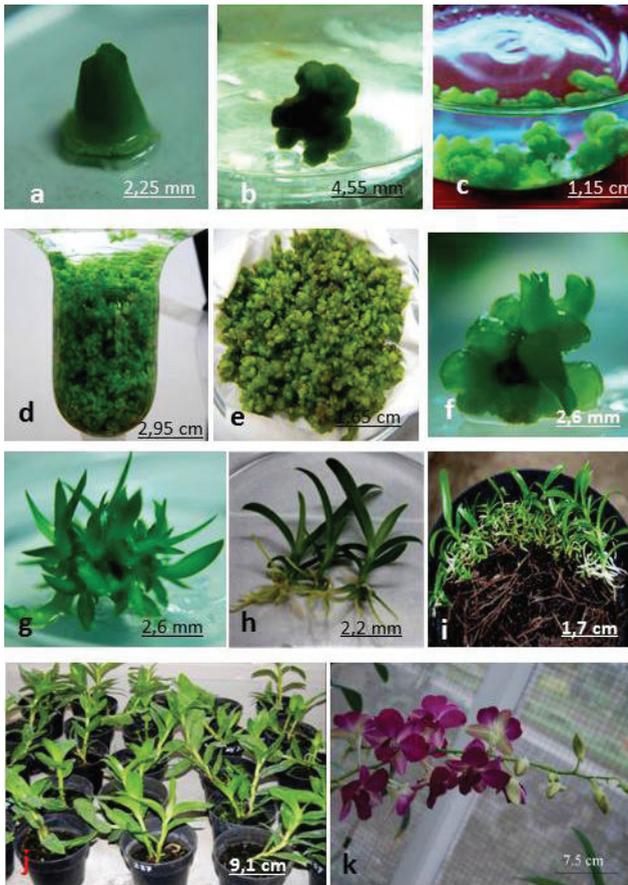
dengan air. Tempatkan pot-pot plastik pada tempat teduh. Setelah 1,5-2 bulan masa aklimatisasi, tanaman mulai dipupuk NPK yang dicairkan (0,5-1 g/l, 20:15:15) yang diaplikasikan 3 hari sekali. Setelah tanaman tumbuh baik, tanaman dapat dipindahkan secara individu pada pot-pot plastik/tanah yang diisi dengan campuran arang kayu dan potongan pakis (1:1, v/v) Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 80-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakan *Dendrobium* 'Zahra FR 62' secara *in vitro* dari inisiasi hingga aklimatisasi plantlets membutuhkan waktu \pm 2,3 tahun. Titik kritis teknologi ini terletak pada tahap inisiasi plbs dan munculnya pencoklatan plbs. Teknologi ini juga telah dikembangkan lebih lanjut menggunakan aplikasi air kelapa sebagai sumber hormone dan media generic pada tahap perbanyakan, perkecambahan dan penyiapan plantletnya. Aplikasi subkultur berulang setiap 15 hari pada tahap awal dan 1 bulan sekali pada tahap perbanyakan ternyata dapat membantu meningkatkan kemampuan inisiasi dan proliferasi plbs. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 5-10 plbs. Jika rata-rata produksi plbs per subkultur (1 bulan sekali) adalah 5 plbs, 8 kali subkultur dapat dilakukan, maka total plbs yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 39.000 plbs dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan perkecambahan dan penyiapan plantlets adalah 20%, maka 31.200 plantlets akan dihasilkan setelah \pm 16 bulan; kemudian kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 28.000 plantlets setelah aklimatisasi akan dihasilkan setelah \pm 18 bulan. Teknologi ini berhasil diaplikasikan juga pada *Dendrobium* 'Gradita 10', 'Gradita 31' (Winarto dan Rachmawati, 2013), dan klon terseleksi *Dendrobium* yang lain. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi hormon (dinaikkan atau diturunkan) dan penggunaan arang aktif kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih berkualitas *Dendrobium*. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Chung, H.H., J.T. Chen and W.C. Chang. 2005, 'Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* 'Chiengmai Pink' and subsequent plant regeneration', *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*, vol. 41, no. 4, pp. 765-769.
2. Biro Pusat Statistik (BPS), 2014, 'Luas Panen, Produksi dan Produktivitas Anggrek, 2009-2013', Viewed 21 Juli 2014 at: <[http://www. www.bps.go.id/](http://www.www.bps.go.id/)>
3. Direktorat Jendral Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian, 2005, 'Road Map Pascapanen dan Pemasaran Anggrek 2005-2010", Departemen Pertanian.
4. Luo, J.P., Wang, Y., Zha, X.Q., Huang, L., 2008, 'Micropropagation of *Dendrobium den-siflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids', *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, vol. 93, pp. 333-340.
5. Kuehnle, A.R., 2007, 'Orchids, *Dendrobium*', In: Anderson, N.O. (ed.), *Flower Breed, Genet.* Springer, pp.539-560.
6. Pant, B., Thapa, D., 2012, '*In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 42, pp. 9970-9974.
7. Sani Orchids, 2014, 'Katalog Harga Anggrek di Sani Orchids', Viewed 21 Juli 2014 at: < <http://www.sanibusiness.com/>>
8. Sharma, U., Rama Rao, V., Mohan, J.S.S., Reddy, A.S., 2007, 'In vitro propagation of *Dendrobium microbulbon* A. Rich-A rare ethnomedicinal herb', *Indian J. Biotech.*, vol. 6, pp. 381-384.
9. Sunitabal, H., Ksihor, R., 2009, 'Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments', *Indian J. Biotech.*, vol. 8, pp. 448-452.
10. Winarto, B., Rachmawati, F., 2013, '*In vitro* propagation protocol of *Dendrobium* 'Gradita 31' via protocorm like bodies', *Thammasat Int. J. Sci. Tech.*, vol. 18, no. 2, pp. 54-68.
11. Winarto, B., Rachmawati, F., Santi, A., Teixeira da Silva, J.A., 2013, 'Mass propagation of *Dendrobium* 'Zahra FR 62', a new hybrid used for cut flowers, using bioreactor culture', *Sci. Hort.*, vol. 161, pp. 170-180.
12. Vijayakumar, S., Rajalkshmi, G., Kalimuthu, K., 2012, 'Propagation of *Dendrobium aggregatum* by green capsule culture', *Lankesteriana*, vol. 12, no. 2, pp. 131-135.
13. Yusnita, 2012, 'Pemuliaan Tanaman Untuk Menghasilkan Anggrek Hibrida Unggul', Lembaga Penelitian Universitas Lampung, 180 hal.



Gambar 6. Teknologi perbanyakan *Dendrobium* 'Zahra FR 62' secara *in vitro*. melalui inisiasi dan proliferasi plbs, (a) Tunas pucuk sebagai sumber eksplan, b. Tunas pucuk dengan beberapa bakal plbs 3,5 bulan setelah kultur, c. Proliferasi awal plbs setelah subkultur ke-2, d. Pertumbuhan dan proliferasi plbs dalam bioreactor 3L dengan 10 vvm yang berisi medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 150 ml/l air kelapa, e. Penampilan plbs hasil perbanyakan dalam bioreactor 3L, g. awal perkecambahan plbs pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah 0,05 mg/l BA \pm 15 setelah kultur, h. Plbs yang berkecambah 3 bulan setelah kultur, h. Plantlets hasil pengakaran yang siap diaklimatisasi, i. Plantlet hasil aklimatisasi pada umur 15 hari setelah aklimatisasi, j. Tanaman tunggal hasil pengepotan ulang 6 bulan setelah repotting, k. Bunga *Dendrobium* 'Zahra FR 62'.

7. Teknologi perbanyakkan *Gerbera jamesonii* Bolus secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk

Pendahuluan

Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) merupakan salah satu anggota famili Asteraceae yang memiliki nilai ekonomi tinggi sebagai bunga potong (Naz *et al.*, 2012). Gerbera ini memiliki bunga yang kaya warna, menarik dan atraktif. Di dunia, bunga potong ini masuk dalam 10 besar bunga potong penting yang dipasarkan di dunia (Tyagi dan Kothari, 2004). Di Indonesia gerbera juga merupakan bunga potong penting yang diperjual-belikan di pasar bunga dan menempati urutan ke 6 status produksinya setelah anggrek (<http://www.bps.go.id>, 2012). Permintaan pasar akan produk bunga potong ini mencapai 10.543.445 tangkai pada tahun 2011 dengan harga jual di tingkat petani berkisar Rp. 8.000,00 – 15.000,00 per ikat tergantung jenis dan kualitas bunganya (<http://pustaka-pertanian.blogspot.com>, 2012).

Secara konvensional, gerbera diperbanyak melalui pemisahan anakan dan biji. Pemisahan anakan menghasilkan anakan jumlah benih yang rendah, sementara pemanfaatan biji menghasilkan kualitas benih yang bervariasi (Akter *et al.*, 2012). Kondisi ini tidak dapat mendukung komersialisasi tanaman pada skala yang besar, oleh karena itu diperlukan teknologi perbanyakkan lain yang lebih potensial dan mampu menjamin jumlah dan kualitas benih yang dibutuhkan.

Perbanyakkan cepat gerbera secara *in vitro* telah dilaporkan oleh beberapa penelitian. Induksi pembentukan tunas adventif hingga 6,8 tunas per eksplan terjadi pada eksplan daun yang ditanam pada medium MS yang ditambah dengan 4 mg/l kinetin dan 0,1 mg/l IAA, sementara 10 tunas per eksplan dicatat pada capitular yang dikultur pada medium MS yang ditambah dengan 4 mg/l kinetin dan 0,5 mg/l IAA. Untuk multiplikasi tunas dilakukan pada medium MS yang ditambah dengan 2 mg/l kinetin dan 0,1 mg/l PAA. Untuk pengakaran digunakan medium MS yang ditambah dengan 0,5 mg/l IAA (Tyagi dan Kothari, 2004). Kumar dan Kumar (2006) menginduksi pembentukan kalus dari daun dan petal menggunakan medium MS yang ditambah 1,5-2 mg/l 2,4-D. Kalus petal diregenerasi membentuk tunas hingga 2,7 tunas per eksplan pada medium MS yang ditambah 2 mg/l BA dan 0.5 mg/l NAA.

Sementara pada penelitian lain, Kumar dan Kumar (2007) menginduksi pembentukan kalus dari daun pada medium MS yang ditambah 1,5 atau 2 mg/l 2,4-D dan MS ditambah dengan 1 mg/l BA digunakan untuk meregenerasikan tunas hingga 10 tunas per eksplan. MS yang ditambah dengan 3 mg/l BA dan 3 mg/l 2,4-D digunakan untuk induksi kalus pada variasi eksplan, sementara MS yang ditambah 4 mg/l BA dan 1 mg/l NAA digunakan untuk regenerasi kalus hingga pembentukan plantlet (Altaf *et al.*, 2009). MS ditambah 10 mg/l BAP dan 2,87 μ M IAA pada meristem dan multiplikasi tunas hingga 10 tunas per eksplan dilakukan pada medium MS yang ditambah dengan 10 mg/l BA (Naz *et al.*, 2012). Sedangkan induksi kalus friable, nodular, dan krem-putih dari eksplan daun diinduksi pada medium MS yang ditambah dengan 1,5 mg/l 2,4-D, regenerasi tunas hingga 4 tunas per eksplan dilakukan dengan medium MS yang ditambah 3 mg/l BA dan diakarkan pada medium MS yang ditambah 1,5 mg/l NAA (Shabbir *et al.*, 2012). Teknologi perbanyakan gerbera secara *in vitro* telah berhasil diaplikasikan pada *G. jamesonii* ‘Marleen’ (Vardja dan Vardja, 2001), ‘Bonnie’ dan ‘Tobia’ (Son *et al.*, 2011) dan ‘Sunglow’ (Shabbir *et al.*, 2012); namun belum dilaporkan pada *G. jamesonii* ‘Carambol’.

Tknologi perbanyakan *G. jamesonii* ‘Carambol’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk telah berhasil dikembangkan (Winarto *et al.*, 2013; Belum dipublikasikan). Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas pucuk, (4) perbanyakan tunas pucuk, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 7)

Teknologi perbanyakan *Gerbera jamesonii* ‘Carambol’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk.

Bahan dan alat

Bahan

- *G. jamesonii* ‘Carambol’
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- Thidiazuron (TDZ= 1,5 mg/l), N6-benzyladenine (BA= 0,10-

0,25 mg/l), dan α -naphthalene acetic acid (NAA= 0,02 mg/l) (Sigma)

- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)
- 0.05% dan 0,01% HgCl₂ (Merck)
- Sukrosa (20 g/l)
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- NPK (20:15:15)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/balsam/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *G. jamesonii* 'Carambol' yang tumbuh subur dan sehat, berumur 1-1,5 tahun. Tanaman donor ditanam dalam bedengan (tanah subur, pasir dan sekam (1:1:1, v/v/v) yang diberi pupuk kandang 20-30 ton/ha atau 200-300 gram per lubang tanam. Pupuk NPK (2-4 g/tanaman; 20:15:15) diaplikasikan sebagai pupuk dasar. Aplikasi pupuk NPK cair (1 g/l) dilakukan setiap 10 hari sekali dengan 250 ml/tanaman. Pupuk daun dapat diaplikasikan juga untuk mendukung pertumbuhan tanaman. Penyiraman dilakukan setiap 1-2 kali sehari dan berkurang seiring dengan pertumbuhan tanaman. Tunas dengan 2-3 daun

yang masih muda, tumbuh subur dan sehat dipanen dari tanaman induk dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan melalui 2 tahap, yaitu: pra-perlakuan dan perlakuan. Sebelum pra-perlakuan, daun-daun yang melekat pada tunas dipotong tangkainya hingga mendekati pangkal batang dan sisakan 1-3 cm menggunakan pisau kultur. Tunas kemudian diletakkan di bawah air mengalir selama \pm 1 jam. Eksplan selanjutnya direndam dalam 1% larutan pestisida (campuran dari 1 g dari benomil 50% dan 1 g dari 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit dan dicuci bersih dengan air destilasi hingga bersih.

Eksplan kemudian dibawa ke laminar air flow cabinet. Eksplan selanjutnya direndam dalam larutan HgCl_2 0,05% yang telah ditambah dengan 5 tetes Tween 20 selama 10 menit sambil digojok secara manual. Bilas dengan air steril hingga bersih (5-6x, @ 5 menit). Setelah itu eksplan ditiriskan dalam cawan petri steril yang berisi tisu steril.

Setelah sterilisasi, isolasi tunas pucuk dilakukan dengan cara membuka tangkai daun secara bertahap menggunakan pinset dan dilakukan di bawah mikroskop stereo pada pembesaran 20-40 \times . Setiap membuka 1 tangkai daun selalu diikuti dengan kegiatan membuang bulu-bulu yang melekat pada batang hingga bersih. Setelah membuang tangkai daun terakhir dan bulu-bulu yang melekat, selanjutnya dilakukan isolasi tunas pucuk dengan cara memotong tunas pucuk pada 4 sisi ke arah bawah dengan ukuran 1 \times 1 \times 1,5 mm (panjang \times lebar \times tinggi). Tunas pucuk hasil isolasi kemudian disterilisasi lanjut menggunakan 0,01 % HgCl_2 yang telah ditambah dengan beberapa tetes Tween 20 selama 2-3 menit sambil digojok secara manual. Eksplan selanjutnya dibilas dengan air destilasi steril 5-6 x, masing-masing 5 menit. Eksplan kemudian ditiriskan dalam cawan petri steril yang berisi tisu steril dan siap ditanam.

Inisiasi tunas pucuk

Inisiasi tunas dilakukan dengan cara menanam tunas pucuk pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 1,5 mg/l TDZ dan 0,25 mg/l BA, 20 g/l sukrosa dan g/l gelrite. Kultur disimpan dalam ruang gelap selama

1,5-2 bulan. Bakal tunas mulai terbentuk 10-15 hari setelah kultur. Jumlah dan ukuran bakal tunas terus tumbuh dan berkembang hingga akhir inkubasi gelap, namun regenerasi tunas belum terjadi. Setelah inkubasi gelap, eksplan dipindahkan ke medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,25 mg/l BA dan diinkubasi pada kondisi terang dengan 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan untuk induksi pertumbuhan tunas lebih lanjut. Pada 1,5-2 bulan setelah masa inkubasi gelap, 3-7 tunas dengan 1-2 daun yang belum tumbuh sempurna dapat teregenerasi dari 1 eksplan.

Perbanyakkan tunas pucuk

Perbanyakkan tunas pucuk dilakukan dengan cara memindahkan dan memecah ukuran eksplan (jika ukuran kalus besar lebih dari 0,5 cm) dan menanam kembali eksplan pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,2 mg/l BA dan 0,02 mg/l NAA, 20 g/l sukrosa dan 7 g/l agar Swallow. Kultur selanjutnya disimpan di bawah kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Bakal-bakal tunas akan tumbuh, berkembang dan membentuk tunas-tunas dengan 2-4 daun pada akhir masa inkubasi. Perbanyakkan tunas dilakukan dengan melakukan isolasi tunas secara tunggal, kemudian menanam kembali (subkultur) tunas tunggal pada medium, kondisi dan waktu inkubasi yang sama. Subkultur tunas dapat dilakukan setiap 2 bulan sekali hingga 6 kali. Setelah subkultur ke-6, perbanyakkan tunas disarankan untuk dihentikan seiring dengan penurunan kualitas tunas yang terjadi.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 daun secara tunggal hasil subkultur ke-6. Tunas terpilih kemudian ditanam ke medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 20 g/l sukrosa, 1,5 g/l arang aktif dan 7 g/l agar Swallow. Kultur disimpan dalam kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 1 bulan. Akar umumnya mulai terbentuk 4-7 hari

setelah kultur. Jumlah akar yang terbentuk per tunas berkisar antara 2-7 akar dengan panjang bervariasi (0,5-3 cm) setelah 1 bulan masa inkubasi. Plantlets inilah yang kemudian diaklimatisasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 2-6 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar yang melekat pada akar dengan cara mencuci akar di bawah air mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan di atas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam bak-bak plastik yang berisi arang sekam atau arang sekam dan bahan organik (1:1, v/v) yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup bak plastik dengan plastik transparan, letakkan di tempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Lakukan penyiraman dengan NPK yang dicairkan (1 g/l 20:15:15) setiap 3 hari sekali. Setelah 1,5-2 bulan masa aklimatisasi, tanaman dapat dipindah dalam polybag (diameter 10 cm) yang berisi media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1, v/v). Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 80-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakan *G. jamesonii* 'Carambol' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas tunas pucuk telah berhasil dikembangkan. Waktu yang dibutuhkan untuk mengembangkan teknologi ini \pm 2,7 tahun. Titik kritis teknologi terdapat pada tahap isolasi tunas, inisiasi dan aklimatisasi. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 3-7 tunas pada tahap inisiasi dan 5-11 tunas pada tahap perbanyakan. Jika rata-rata tunas yang dihasilkan adalah 6 tunas tiap subkultur, 6 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 46.000 tunas dari satu tunas pucuk. Jika persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 41.000 plantlets akan dihasilkan setelah 15 bulan. Teknologi ini berhasil diaplikasikan

pada berbagai varietas, diantaranya ‘Black Jack’, ‘Nuance’, ‘Samson’, ‘Diabolo’, ‘Violente’ dan klon-klon Balithi terseleksi 11.46, 01.098, 10.078, dan 04.03. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, regenerasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi hormon (dinaikkan atau diturunkan) kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini pada perbanyakan benih berkualitas pada varietas atau klon gerbera yang lain. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Akter, N., Hoque, M.I., Sarker, R.H., 2012, ‘*In vitro* propagation in three varieties of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) from flower bud and flower stalk explants’, *Plant Tissue Cult. & Biotech.*, vol 22, no. 2, pp. 143-152.
2. Altaf, N., Khan, A.R., Ali, L., Bhatti, I.A., 2009, ‘Tissue Culture of Gerbera’, *Pak. J. Bot.*, vol. 41, no. 1, pp. 7-10.
3. <http://www.bps.go.id>, 2012, ‘Produksi Tanaman Hias di Indonesia, 1997-2011’, Viewed 21 January 2013 at: <http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?kat=3&tabel=1&daftar=1&id_subyek=55¬ab=19>
4. <http://pustaka-pertanian.blogspot.com>, 2012, ‘Budidaya Gerbera/Hebras (*Gerbera jamesonii*)’, Viewed 21 January 2013 at: <http://pustaka-pertanian.blogspot.com/2012/03/budidaya-gerbera-hebras-gerbera_01.html>
5. Kumar, S., Kumar, J.K., 2006, ‘Regeneration ability of petiole, leaf and petal explants in gerbera cut flower cultures *in vitro*’, *Folia Horticulturae Ann.*, vol. 18, no. 2, pp. 57-64.
6. Kumar, S., Kumar, J.K., 2007, ‘Plant Regeneration from Cell Suspensions in *Gerbera jamesonii* Bolus’, *J. Fruit Ornamental Plant Res.*, Vol. 15, pp. 157-166.
7. Naz, S., Naz, F., Tariq, A., Aslam, F., Ali, A., Athar, M., 2012, ‘Effect of different explants on *in vitro* propagation of gerbera (*Gerbera jamesonii*)’, *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 37, pp. 9048-9053,
8. Shabbir, K., Ahmad, T., Hafiz, I.A., Hussain, A., Abbasi, N.A., Ahmad, J., 2012, ‘*In vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* cv. Sunglow’, *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 42, pp. 9975-9984.
9. Son, N.V., Mokashi, A.N., Hegde, R.V., Patil, V.S., Lingaraju, S., 2011, ‘Response of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) varieties to micropropagation’, *Karnataka J. Agric. Sci.*, vol. 24, no. 3, pp. 354 – 357.

10. Tyagi, P., Kothari, S.L., 2004, 'Rapid in vitro regeneration of *Gerbera jamesonii* (H. Bolus ex Hook. f.) from different explants. *Indian J. Biotech.*, vol. 3, pp. 584-588.
11. Winarto, B., Yuniarto, K., Shintiavira, H., 2013, 'Morfogenesis dalam teknologi perbanyakan masa gerbera: Seleksi jenis eksplan, media inisiasi, optimasi dan proliferasi', Laporan hasil Penelitian, Balai Penelitian Tanaman Hias, 2013, 22 hal. (Belum dipublikasikan).



Gambar 7. Teknologi perbanyakan *G. jamesonii* ‘Carambol’ secara *in vitro* melalui proliferasi tunas pucuk. a-d, inisiasi tunas pucuk hingga membentuk bakal tunas dan kelompok tunas yang siap diperbanyak pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 1.5 mg/l TDZ dan 0.25 mg/l BA, e. Tunas yang siap disubkultur untuk tujuan perbanyakan, f, Kelompok tunas yang beregenerasi membentuk banyak tunas aksiler pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l BA dan 0.02 mg/l NAA, g, Pengakaran tunas pada medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh yang ditambah 1.5 g/l arang aktif, h, Plantlet berakar yang siap diaklimatisasi, i, Plantlet yang direndam dalam larutan 1% bakterisida dan fungisida selama 3 menit, j-l, Plantlet yang diaklimatisasi dengan proses pembukaan plastik penutup secara bertahap hingga plantlet tumbuh baik pada medium arang sekam dan pupuk kandang (1:1, v/v).

8. Aplikasi thin cell layer (TCL) dan adenine sulfat pada perbanyakan *Gerbera jamesonii* Bolus secara *in vitro*

Pendahuluan

TCL merupakan potongan berukuran kecil [transfersal (tTCL) dan longitudinal (lTCL)] dari bagian organ tanaman baik berasal dari daun, batang, akar, infloresen bunga, primordia bunga/daun, tunas pucuk, protocorm like body (PLB) atau embrio yang dikultur pada medium kultur untuk tujuan pembentukan dan perbanyakan tunas adventif, plb atau embrio (Teixeira da Silva, 2003ab dan 2004; Teixeira da Silva *et al.* 2006). tTCL bisa terdiri dari beberapa jenis sel yang berbeda seperti: sel epidermis, kortikal, kambium, perivaskuler, jaringan medular, dan parenkim, sementara lTCL hanya terdiri dari 1-2 lapis sel epidermis atau sel yang lain. TCL ini telah berhasil diaplikasikan pada berbagai jenis tanaman hias, seperti *Begonia* (Nhut *et al.*, 2005a and 2010), *Gerbera* (Nhut *et al.*, 2007), *Cymbidium* (Vyas *et al.*, 2010), *Dendrobium candidum* (Zhao *et al.*, 2012), dan *Rosa damascena* (Kshirsagar dan Braganza, 2012). Namun aplikasi TCL pada perbanyakan gerbera secara *in vitro* di Indonesia belum pernah dilaporkan.

Adenin sulfat merupakan sitokinin analog yang berpengaruh terhadap banyak aspek perkembangan tanaman (Wróblewska, 2012). Adenin sulfat ini bermanfaat untuk stimulasi embryogenesis somatic, pembentukan kalus, tunas aksiler maupun adventif (Van Staden *et al.*, 2008; Bantawa *et al.*, 2009). Sitokinin analog ini ternyata juga tidak menghambat proses pembentukan akar (Mathur *et al.*, 2008). Sitokinin jenis ini telah diaplikasikan pada induksi dan pembentukan tunas *Phaseolus vulgaris* (Gatica Arias *et al.*, 2012), *Begonia x hiemalis* (Awal *et al.*, 2013); penggandaan tunas *Carica papaya* (Saha *et al.*, 2004; Schmildt *et al.*, 2007), *Picrorhiza scrophulariiflora* (Bantawa *et al.*, 2009), ; induksi pengakaran *Fuchsia hybrida* (Wróblewska, 2012), Sedangkan aplikasi adenine sulfat dalam kultur *in vitro* gerbera belum pernah dilaporkan.

Teknologi perbanyakan masa *G. jamesonii* secara *in vitro* melalui aplikasi TCL dan adenine sulfat berhasil dikembangkan (Winarto *et al.*, 2014; Belum dipublikasikan). Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas pucuk,

(4) perbanyakan tunas pucuk, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 8).

Aplikasi thin cell layer (TCL) dan adenine sulfat pada perbanyakan masa *G. jamesonii* ‘Nuance’ secara *in vitro*.

Bahan dan alat

Bahan

- *G. jamesonii* ‘Nuance’.
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- Thidiazuron (TDZ = 1,5 mg/l), N6-benzyladenine (BA = 0,2 mg/l), dan α -naphthalene acetic acid (NAA = 0,02 mg/l) (Sigma)
- Adenine sulfate (Merck)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)
- 0,05% dan 0,01% HgCl₂ (Merck)
- Sukrosa (20 g/l)
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- NPK (20:15:15)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel

- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *G. jamesonii* 'Nuance' yang tumbuh subur dan sehat, berumur 1-1,5 tahun. Tanaman donor ditanam dalam bedengan (tanah subur, pasir dan sekam (1:1:1, v/v/v) yang diberi pupuk kandang 20-30 ton/ha atau 200-300 gram per lubang tanam. Pupuk NPK (2-4 g/tanaman; 20:15:15) diaplikasikan sebagai pupuk dasar. Aplikasi pupuk NPK cair (1 g/l) dilakukan setiap 10 hari sekali dengan 250 ml/tanaman. Pupuk daun dapat diaplikasikan juga untuk mendukung pertumbuhan tanaman. Penyiraman dilakukan setiap 1-2 kali sehari dan berkurang seiring dengan pertumbuhan tanaman. Tunas dengan 2-3 daun yang masih muda, tumbuh subur dan sehat dipanen dari tanaman induk dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan melalui 2 tahap, yaitu: pra-perlakuan dan perlakuan. Sebelum pra-perlakuan, daun-daun yang melekat pada tunas dipotong tangkainya hingga mendekati pangkal batang dan sisakan 1-3 cm menggunakan pisau kultur. Tunas kemudian diletakkan di bawah air mengalir selama \pm 1 jam. Eksplan selanjutnya direndam dalam 1% larutan pestisida (campuran dari 1 g dari benomil 50% dan 1 g dari 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit dan dicuci bersih dengan air destilasi hingga bersih.

Eksplan kemudian dibawa ke laminar air flow cabinet. Eksplan selanjutnya direndam dalam larutan HgCl_2 0,05% yang telah ditambah dengan 5 tetes Tween 20 selama 10 menit sambil digojok secara manual. Bilas dengan air steril hingga bersih (5-6x, @ 5 menit). Setelah itu eksplan ditiriskan dalam cawan petri steril yang berisi tisu steril.

Setelah sterilisasi, isolasi tunas pucuk dilakukan dengan cara membuka tangkai daun secara bertahap menggunakan pinset dan

dilakukan dibawah mikroskop stereo pada pembesaran 20-40×. Setiap membuka 1 tangkai daun selalu diikuti dengan kegiatan membuang bulu-bulu yang melekat pada batang hingga bersih. Setelah membuang tangkai daun terakhir dan bulu-bulu yang melekat, selanjutnya dilakukan isolasi tunas pucuk dengan cara memotong tunas pucuk pada 4 sisi kearah bawah dengan ukuran $1 \times 1 \times 1,5$ mm (panjang \times lebar \times tinggi). Tunas pucuk hasil isolasi kemudian disterilisasi lanjut menggunakan 0,01 % $HgCl_2$ yang telah ditambah dengan beberapa tetes Tween 20 selama 2-3 menit sambil digojok secara manual. Eksplan selanjutnya dibilas dengan air destilasi steril 5-6 x, masing-masing 5 menit. Eksplan kemudian ditiriskan dalam cawan petri steril yang berisi tisu steril dan siap ditanam.

Inisiasi tunas pucuk

Inisiasi tunas dilakukan dengan cara menanam tunas pucuk pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 1,5 mg/l TDZ dan 0,25 mg/l BA, 20 g/l sukrosa dan g/l gelrite. Kultur tunas pucuk kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 1,5 bulan. Bakal tunas mulai terbentuk 10-15 hari setelah kultur. Jumlah dan ukuran bakal tunas terus tumbuh dan berkembang seiring dengan waktu inkubasi. Setelah 1,5 bulan inkubasi gelap, tunas kemudian diiris secara transversal TCL (tTCL) dengan ketebalan ± 1 mm dan hanya diambil titik pucuknya untuk regenerasi tunas.

Regenerasi dan perbanyakan tunas

Regenerasi tunas dilakukan dengan cara menanam tunas pucuk hasil tTCL pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,2 mg/l BA dan 0,02 mg/l NAA, 60 mg/l adenine sulfat, 20 g/l sukrosa dan 7 g/l agar Swallow. Kultur selanjutnya disimpan dibawah kondisi gelap selama 1 bulan kemudian dipindahkan di bawah kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 1 bulan. Bakal tunas akan tumbuh, berkembang dan membentuk tunas-tunas dengan 1-2 daun pada akhir inkubasi gelap. Setelah dipindahkan dalam kondisi terang tunas akan terus bertumbuh dan berkembang dan menghasilkan tunas dengan 3-5 daun diakhir inkubasi terang. Perbanyakan

tunas dilakukan dengan melakukan isolasi tunas secara tunggal, kemudian menanam kembali (subkultur) tunas tunggal pada medium, kondisi dan waktu inkubasi yang sama. Subkultur tunas dapat dilakukan setiap 2 bulan sekali hingga 6 kali. Setelah subkultur ke-6, perbanyak tunas disarankan untuk dihentikan seiring dengan penurunan kualitas tunas yang terjadi.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 daun secara tunggal hasil subkultur ke-6. Tunas terpilih kemudian ditanam ke medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh tanpa hormon yang ditambah dengan 20 g/l sukrosa, 1,5 g/l arang aktif dan 7 g/l agar Swallow. Kultur tunas kemudian disimpan dalam kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 1 bulan. Akar umumnya mulai terbentuk 4-7 hari setelah kultur. Jumlah akar yang terbentuk per tunas berkisar antara 2-7 akar dengan panjang bervariasi (0,5-3,0 cm) setelah 1 bulan masa inkubasi. Plantlets inilah yang kemudian diaklimatisasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 2-6 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar yang melekat pada akar dengan cara mencuci akar dibawah air yang mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan diatas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam bak-bak plastik yang berisi arang sekam atau arang sekam dan bahan organik (1:1, v/v) yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup bak plastik dengan plastik transparan, letakkan ditempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Lakukan penyiraman dengan NPK yang dicairkan (1 g/l 20:15:15) setiap 3 hari sekali. Setelah 1,5-2 bulan masa aklimatisasi, tanaman dapat dipindah dalam polybag

(diameter 10 cm) yang berisi media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1, v/v). Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 80-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Aplikasi tTCL dan adenine sulfat pada perbanyakan masa *G. jamesonii* secara *in vitro* telah berhasil dikembangkan dengan waktu \pm 2,5 tahun. Titik kritis terdapat pada inisiasi kultur tunas pucuk sebagai sumber eksplan, tahap inisiasi dan aklimatisasi. Potensi produksi benih dari 1 tunas pucuk menghasilkan 5-8 tunas pada tahap inisiasi dan regenerasi dan 5-12 tunas pada tahap perbanyakan. Jika rata-rata tunas yang dihasilkan adalah 6,5 tunas tiap subkultur, 6 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 75.000 tunas dari satu tunas pucuk. Jika persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 67.500 plantlets akan dihasilkan setelah 15 bulan teknologi ini telah diaplikasikan pada *G. jamesonii* 'Black Jack', 'Carambol', 'Diabolo', 'Samson', 'Violente', klon 11.46, 01.098, 06.078 dan 04.03. Potensi produksi dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, regenerasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi hormon dan adenine sulfat (dinaikkan atau diturunkan) kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih berkualitas jika diaplikasikan pada varietas atau klon lain. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Awal, A, Ahmed, ABA, Taha, RM, Yaacob, JS, & Mohajer, S, 2013, 'Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on *in vitro* flowering in *Begonia x hiemalis* Fotsch', *AJCS*, vol. 7, no. 5, pp. 691-698
2. Bantawa, P, Roy, OS, Ghosh, P, Mondal, TK, 2009, 'Effect of Bavistin and Adenine Sulphate on *In vitro* Shoot Multiplication of *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell.: An Endangered Medicinal Plant of Indo-China Himalayan Regions', *Plant Tissue Cult. & Biotech.*, vol. 19, n0. 2, pp. 237-245.

3. Gatica Arias, AM, Valverde, JM, Fonseca, PR, & Melara, MV, 2010, 'In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electr. J. Biotechnol.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–8.
4. Kshirsagar, K, & Braganza, VJ, 2012, 'Micropropagation of *Rosa damascena* Mill. through transverse thin cell layer culture', *South Asian J. Exp. Bot.*, vol. 2, no. 4, pp. 184-189.
5. Mathur, A, Mathur, AK, Verma, P, Yadav, S, Gupta, ML, Darokar, MP, 2008, 'Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 7, no. 8, pp. 1046–1053.
6. Nhut, DT, Hai, NT, Huyen, PX, Huong, DTQ, & Hang, NTT. 2005, 'Thidiazuron induces high frequency shoot bud formation from *Begonia* transverse thin cell layer culture', *Propag. Ornament. Plants.*, vol. 5, pp. 151-157.
7. Nhut, DT, Ana, TTT, Huonga, NTD, Dona, NT, Haia, NT, Thiena, NQ, & Vua, NH, 2007, 'Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture', *Sci. Hort.*, vol. 111, no. 2, pp. 146-151.
8. Nhut, DT, Hai, NT, & Phan, MX, 2010, 'A highly efficient protocol for micropropagation of *Begonia tuberosus*', In: Jain, SM, & Ochatt, SJ (Eds.), *Protocols for In vitro Propagation of Ornamental Plants*, Springer protocols, Humana Press., pp 15-20.
9. Saha, M, Phatak, A, & Chandra, N, 2004, 'In vitro culture studies in four dioecious varieties of *Carica papaya* L. using axillary buds from field-grown plants. *J. Tiss. Res.*, vol. 4, no. 2, p. 211-214.
10. Schmiltdt, O, Schmiltdt, ER, & Amaral, JAT, 2007, 'Sulfato de adenina na multiplicação in vitro de mamoeiro "Tainung 01"', *Scientia Agraria*, vol. 8, no. 2, p. 141-147.
11. Teixeira da Silva, JA, 2003a, 'Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 2, no. 12, pp. 683-691.
12. Teixeira da Silva, JA, 2003b, 'Thin cell layer technology for induced response and control of rhizogenesis in chrysanthemum', *Plant Growth Regul.*, vol. 39, pp. 67–76.
13. Teixeira da Silva, JA, 2004, 'The effect of carbon source on in vitro organogenesis of chrysanthemum thin cell layers', *Bragantia, Campinas*, vol.63, no.2, pp.165-177,
14. Teixeira da Silva, JA, Van, KTT, Biondi, S, Nhut, DT, & Altamura, MM, 2006, 'Thin Cell Layers: Developmental Building Blocks in Ornamental Biotechnology', *FOB*, vol. 1, no. 1, pp. 1-13.

15. Winarto, B, Yuniarto, K, Wegadara, M, 2014, 'Aplikasi thin cell layer (TCL) dan adenine sulfat pada perbanyakan masa *Gerbera jamesonii* (H. Bolus ex Bolus f.) secara in vitro', Hasil Kemajuan Penelitian, Balai Penelitian Tanaman Hias, 2014, 14 hal.
16. Wróblewska, K, 2012, 'The influence of adenine and benzyladenine on rooting and development of *Fuchsia hybrida* cuttings', *Acta Agrobotanica*, vol. 65, no. 4, pp. 101-108
17. Van Staden, J, Zazimalova, E, & George, EF, 2008, 'Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonist. In: George, EF, Hall, M, & De Kleck, G.J. eds. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1, *The Background*, Springer, The Netherlands, pp. 205-226.
18. Vyas, S, Guha, S, Kapoor, P, & Rao, IU, 2010, 'Micropropagation of *Cymbidium Sleeping Nymph* through protocorm-like body production by thin cell layer culture', *Sci. Hort.*, vol. 123, pp. 551-557.
19. Zhao, P., Wang, W., Feng, F.S., Wu, F., Yang, Q.Z. & Wang W.J. 2007, 'High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 90, pp. 131-139.



Gambar 8. Aplikasi TCL dan adenine sulfat pada perbanyakan masa *G. jamesonii* ‘Nuance’ secara *in vitro*. a. Tunas pucuk hasil inisiasi pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 1,5 mg/l TDZ dan 0,25 mg/l BA yang digunakan sebagai sumber eksplan. b. Ukuran TCL yang digunakan sebagai sumber eksplan dengan ukuran ± 1 mm. c-f. Inisiasi bakal dan pertumbuhan tunas pucuk hasil tTCL pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,25 mg/l BA, g. Tunas tunggal pada awal kultur untuk tujuan perbanyakan, h. Proliferasi tunas hasil perbanyakan tunas tunggal 1,5 bulan setelah inkubasi pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,2 mg/l BA, 0,02 mg/l NAA, 60 mg/l adenine sulfat, i. Pengakaran plantlet pada medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh yang ditambah dengan 1,5 g/l arang aktif, j. plantlet yang siap untuk diaklimatisasi, m. Plantlet yang diberi perlakuan 1% larutan pestisida (fungisida dan bakterisida) selama 3 menit sebelum ditanam pada media aklimatisasi, k. plantlet hasil aklimatisasi 15 hari setelah aklimatisasi, l. plantlet yang tumbuh baik setelah 15 hari aklimatisasi.

9. Teknologi perbanyakkan Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk

Pendahuluan

Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) merupakan bunga potong penting di Indonesia. Warna dan bentuk bunga yang bervariasi, harga yang terjangkau membuat bunga potong krisan menjadi pilihan utama pada berbagai rangkaian bunga maupun dekorasi. Bunga krisan dijual dengan harga berkisar antara Rp. 10.000,00-15.000,00 per ikat (Daftar Harga Bunga, 2013). Data Biro Pusat Statistik Indonesia menunjukkan bahwa pada 2012 produksi bunga potong krisan sudah mencapai 397.651.571 tangkai dengan luas lahan produksi mencapai 8.093.693 m² (BPS, 2013). Produksi bunga krisan menduduki peringkat pertama dan jauh mengungguli produksi bunga lain seperti: sedap malam (101.197.847 tangkai), mawar (68.624.998 tangkai) dan anggrek (20.727.891 tangkai). Produktivitas bunga yang tinggi tersebut, ternyata tidak diikuti oleh penyediaan benih berkualitas yang berkesinambungan.

Benih krisan berkualitas umumnya hanya dinikmati oleh perusahaan-perusahaan bermodal kuat, namun sebagian besar petani krisan secara tradisional memperbanyak dan mempersiapkan benih krisan menggunakan tanaman induk secara berulang. Penggunaan tanaman induk secara terus menerus sebagai sumber benih tanaman produksi mengakibatkan terjadinya degenerasi. Pertumbuhan tanaman terhambat (*stunting*) dengan perakaran yang terbatas, daun-daun berukuran kecil dan berwarna hijau pucat, dan jika dibandingkan dengan tanaman sehat, bunga yang dihasilkan berukuran sangat kecil dengan warna yang pudar (Hill *et al.*, 1996), bahkan pembungaan lebih cepat beberapa hari karena terganggunya respon fotoperiod (Hosokawa *et al.*, 2004). Penyebab utama terjadinya degenerasi pada tanaman krisan ialah adanya *Chrysanthemum virus B* (CVB) dan *chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) yang terbawa dalam saat penyetekan (Diningsih *et al.*, 2013). Oleh karena itu untuk membebaskan CVB dan CSVd dan meningkatkan kapasitas pertumbuhan

tanaman diperlukan teknologi perbanyakan krisan secara *in vitro* yang mampu membebaskan kedua penyakit sistemik tersebut.

Beberapa teknologi perbanyakan krisan secara *in vitro* yang digunakan untuk meningkatkan kualitas pertumbuhan dan produktivitas benih krisan telah dilaporkan oleh beberapa penelitian. Karim *et al.* (2002; 2003) mengembangkan teknologi perbanyakan krisan menggunakan nodus dan tunas pucuk sebagai sumber eksplan dan medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 1 mg/l BA untuk inisiasi dan perbanyakan dan $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah 0,2 mg/l indole-3-butyric acid (IBA) untuk pengakaran. Kondisi yang sama juga dengan sedikit modifikasi pada media pengakaran dilaporkan oleh Waseem *et al.* (2011), petal bunga dan medium MS yang ditambah dengan 2,0 mg/l BA dan 0,5 mg/l NAA untuk inisiasi dan perbanyakan, medium MS yang ditambah 0,5 mg/l NAA untuk pengakaran (Mizra dan Datta, 2007), tunas pucuk dan medium MS yang ditambah dengan 0,3 mg/l BA untuk perbanyakan dan 0,2 mg/l IBA untuk pengakaran (Shatnawi *et al.*, 2010), tunas pucuk dan medium MS yang ditambah 3,0 mg/l Kinetin (Kin) dan 2,0 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) untuk perbanyakan dan 1,0 mg/l IBA untuk pengakaran (Nalini, 2012); sedangkan produksi benih berkualitas krisan di Indonesia yang memperhatikan sumber eksplan dan seleksi eksplan ditingkat *in vitro* tidak pernah dilaporkan.

Metode perbanyakan krisan secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk telah berhasil dikembangkan. Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas pucuk, (4) perbanyakan tunas pucuk, dan (4) aklimatisasi plantlets (Gambar 9)

Teknologi perbanyakan *C. morifolium* ‘Pasopati’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk.

Bahan dan alat

Bahan

- *C. morifolium* ‘Puspita Nusantara’ dan ‘Pasopati’
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)

- N6-benzyladenine (BA= 0,25-0,50 mg/l) (Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l)
- 1% dan 0,5% (5,25% NaOCl)
- Sukrosa (30 g/l) (Merck)
- Alkohol 70%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- NPK (20:15:15)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *C. morifolium* 'Pasopati' yang tumbuh subur, sehat dan tidak ada indikasi infeksi virus-viroid (jika memungkinkan adalah tanaman hasil pembebasan virus), berumur 1-5 bulan. Tanaman donor ditanam dalam polybag/pot plastik [diameter 30 cm, berisi campuran arang sekam, sekam, dan humus bambu/bahan organik (1:1:1, v/v/v)]. Tanaman donor ditempatkan dalam rumah kaca/rumah plastik yang bebas virus dan dipelihara melalui melalui

penyiraman, pemupukan dan pelampuan pada malam hari. Penyiraman dilakukan 1-2 hari sekali tergantung kondisi cuaca, pupuk cair (2 g/l NPK 20:15:15) diaplikasikan setiap 3 hari sekali dan pelampuan dari jam 22.00-02.00 WIB. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Penyetekan berulang dilakukan untuk menjaga tanaman tetap berada pada tahap pertumbuhan vegetatif. Stek pucuk dengan 1-2 daun muda dipanen dari tanaman induk dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tunas pucuk dengan 1-2 daun disterilisasi menggunakan 1% larutan Tween 20 selama 30 menit sambil digojok, 1% benlate dan agrept selama 30 menit digojok dan bilas dengan air bersih berulang kali. Eksplan kemudian di rendam dalam 1% larutan natrium hipoklorida (NaOCl) yang telah ditambah 3-5 tetes Tween 20 sambil digojok selama 10 menit (perendaman eksplan dalam 0,5 % larutan NaOCl ditambah 3-5 tetes Tween 20 sambil digojok selama 10 menit ditambahkan jika kontaminasi masih bermasalah), bilas dengan air steril berulang kali (2-3 kali, @ 3 menit), kemudian rendam dalam larutan 70% alcohol selama 3 menit dan bilas dengan air steril 4-5x (@ 3 menit). Eksplan yang telah steril di tiriskan didalam petridis yang sebelumnya telah dilapisi kertas tisu kering steril.

Penyiapan tunas pucuk dilakukan dengan mengisolasi titik tumbuh (0,5-1 mm) dilakukan dengan meletakkan eksplan di bawah mikroskop stereo. Melakukan pembuangan tangkai daun secara berurutan hingga bakal daun yang menempel pada titik tumbuh menggunakan pinset dan pisau kultur. Setelah titik tumbuh terlihat, titik tumbuh diisolasi menggunakan pisau kultur dan ditanam pada medium inisiasi.

Inisiasi tunas pucuk

Inisiasi tunas pucuk dilakukan dengan menanam tunas pucuk yang disolasi pada medium MS-0 atau MS-0 yang ditambah dengan 10 ppm antiviral (misal: Ribavirin) untuk membantu eliminasi virus-

viroid, diinkubasi dibawah kondisi terang 12 jam fotoperiode dari pagi hingga sore (06.00-18.00) dan 4 jam tambahan pada malam hari (10.00-02.00) di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama $\pm 1-1,5$ bulan. Setelah tunas pucuk tumbuh dengan 1-2 daun, tunas dipindahkan ke medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,25-0,50 mg/l BA dan diinkubasi dengan kondisi dan waktu inkubasi yang sama untuk meningkatkan kemampuan regenerasi dan pertumbuhan eksplan. Tunas dibiarkan tumbuh hingga terbentuk 4 daun, setelah 4 daun baru terbentuk maka tunas harus disubkultur. Subkultur eksplan pada medium yang mengandung BA dapat dilakukan hingga 2-3 kali sesuai dengan peningkatan kapasitas regenerasi yang diharapkan. Catatan penting: subkultur tunas pada medium baru yang mengandung BA juga disertai pengelompokan jenis eksplan dari tunas pucuk, nodus 1 s/d 4 untuk meningkatkan dan menjamin kualitas benih yang dihasilkan.

Perbanyakan tunas pucuk

Perbanyakan tunas hasil inisiasi dilakukan dengan memotong tunas dan mengelompokkannya dari tunas pucuk, nodus 1 s/d 4. Eksplan sesuai dengan kelompoknya ditanam pada medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh. Kultur diberi label sesuai kelompoknya dan diinkubasi pada kondisi dan waktu inkubasi yang sama dengan tahap inisiasi. Setelah eksplan yang dikultur tumbuh dengan 4 daun yang baru, maka subkultur eksplan harus dilakukan dan disubkultur dengan cara yang sama. Periode subkultur eksplan pada tahap perbanyakan ini dapat dilakukan maksimal 8 kali subkultur. Kecepatan penggandaan eksplan = 1 menjadi 4-5 eksplan tiap 1,5 bulan.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi eksplan dapat dilakukan secara mudah dengan cara memotong tunas dengan 2-3 daun, kemudian menanam tunas dalam bak-bak plastik yang berisi arang sekam yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup bak-bak plastik dengan plastik transparan selama 5-7 hari. Letakkan bak-bak plastik dalam rumah kaca yang telah dipersiapkan. Perlakuan tambahan penyinaran lampu pada malam harinya (22.00-02.00)

tetap diberlakukan pada tahap ini untuk menjaga tanaman tidak berbunga. Tunas mulai berakar 4-7 hari. Tunas dengan akar yang berkualitas dapat dipanen 12-15 hari setelah aklimatisasi. Tunas berakar hasil aklimatisasi kemudian dipotkan secara individu/tunggal pada polibag/pot plastik yang berisi campuran arang sekam + sekam + pupuk organik/kandang (1:1:1, v/v/v) untuk produksi benih dan perunutan generasi yang dapat dijadikan sebagai tanaman induk untuk produksi benih berkualitas.

Efisiensi dan aplikasi

Aplikasi teknologi ini terbukti dapat meningkatkan kemampuan regenerasi dan kualitas tanaman yang dihasilkan. Waktu yang dibutuhkan untuk pengembangan teknologi ini \pm 1 tahun. Titik kritikal adalah mendapatkan regenerasi tunas pucuk pada tahap awal kultur. Pada beberapa kasus, meskipun tidak ada aplikasi antiviral, benih yang dihasilkan adalah benih yang bebas virus. Proses subkultur eksplan berbasis pengelompokan jenis eksplan (tunas pucuk, nodus 1 s/d 4) terbukti mampu menghasilkan benih yang berkualitas dan seragam. Satu sumber eksplan dapat menghasilkan \pm 45.000 benih berkualitas per tahun dengan kecepatan penggandaan = 1 menjadi 4-5 eksplan tiap 1,5 bulan. Teknologi ini telah diaplikasikan pada *C. morifolium* ‘Puspita Nusantara’ dan ‘Pasopati’. Teknologi ini juga dapat diaplikasikan pada varietas yang lain. Untuk jenis krisan yang kurang responsif modifikasi komposisi media terutama konsentrasi hormon dapat diubah untuk meningkatkan keberhasilannya. Efisiensi juga dapat dilakukan dengan mengganti komponen medium MS dengan media generik growmore, terutama pada tahap perbanyakan tunas (Shintiavira *et al.*, 2012). Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Biro Pusat Statistik (BPS), 2014, ‘Luas Panen, Produksi dan Produktivitas Tanaman Krisan, 2009-2013’, Viewed 29 Juli 2014 at: www.bps.go.id/
2. Daftar Harga Bunga, 2013, ‘Daftar Harga Bunga per Kios’, Viewed 29 Juli 2014 at: <http://www.bunga-rawabelong.com/profile/index.php?act=bgkios>

3. Diningsih, E., Suatika, G., Sulyo, Y., Winarto, B., 2013, 'Deteksi dan identifikasi *Chrysanthemum Stunt Viroid* pada tanaman krisan menggunakan teknik Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction', *J. Hort.*, vol. 23, no. 1, pp. 1-8.
4. Hill, M.F., Giles, R.J., Moran, J.R., Hepworth, G., 1996, 'The incidence of chrysanthemum stunt viroid and chrysanthemum B carlavirus, tomato aspermy cucumovirus and tomato spotted wilt tospovirus in Australian chrysanthemum crops', *Aus. Plant Pathol.*, vol. 25, pp.174-178.
5. Hosokawa, M., Ueda, E., Ohishi, K., Otake, A., Yazawa, S., 2004, 'Chrysanthemum stunt viroid disturbs photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants', *Planta.*, vol. 220, pp. 64-70.
6. Karim, M.Z., Amin, M.N., Asaduzzaman, Islam, S., Hossin, F., Alam, R., 2002, 'Rapid multiplication of *Chrysanthemum morifolium* through in vitro culture', *Pak. J. Biol. Sci.*, vol. 5, no. 11, pp. 1170-1172.
7. Karim, M.Z., Amin, M.N., Azad, M.A.K., Begum, F, Rahman, M.M., Ahmad, S., Alam, R., 2003, 'In vitro shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium* as affected by sucrose, agar and pH', *Biotechnology*, vol. 2, no. 2, pp. 115-120.
8. Misra, P., Datta, S.K., 2007, 'Standardization of in vitro protocol in *Chrysanthemum* cv. Madam E Roger' for development of quality planting material and to induce genetic variability using radiation', *Indian J. Biotechnol.*, vol. 6, pp. 121-124.
9. Nalini, R., 2012, 'Micropropagation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using shoot tip as explant', *Online Int. J.*, vol. 2, no. 2, pp. 62-66.
10. Shintiavira, H., Soedarjo, M., Suryawati, Winarto, B., 2012, 'Studi pengaruh substitusi hara makro dan mikro media MS dengan pupuk majemuk dalam kultur *in vitro* krisan', *J. Hort.*, vol. 22, no. 4, pp. 334-341.
11. Waseem, K., Jilani, M.S., Khan, MS., Kiran, M., Khan, G., 2011, 'Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) plantlets from nodal segments', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1477-1484
12. Shatnawi, M., Al-Fauri, A., Megdadib, H., Kair, M., Al-Shatnawic, Saeed, R.S., Rommana, A., Al-Ghzawi, A.L., 2010, 'In Vitro Multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat and its Responses to NaCl Induced Salinity', *Jordan J. Biol. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 101-110.



Gambar 9. Teknologi perbanyakan *C. morifolium* ‘Pasopati’ secara in vitro melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk. A. Tanaman donor sehat sebagai donor eksplan, b. Tunas pucuk dengan 2 daun yang digunakan sebagai sumber eksplan, c. Tunas pucuk yang dikultur pada medium MS-0 pada awal kultur, d. Tunas pucuk yang tumbuh membentuk 2 daun ± 1,5 bulan setelah kultur, e. Tunas pucuk yang berkembang membentuk 4 daun pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,25 mg/l BA dan siap untuk disubkultur, f. Sumber eksplan untuk tujuan perbanyakan, g. Nodus 1 yang dikultur secara berkelompok untuk menunjang kualitas benih yang dihasilkan, h. Tunas hasil regenerasi nodus 1 yang terlihat seragam dan lebih berkualitas ± 1 bulan setelah subkultur, i. Tunas dengan 4 daun yang siap untuk disubkultur untuk tujuan perbanyakan, j. Tunas yang siap untuk diaklimatisasi, k-l. Stek pucuk yang diaklimatisasi, proses dan hasilnya.

10. Teknologi perbanyakkan Leather leaf fern [*Rumohra adiantiformis* (G. Forst.) Ching] secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk

Pendahuluan

Leather leaf fern [*Rumohra adiantiformis* (G. Forst.) Ching] adalah tanaman daun yang penting di Indonesia. Tanaman ini popular digunakan dalam dekorasi dan rangkaian bunga sebagai ‘filler’, memiliki penampilan yang menarik, daun mengkilap dan masa simpan yang lama (Ried, 2004; D’Souza *et al.*, 2006). Di Indonesia, tanaman ini banyak ditanam secara komersial di Magelang (62 ha), Wonosobo (8 ha), Cianjur (10 ha) dan Sukabumi (10 ha) dan sebagian besar produknya, mencapai 150 juta tangkai/tahun, diekspor ke Jepang (Efforts on Development of Ornamental Plant Areas for Export, 2009). Untuk menjaga dan meningkatkan pasokan ekspor tersebut, maka petani dan pengusaha leather leaf fern harus mampu menjaga kualitas dan produktivitas tanaman ini, namun pada beberapa kasus yang terjadi malah sebaliknya. Peningkatan kualitas dan produktivitas tanaman tersebut ternyata diperhadapkan pada masalah keterbatasan ketersediaan benih berkualitas.

Di Indonesia, leather leaf fern umumnya diperbanyak melalui pemisahan rhizome dan pengecambahan spora (Strandberg, 2003; Brum dan Randi, 2002; 2006). Pemisahan rhizome menghasilkan benih dalam jumlah yang terbatas. Pemisahan rhizome secara berulang juga menghasilkan penurunan kualitas benih dan menyebabkan mudah terbentuknya spora dibalik daun (Strandberg, 2003). Pengecambahan spora, meskipun menghasilkan benih dalam jumlah yang banyak, benih yang dihasilkan beragam dan kurang berkualitas (Brum dan Randi, 2002; 2006). Oleh karena itu teknologi produksi benih berkualitas tanaman ini sangat diperlukan.

Beberapa teknologi perbanyakkan masa tanaman paku-pakuan secara *in vitro* sudah dilaporkan. Bertrand *et al.* (1999) berhasil mengembangkan perbanyakkan secara *in vitro* *Polypodium cambricum* menggunakan medium MS yang ditambah 2,5 mg/l BA dan 0,02 mg/l NAA dan rhizome sebagai sumber eksplannya. Medium Murashige Fern Multiplication

yang ditambah 0,5 mg/l NAA dan 5,0 mg/l Kin digunakan untuk inisiasi tunas aksiler, multiplikasi dan pengakaran *Matteuccia struthiopteris* (Zenkteler, 2006), *Neprolepis exaltata* Schott cv. 'Bostoniensis' menggunakan medium MS yang ditambah dengan 100 mg/l NAA dan 100 mg/l Kin (Toma dan Daniel, 2010), namun perbanyakan masa *R. adiantiformis* menggunakan rhizome sebagai sumber eksplan belum pernah dilaporkan.

Protokol perbanyakan *R. adiantiformis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler telah berhasil dikembangkan (Winarto dan Teixeira, 2012ab). Teknologi ini telah dipublikasikan di jurnal internasional yang kredibel. Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas aksiler, (4) perbanyakan tunas aksiler, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 10)

Teknologi perbanyakan *R. adiantiformis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler

Bahan dan alat

Bahan

- Rhizome *R. adiantiformis*
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- Thidiazuron (TDZ= 0,5-1,5 mg/l), N6-benzyladenine (BA= 0,5-1,0 mg/l), Kinetin (Kin= 0,5 mg/l), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D= 0,1-0,5 mg/l) dan α -naphthalene acetic acid (NAA=0,01-0,02 mg/l) (Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)
- 0,05% HgCl₂ (Merck)
- Sukrosa (30 g/l)
- Alkohol 80 dan 96%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)

- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- NPK (20:15:15)
- Aluminium foil

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/balsam/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah rhizome *R. adiantiformis* yang berasal dari PT. Tropika Flora Persada (Sukoyoso, Kajoran, Magelang, Jawa Tengah). yang tumbuh subur dan sehat, berumur 1-1,5 tahun. Tanaman donor ditanam dalam polybag/pot plastik [diameter 30 cm, berisi campuran arang sekam dan humus bambu/bahan organik (1:1, v/v)]. Tanaman donor ditempatkan dalam rumah kaca/rumah plastic dan dipelihara melalui melalui penyiraman dan pemupukan. Pupuk cair (1 g/l NPK 20:15:15) diaplikasikan setiap 3 hari sekali. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Rhizome dipanen dan dipotong dari tanaman induk dengan panjang ukuran 2-3 cm. Rhizome inilah yang digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Sterilisasi rhizome dilakukan dengan memberikan pra-perlakuan

rhizome dengan merendam eksplan dalam larutan alcohol 80% selama 3 menit, beberapa sisik berwarna kecoklatan yang menutupi permukaan rhizome dibersihkan, kecuali dibagian titik tumbuh, setelah itu eksplan diletakkan di bawah air mengalir selama 2-3 jam. Eksplan kemudian dibawa kedalam laminar air flow cabinet dan merendam eksplan dalam 0,05% $HgCl_2$ selama 10 menit, memindahkan eksplan dalam alcohol 96% selama 30-60 detik, dan membilas rhizome dengan air destilasi steril 4-5× (@ 5 menit). Eksplan kemudian ditiriskan dalam cawan Petri steril yang berisi tisu steril untuk mengurangi jumlah air yang menempel pada permukaan eksplan.

Setelah sterilisasi, eksplan selanjutnya diambil dan diletakkan diatas cawan Petri steril. Sisa sisik yang menutupi titik tumbuh dibersihkan dengan hati-hati agar tidak sampai melukai titik tumbuh. Eksplan dipotong agak serong untuk mendekati titik tumbuh dengan ukuran 0,75-1,0 cm. Eksplan yang telah dipotong siap untuk dikultur pada médium inisiasi.

Inisiasi tunas adventif

Inisiasi tunas aksiler dilakukan dengan cara menanam eksplan diatas jembatan kertas yang ada dalam botol chicken brand yang telah diisi dengan medium MS cair yang mengandung 0,25 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l NAA, 1,0 mg/l BA dan 0,5 mg/l TDZ dan 30 g/l sukrosa. Kultur disimpan dalam ruang gelap selama 15-20 hari, kemudian disimpan dalam kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas ~ 13 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama \pm 1,5-2,0 bulan. Tunas pucuk mulai beregenerasi 15-20 hari setelah inkubasi diruang gelap. Tunas makin bertumbuh dan berkembang dibawah kondisi inkubasi terang dan membentuk beberapa daun pada akhir inkubasi.

Perbanyak tunas aksiler

Perbanyak tunas aksiler dilakukan dengan cara memotong tunas yang beregenerasi dengan beberapa daun dan menanam ulang pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,05 mg/l IAA, 0,25 mg/l BA, 0,5 mg/l Kin, 1 g/l arang aktif, 20 g/l sukrosa, 7 g/l agar Swallow. Hasil

subkultur tunas diinkubasi pada kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Subkultur setiap 2 bulan sekali pada tahap ini dapat dilakukan hingga 6 kali. Rhizome yang dihasilkan pada tahap ini berkisar antara 4-7 rhizome per satu rhizome yang disubkultur. Pada hasil penelitian yang lain, perbanyakan rhizome juga dapat dilakukan pada medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh tanpa hormon.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam rhizome secara tunggal pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 0,05 mg/l IAA, 0,25 mg/l BA, 0,5 mg/l Kin, 1 g/l arang aktif, 20 g/l sukrosa, 7 g/l agar Swallow. Kultur disimpan dalam kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Akar umumnya mulai terbentuk 10-15 hari setelah kultur. Jumlah akar yang terbentuk per tunas bervariasi tergantung ukuran rhizome yang disiapkan untuk aklimatisasi. Rhizome kecil menghasilkan 1-4 akar per rhizome, 4-8 untuk yang ukuran sedang dan 12-27 untuk yang ukuran besar.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 3-4 daun dan 4-8 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa dengan cara mencuci akar dibawah air yang mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan diatas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam bak-bak plastik yang berisi arang sekam yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup bak plastik dengan plastik transparan, letakkan ditempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Setelah $\pm 1,5$ bulan masa aklimatisasi, tanaman dapat dipindah dalam polybag (diameter 10 cm) yang berisi media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1,

v/v) atau arang sekam, sekam dan humus bambu/pupuk organik (1:1:1, v/v/v). Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 90-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakan leather leaf fern secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk telah berhasil dikembangkan selama \pm 2,9 tahun. Titik kritis teknologi ini terletak pada tahap inisiasi tunas dan pemindahan tunas hasil regenerasi awal ke medium multiplikasi. Keberhasilan inisiasi dan regenerasi awal dapat ditingkatkan dengan melakukan subkultur ulang dan pemotongan permukaan bagian bawah rhizome saat bagian pangkal rhizome mulai mengeluarkan senyawa fenol yang berwarna kecoklatan. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 4-7 rhizome baru. Jika rata-rata rhizome baru yang dihasilkan 5,5 rhizome tiap subkultur, 6 kali subkultur dapat dilakukan, maka total rhizome yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 27.000 rhizome dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 24.300 plantlets akan dihasilkan setelah 14 bulan. Teknologi ini berhasil diaplikasikan pada leather leaf fern milik PT. Tropika Flora Persada dari pada jenis leather leaf fern yang lain. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, regenerasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi hormon (dinaikkan atau diturunkan) dan penggunaan arang aktif kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih berkualitas leather leaf fern.

Daftar Pustaka

1. Bertrand, A.M., Albuérne, M.A., Fernández, H., González, A., Sánchez-Tamés, R. 1999, '*In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*', *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, vol. 57, no. 1, pp. 65-69.
2. Brum, F.M.R., Randi, A.M., 2002, 'High irradiance and temperature inhibit the germination of spores of the fern *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae)', *Revista Brasil. Bot.*, vol. 25, pp. 391-396.

3. Brum, F.M.R., Randi, A.M., 2006, 'Germination of spores and growth of gametophytes and sporophytes of *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) after spore cryogenic storage', *Revista Brasil. Bot.*, vol. 29, pp. 489-495.
4. D'Souza, G.C., Kubo, R., Guimarães, L., Elisabetsky, E., 2006, 'An ethnobiological assessment of *Rumohra adiantiformis* (samambaia-preta) extractivism in Southern Brazil', *Biodiv. Conserv.*, vol. 15, pp. 2737-2746.
5. Efforts on Development of Ornamental Plant Areas for Export, 2011, Viewed 19 August 2009, at: <http://hortikultura.go.id/index.php?option=com_content&task=view&id=243&Itemid=2>
6. Reid, M.S., 2004, 'Leatherleaf Fern: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality', Postharvest Technology Research & Information Center, University of California, Davis, 10p.
7. Strandberg, J.O., 2003, 'Seasonal variations in production and development of leatherleaf fern leaves', *Ann Appl. Biol.*, vol. 143, pp. 235-243.
8. Toma, R.S., Daniel, G.H., 2010, 'Effect of medium consistency and different growth regulators on Boston fern (*Nephrolepis exaltata*) micropropagation', *Int. J. Sci. Tech.*, vol. 5, no. 4, pp. 6-12.
9. Winarto, B., Teixeira da Silva, J.A., 2012a, 'Sterilization procedure for in vitro culture of leather leaf fern (*Rumohra adiantiformis*)', *Int. J. Plant Dev. Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 45-50.
10. Winarto, B., Teixeira da Silva, J.A., 2012b, 'Improved micropropagation protocol for leather leaf fern (*Rumohra adiantiformis*) using rhizomes as donor explant', *Sci. Hort.*, vol. 140, pp. 74-80.
11. Zenkteler, E., 2006, 'Micropropagation of *Matteucia struthiopteris* (L.) Tod. through meristem proliferation from rhizomes', *Biodiv. Res. Conserv.*, vol. 1-2, pp. 167-173.



Gambar 10. Teknologi perbanyakan *R. adiantiformis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas pucuk, a. Rhizome yang menjadi sumber eksplan, b. Kultur awal rhizome diatas jembatan kertas sederhana yang diisi dengan medium MS cair yang mengandung 0,25 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l NAA, 1,0 mg/l BA, dan 0,5 mg/l TDZ dengan 30 g/l sucrose, c. Rhizome yang mulai beregenerasi 10-15 days setelah kultur dalam ruang gelap, d. Rhizome yang beregenerasi dan membentuk sejumlah daun ± 1 bulan setelah kultur pada kondisi terang, f. Rhizome beregenerasi yang sudah dipotong dan dikultur pada medium ½ MS semi padat yang mengandung 0,05 mg/l IAA, 0,25 mg/l BA, 0,5 mg/l Kin, 1 g/l arang aktif, 20 g/l sucrose, dan 7 g/l agar Swallow untuk tujuan perbanyakan, g. Regenerasi rhizome 2 bulan setelah subkultur ke-2, h. Perbanyakan rhizome pada medium yang sama, i. awal penurunan kualitas rhizome yang ditunjukkan dengan adanya penguningan hingga pencoklatan daun, j. Rhizome tunggal yang disiapkan untuk aklimatisasi, k. Akar yang dihasilkan pada rhizome tunggal, l. Rhizome besar yang siap diaklimatisasi, m. Plantlets 1 bulan setelah aklimatisasi, n-o. Kondisi rhizome yang terus bertumbuh dimedia arang sekam ± 2 bulan setelah aklimatisasi, p-q. pertumbuhan rhizome setelah repotting (umur ± 4 bulan dan 6 bulan).

11. Teknologi perbanyakan *Lisianthus (Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn)* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.

Pendahuluan

Lisianthus (Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn), salah satu anggota family *Gentianaceae* (Mousavi *et al.*, 2012a), merupakan salah satu komoditas tanaman hias penting di Asia Tenggara, termasuk Indonesia (Demas *et al.*, 2009). Di Indonesia tanaman ini dibudidayakan secara luas di daerah Ciplaras-Cianjur dan Cihideung-Bandung, Jawa Barat; Batu-Malang, Jawa Timur dan Baturiti-Tabanan, Bali. Tanaman hias ini umumnya digunakan sebagai bunga potong dan tanaman pot dengan bunga yang menyerupai bunga mawar, warna, bentuk dan ukuran bunga bervariasi, serta memiliki masa simpan hingga 6 minggu (Shimizu dan Ichimura, 2005; Yamada *et al.*, 2008; Mousavi *et al.*, 2012ab). Bunga *lisianthus* dikelompokkan kedalam bunga potong yang mahal, karena dari satu tangkai infloresennya dapat dijual dengan harga Rp. 350.000,00 per infloresen.

Secara konvensional *E. grandiflorum* umumnya diperbanyak secara vegetative menggunakan stek dan secara generative menggunakan biji (Mousavi *et al.*, 2012ab; Rezaee *et al.*, 2012). Perbanyakan secara vegetative umumnya memerlukan tenaga dan waktu yang banyak dengan hasil yang tidak maksimal, sementara pemanfaatan biji tidak efisien karena tanaman ini menyerbuk silang dengan kemampuan biji berkecambah yang rendah (Arpana *et al.*, 2012; Rezaee *et al.*, 2012; Mousavi *et al.*, 2012b). Biji yang dihasilkan berukuran kecil, menghasilkan benih yang tidak seragam dan mudah mengalami pemendekan ruas batang (*rosette*) (Furukawa *et al.*, 1990). Tanaman yang berasal dari biji, pada beberapa varietas, memperlihatkan variasi yang sangat besar karena karakter yang heterogenous dan memerlukan waktu berbunga 4.5 bulan atau lebih hingga masa pembungaan (Furukawa *et al.*, 1990). Oleh karena itu teknik perbanyakan masa yang lebih cepat dan menjamin kualitas dan kuantitas benih berkualitas yang dihasilkan sangat dibutuhkan untuk pengembangan tanaman ini.

Beberapa teknologi perbanyakkan masa lisianthus secara *in vitro* telah dilaporkan. Semeniuk dan Griesbach, 1987) menginduksi banyak tunas dari tunas pucuk dan potongan internodus pada medium MS yang ditambah dengan 3 mg/l BA dan diakarkan pada medium MS yang mengandung 2 mg/l IAA. Lima belas tunas per eksplan diperolah dengan menanam tunas pucuk pada medium MS yang ditambah dengan 1 mg/l BA dan 0,25-0,86 mg/l IAA (Paek dan han, 2000). Tunas baru yang banyak juga dihasilkan dari tunas pucuk yang dikultur pada medium Medium MS yang ditambah dengan 0.3-1.0 mg/l Kin (Esizad *et al.*, 2012; Kaviani, 2014), medium B5 yang ditambah dengan 1.5 mg/l NAA sesuai untuk induksi kalus (Mousavi *et al.*, 2012a), sementara proliferasi tunas aksiler berhasil diinduksi pada medium B5 yang mengandung 0,5 mg/l asam gibberellin (GA3) dan 1,5 mg/l BA (Mousavi *et al.*, 2012b). Sedangkan teknologi perbanyakkan menggunakan inisiasi dan perbanyakkan tunas adventif menggunakan daun sebagai sumber eksplan belum pernah dilaporkan.

Metode perbanyakkan lisianthus secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan (Winarto *et al.*, 2014; Belum dipublikasikan). Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas adventif, (4) perbanyakkan tunas adventif, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 11) dan diperlukan waktu \pm 1,6 tahun untuk mengembangkannya.

Teknologi perbanyakkan *E. grandiflorum* ‘White Lavender’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.

Bahan dan alat

Bahan

- *E. grandiflorum* ‘White Lavender’
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- Thidiazuron (TDZ= 3,0 mg/l), N6-benzyladenine (BA= 0,1-0,5 mg/l), dan α -naphthalene acetic acid (NAA= 0,002-0,3 mg/l)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)

- 1% dan 2% (5,25% NaOCl)
- Sukrosa (30 g/l)
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/balsam/jam
- Botol sterilisasi (Botol angrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *E. grandiflorum* 'White Lavender'. Tunas lateral yang menjadi sumber eksplan didapatkan dari PT. Ciputri Molek, Pasir sarongge, Pacet-Cianjur, Jawa Barat, Indonesia. Tunas dengan 4-5 daun dan \pm 8 cm panjang tunas dipanen dari tanaman induk yang ada di PT. Ciputri Molek pada pagi hari. Tunas-tunas inilah yang selanjutnya dipersiapkan untuk proses sterilisasi.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tunas yang telah dipanen dari tanaman induk dikurangi jumlah daunnya dengan memotong dan disisakan hanya 2 daun saja menggunakan

pisau kultur. Tunas kemudian diberi pra-perlakuan dengan cara merendam tunas dalam 1% larutan pestisida (50% benomil dan 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit sambil digojok, kemudian dibilas beberapa kali dengan air hingga bersih. Eksplan kemudian dibawa ke dalam laminar air flow cabinet dan disterilisasi dengan 1% sodium hipoklorida (5.25% NaOCl) yang telah ditambah dengan beberapa tetes Tween 20 selama 10 menit, 2% NaOCl selama 5 menit dan terakhir dengan dibilas dengan air destilata steril 5-6x (@ 3-5 menit). Eksplan selanjutnya ditiriskan beberapa saat dalam botol sterilisasi yang ditutup ujungnya dengan tisu steril untuk mengurangi jumlah air yang menempel pada permukaan eksplan.

Setelah sterilisasi, eksplan selanjutnya diambil dan diletakkan diatas cawan Petri steril. Daun muda yang pertama diisolasi dengan cara menarik pelan-pelan daun dengan pinset hingga terlepas. Daun selanjutnya dikultur pada medium inisiasi. Pelukaan permukaan daun dapat juga dilakukan untuk meningkatkan potensi eksplan dalam membentuk kalus.

Inisiasi tunas adventif

Inisiasi tunas adventif dilakukan dengan cara menanam potongan daun dengan posisi terbalik pada medium MS yang ditambah 0,5 mg/l BA, 0,002 mg/l NAA, 30 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite. Kultur disimpan dalam kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Kalus umumnya akan terbentuk pada bagian pangkal tangkai daun yang mengalami pelukaan. Kalus mulai terbentuk 15-20 hari setelah kultur. Tunas adventif mulai terbentuk pada ± 8 minggu setelah kultur. Empat hingga tiga belas tunas dengan 1-3 daun dmudah diamati 11 minggu setelah kultur. Subkultur berulang pada tahap ini dapat dilakukan setiap 1 bulan sekali untuk meningkatkan kualitas dan produktivitas eksplan dalam menghasilkan tunas adventif.

Perbanyak tunas adventif

Perbanyak tunas adventif dilakukan dengan cara memindahkan, memecah ukuran kalus (jika ukuran kalus besar lebih dari 0,5 cm) dengan

bakal tunas dan menanam kembali ke medium MS yang ditambah 0,5 mg/l BA, 0,002 mg/l NAA, 30 g/l sukrosa dan 7 g/l agar Swallow. Kultur disimpan di bawah kondisi inkubasi yang sama selama \pm 2 bulan. Regenerasi tunas adventif yang baru mulai terbentuk 15-20 hari setelah kultur. Tunas adventif tumbuh dan berkembang seiring dengan waktu inkubasi. Ratio kecepatan penggandaan tunas adventif berkisar antara 1,65-2,00. Tunas adventif dapat disubkultur hingga subkultur ke-4, setelah itu inisiasi tunas adventif dari eksplan yang baru sangat disarankan.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 daun ke medium MS yang ditambah dengan 0,1 mg/l BA dan 0,02 mg/l NAA, 20 g/l sukrosa dan 7 g/l agar Swallow. Kultur tunas kemudian disimpan dalam kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas \sim 13 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama \pm 2 bulan. Akar umumnya mulai terbentuk \pm 15 hari setelah kultur. Jumlah akar yang terbentuk per tunas berkisar antara 2-4 akar dengan panjang yang bervariasi setelah \pm 2 bulan masa inkubasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 2-4 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar dengan cara mencuci akar dibawah air mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan diatas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam bak-bak plastik yang berisi arang sekam yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup bak plastik dengan plastik transparan, letakkan ditempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Setelah 1,5-2,0 bulan masa aklimatisasi, tanaman dapat dipindah dalam polybag (diameter 10 cm) yang berisi media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1, v/v) atau arang sekam, sekam dan humus bambu/pupuk organik (1:1:1, v/v/v). Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 75-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakkan *E. grandiflorum* 'White Lavender' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan. Titik kritis teknologi ini terletak pada inisiasi tunas adventif yang berkualitas dan komposisi hormon yang digunakan. Daun muda, baik yang pertama maupun yang kedua, dapat digunakan sebagai sumber eksplan untuk teknologi ini dengan sedikit variasi hasil. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 4-13 tunas adventif. Jika rata-rata tunas adventif yang dihasilkan adalah 8 tunas tiap subkultur, 5 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 32.000 tunas dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan penyiapan plantlets 10%, maka 28.800 plantlet akan dihasilkan; selanjutnya jika kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 25.920 plantlets akan dihasilkan setelah 16 bulan. Teknologi ini dapat diaplikasikan pada varietas yang lain. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, regenerasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi hormon (dinaikkan atau diturunkan) dan penggunaan arang aktif kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakkan benih berkualitas lisianthus.

Daftar Pustaka

1. Arpana, M., Singh, M.K., Raja, R., Kumar, S., Prasad, R., Ahuja, P.S., 2012, 'Effect of *in vivo* and *in vitro* seed germination and performance of *Lisianthus* seedlings', *Indian J. Hort.*, vol. 69, no. 1, pp. 136-139.
2. Esizad, S.G., Kaviani, B., Tarang, A., Zanjani, S.B., 2012, 'Micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), an ornamental plant', *POJ.*, vol. 5, no. 3, pp. 314-319.
3. Furukawa, H., Matsubara, C., Shigematsu, N., 1990, 'Shoot regeneration from the root of Prairie Gentian (*Eustoma grandiflorum* (Griseb.) Schinners)', *Plant Tiss Cult. Let.*, vol. 7, no. 1, pp. 11-13.
4. Kaviani, B., 2014, 'Micropropagation of Ten Weeks (*Matthiola Incana*) and Lisianthus (*Eustoma Grandiflorum*) (Two Ornamental Plants) by Using Kinetin (Kin), Naphthalene Acetic Acid (NAA) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)', *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, vol. 13, no. 1, pp. 141-154.

5. Mousavi, E.S., Behbahani, M., Hadavi, E., Miri, S.M., 2012a, 'Callus induction and plant regeneration in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)', *Trakia J. Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 22-25.
6. Mousavi, E.S., Behbahani, M., Hadavi, E., Miri, S.M., Karimi, N., 2012b, 'Plant regeneration in *Eustoma grandiflorum* from axillaries buds (Gentianaceae)', *Trakia J. Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 75-78.
7. Paek, K.Y., Hahn, E.J., 2000, 'Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.]', *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, vol. 36, pp. 118-124.
8. Rezaee, F., Ghanati, F., Boroujeni, L.Y., 2012, 'Micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* L.) from different explants to flowering onset', *Iranian J. Plant Physiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 583-587.
9. Semeniuk, P., Griesbach, R.J., 1987, 'In vitro propagation of prairie gentian', *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, vol. 8, pp. 249-253.
10. Shimizu, H., Ichimura, K., 2005, 'Effects of silver thiosulfate complex (STS), sucrose and their combination on the quality and vase life of cut *Eustoma* flowers', *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, vol. 74, no. 5, pp. 381-385.
11. Winarto, B., Rachmawati, F., Setyawati, A.S., 2014, 'Leaf-derived organogenesis in vitro for mass propagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn). *J. Agric. Sci. Tech.* (In review process).
12. Yamada, A., Tanigawa, T., Suyama, T., Matsuno, T., Kunitake, T., 2008, 'Night break treatment using different light sources promotes or delays growth and flowering of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn', *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, vol. 77, no. 1, pp. 69-74.



Gambar 11. Teknologi perbanyakan *E. grandiflorum* ‘White Lavender’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan, a. Eksplan daun pada kondisi awal kultur, b. Kalus dan tunas adventif yang terbentuk pada medium MS yang ditambah dengan 3 mg/l TDZ dan 0,01 mg/l NAA 2 bulan setelah kultur, c. Tunas adventif yang tumbuh pada medium MS yang ditambah dengan 0,5 mg/l BA dan 0,002 mg/l NAA 2 bulan setelah kultur. Penggandaan tunas adventif dari eksplan pertama pada medium MS yang ditambah 0,5 mg/l BA dan 0,002 mg/l NAA 2 bulan setelah kultur, e-f. Pembentukan akar pada tunas yang dikultur pada medium MS yang mengandung 0,1 mg/l BA dan 0,1 mg/l NAA 2 bulan setelah kultur, g. Plantlets yang direndam dalam 1% larutan pestisida selama 3 menit, h. Plantlets yang tetap hidup dan segar pada medium arang sekam dan bahan organik (1:1, v/v) 1 bulan setelah aklimatisasi, i. perkembangan plantlets hasil aklimatisasi 2 bulan setelah pengepotan ulang pada medium yang sama.

12. Teknologi perbanyakan mawar (*Rosa hybrida* L.) secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.

Pendahuluan

Mawar (*Rosa hybrida* L.) merupakan tanaman hias penting dan bernilai ekonomi tinggi di Indonesia. Tanaman ini banyak dibudidayakan diberbagai sentra produksi tanaman hias yang tersebar di seluruh Indonesia. Luas lahan produksi mawar mencapai 750.189 m² dengan kemampuan produksi 68.624.998 tangkai pada 2012 (BPS, 2014). Bunga mawar dijual dengan harga Rp. 2.500,00 – 5.000,00 per tangkai tergantung kualitas dan jenis varietas bunga.

Mawar dapat diperbanyak secara vegetatif menggunakan stek (*cutting*), perendukan (*layering*), okulasi mata tunas (*budding*), sambung pucuk (*grafting*); secara generatif menggunakan biji (Kermani *et al.*, 2010; Mamaghani *et al.*, 2010; Salekjalali *et al.*, 2011). Perbanyakan konvensional tersebut, meskipun dominan diaplikasikan pada perbanyakan mawar, sering diperhadapkan pada kendala keterbatasan batang bawah (Mamaghani *et al.*, 2010), berlangsung lambat, membutuhkan waktu yang lama dan tenaga yang banyak dengan hasil yang terbatas (Kermani *et al.*, 2010; Salekjalali *et al.*, 2011); sedangkan perbanyakan dengan biji menghasilkan benih yang beragam dalam kulaitas (Salekjalali *et al.*, 2011). Oleh karena itu teknologi perbanyakan masa mawar secara *in vitro* menjadi alternatif yang baik untuk mengatasi permasalahan metode konvensional tersebut.

Beberapa teknologi perbanyakan masa *R. hybrida* secara *in vitro* telah dilaporkan dan dipublikasikan. Pada *R. hybrida* ‘Black Baccara’, nodus yang dikultur pada medium MS yang ditambah 1 mg/l BA untuk induksi dan perbanyak tunas aksiler, kemudian diakarkan pada medium $\frac{3}{4}$ MS yang ditambah 0,5 mg/l NAA (Bayanati dan Mortazavi, 2013). Medium MS penuh yang mengandung 1 mg/l BA sesuai untuk perbanyakan tunas pucuk *R. hybrida* ‘Baccara’, sementara pengakaran tunas menggunakan medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 2 mg/l IBA (Salekjalali *et al.*, 2011), MS yang ditambah 3 mg/l BA dan 0.003 mg/l NAA untuk induksi dan proliferasi tunas aksiler dari nodus dan $\frac{1}{4}$ medium MS tanpa ZPTe untuk pengakaran tunas pada *R. hybrida* ‘Perfume Delight’ (Nak-Udom

et al., 2009). Teknologi perbanyakkan masa mawar juga dilaporkan pada *R. indica* (Hameed *et al.*, 2006; Shabbir *et al.*, 2009), *R. persica* (Kermani *et al.*, 2010), *R. damascena* ‘Ispahan’ (Tabesh *et al.*, 2013); sedangkan untuk *R. hybrida* ‘Kiss’ belum pernah dilaporkan.

Teknologi perbanyakkan *R. hybrida* ‘Kiss’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan (Winarto, 2006). Teknologi ini telah dipublikasikan di jurnal nasional yang terakreditasi. Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan dan penyiapan eksplan, (3) inisiasi tunas adventif, (4) perbanyakkan tunas adventif, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 12)

Teknologi perbanyakkan *R. hybrida* ‘Kiss’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.

Bahan dan alat

Bahan

- *R. hybrida* ‘Kiss’
- Medium Mawar Winarto (MW; Winarto, 2006) dan WT (Winarto *et al.*, 2011)

Komposisi Medium	MW
Makro elemen	
NH_4NO_3	550
KNO_3	1.250
MgSO_4	180
CaCl_2	300
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	200
KH_2PO_4	150
Mikro elemen	
H_3BO_3	6,2
KI	0,75
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11,50

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	9,0
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,5
Vitamin	
Glycine	0,5
Myo-inositol	100,0
Nicotinic acid	0,1
Pyridoxine-HCl	0,1
Thiamine-HCl	1,0

- Thidiazuron (TDZ= 1,5 mg/l), N6-benzyladenine (BA= 1,5 mg/l) dan α -naphthalene acetic acid (NAA= 0,01 mg/l) (Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (1,8 g/l) (Sigma)
- 0,05% HgCl₂ (Merck)
- Sukrosa (30 g/l)
- Tween 20 (Applichem)
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/balsam/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)

- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *R. hybrida* ‘Kiss’ yang tumbuh subur dan sehat, berumur 1,0-1,5 tahun, yang diambil dari petani mawar disekitar Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung. Tunas-tunas muda dengan 2-3 daun, panjang \pm 5 cm dipanen dari tanaman induk pada pagi hari. Tunas inilah yang digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tunas yang dipanen dari tanaman induk selanjutnya dikurangi jumlah daun dan ukurannya dengan memotongnya menggunakan pisau kultur. Tunas kemudian direndam dalam 1% larutan Tween 20 selama 30 menit sambil digojok. Eksplan dipindahkan dalam 1% larutan pestisida (50% benomyl dan 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit sambil digojok, kemudian dibilas beberapa kali dengan air hingga bersih. Eksplan kemudian dibawa ke dalam laminar air flow cabinet dan disterilisasi dengan 0,05% HgCl_2 yang telah ditambah dengan beberapa tetes Tween 20 selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air destilata steril 5-6x (@ 3-5 menit). Eksplan ditiriskan beberapa saat dalam botol sterilisasi yang ditutup ujungnya dengan tisu steril untuk mengurangi jumlah air yang menempel pada permukaan eksplan.

Setelah sterilisasi, eksplan selanjutnya diambil dan diletakkan diatas cawan Petri steril. Eksplan kemudian dipotong menggunakan pisau kultur dimulai dari titik tumbuh, nodus 1 dan 2. Eksplan kemudian ditanam dalam médium MS yang ditambah dengan 1,5 mg/l BA untuk menginduksi tumbuhnya tunas aksiler dan proliferasinya. Kultur diinkubasi dibawah kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu

fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Tunas aksiler mulai tumbuh 8-13 hari setelah kultur. Tunas aksiler terus tumbuh dan berkembang dan pada akhir inkubasi 1-3 tunas dengan 1-2 daun dapat diamati. Subkultur tunas aksiler untuk tujuan penyiapan jumlah eksplan dilakukan setiap 2 bulan sekali hingga jumlah eksplan mencukupi (± 2 kali subkultur). Tunas-tunas dengan 3 daun hasil penyiapan selanjutnya digunakan sebagai sumber eksplan untuk inisiasi dan proliferasi tunas adventif. Eksplan yang digunakan adalah bagian internodus yang ke-2. Internodus dipotong dengan panjang $\pm 0,3-0,4$ cm menggunakan pisau kultur dan siap digunakan sebagai sumber eksplan.

Inisiasi tunas adventif

Inisiasi tunas adventif dilakukan dengan cara menanam potongan internodus pada medium MW yang ditambah dengan 1,5 mg/l TDZ dan 0,01 mg/l NAA. Kultur kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 1,5-2,0 bulan. Inisiasi kalus mulai terlihat 9-13 hari setelah kultur pada permukaan internodus bekas potongan pisau kultur. Kalus betumbuh menjadi bentuk bulatan-bulatan dan terlihat 25-35 hari setelah kultur. Pada tahap berikutnya tunas dengan 1-2 daun mulai terbentuk pada akhir kultur.

Perbanyak tunas adventif

Perbanyak tunas adventif dilakukan dengan cara memindahkan dan memecah ukuran kalus (jika ukuran kalus besar lebih dari 0,5 cm) dan menanam kembali kalus dengan bakal tunas pada media yang sama dan diinkubasi di bawah kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 2 bulan. Tunas-tunas adventif terus bertumbuh dan berkembang dalam jumlah dan ukuran. Tunas yang terbentuk pada akhir kultur berkisar antara 5-9 tunas per eksplan. Subkultur tunas adventif dapat dilakukan berulang setiap 2 bulan sekali hingga 6 kali. Subkultur disarankan untuk dihentikan saat tunas sudah mulai membentuk akar.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 daun ke medium WT tanpa

hormon yang ditambah dengan 20 g/l sukrosa dan 7 g/l agar Swallow. Kultur tunas kemudian disimpan dalam kondisi inkubasi yang sama dengan kegiatan sebelumnya. Jumlah akar yang terbentuk per tunas berkisar antara 1-3 akar dengan panjang yang bervariasi setelah 2 bulan masa inkubasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 2-4 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar dengan cara mencuci akar dibawah air mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan diatas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam pot-pot plastik yang berisi arang sekam yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup pot plastik dengan plastik transparan, letakkan ditempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Setelah 1,5-2,0 bulan masa aklimatisasi, tanaman dipindah dalam pot plastik (diameter 10 cm) yang berisi media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1, v/v) atau arang sekam, sekam dan humus bambu/pupuk organik (1:1:1, v/v/v). Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 85-100%.

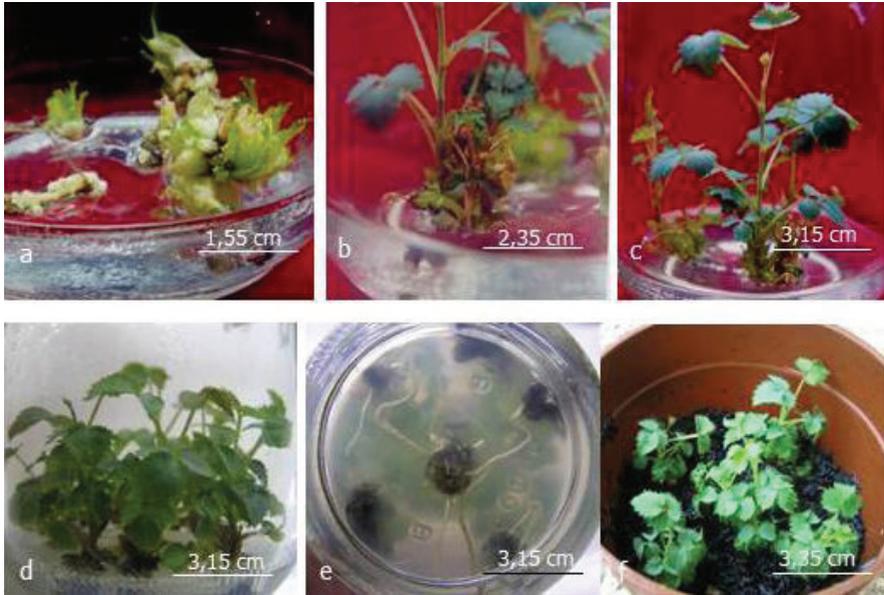
Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakkan *R. hybrida* 'Kiss' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan. Waktu yang dibutuhkan untuk mengembangkan teknologi adalah \pm 1,6 tahun. Titik kritikal teknologi ini terletak pada penyiapan eksplan pada kondisi *in vitro*. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 5-9 tunas. Jika rata-rata tunas yang dihasilkan adalah 6,7 tunas tiap subkultur, 6 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 90.000 tunas dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan penyiapan plantlets adalah 10%, maka 81.000 plantlet akan dihasilkan, jika kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka

72.900 plantlets akan dihasilkan setelah 16 bulan. Teknologi ini dapat diaplikasikan pada jenis dan varietas yang lain. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi ZPT (dinaikkan atau diturunkan) dan penggunaan arang aktif kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih berkualitas mawar. Untuk meningkatkan kualitas dan keseragaman benih, seleksi eksplan pada tiap tahapan perlu dilakukan.

Daftar Pustaka

1. Bayanati, M., Mortazavi, S.N., 2013, 'Micropropagation from cultured nodal explants of *Rosa hybrida* cv. 'Black Baccara'', *Int. J. Agron. Plant Prod.*, vol. 4, no. 6, pp. 1381-1385.
2. Hameed, N., Shabbir, A., Ali, A., Bajwa, R., 2006, 'In vitro micropropagation of disease free rose (*Rosa indica* L.)', *Mycopath.*, vol. 4, no. 2, pp. 35-38.
3. Kermani, M.J., Khosravi, P., Kavand, S., 2010, 'Optimizing in vitro propagation of *Rosa persica*', *Iranian J. Gen. Plant Breed.*, vol. 1, no. 1, pp. 44-52.
4. Mamaghani, B.A., Ghorbanli, M., Assareh, M.H., Zare, A.G., 2010, 'In vitro propagation of three Damask Roses accessions', *Iranian J. Plant Physiol.*, vol. 1, no. 2, pp. 85-94.
5. Nak-Udom, N., Kanchanapoom, K., Kanchanapoom, K., 2009, 'Micropropagation from cultured nodal explants of rose (*Rosa hybrida* L. cv. 'Perfume Delight')', *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, vol. 31, no. 6, pp. 583-586.
6. Salekjalali, M., Jafari, B., Tarinejad, A., 2011, 'In vitro multiplication of Rose (*Rosa hybrida* cv. Baccara)', *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 111-116.
7. Shabbir, A., Hameed, N., Ali, A., Bajwa, R., 2009, 'Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa indica* L.)', *Pak. J. Bot.*, vol. 41, no. 6, pp. 2877-2882.
8. Tabesh, F., Kermani, M.J., Nekoueni, M.K., Mousavi, A., Khaligi, A., 2013, 'In vitro propagation of damask rose (*Rosa damascena* cv. Ispahan)', *Ann. Biol. Res.*, vol. 4, no. 8, pp. 134-138.
9. Winarto, B., 2006, 'The effect of explant types and culture media on the in vitro regeneration of adventitious shoots of rose', *J. Agrotropika*, vol. 11, no. 2, pp. 67-73



Gambar 12. Teknologi perbanyakan *R. hybrida* 'Kiss' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif, a. Tunas adventif yang terbentuk pada internodus 2.0 bulan setelah kultur, b-c. Tunas adventif yang tumbuh dan berkembang 2 bulan setelah subkultur, d-e. Pengakaran tunas pada medium WT 2 bulan setelah kultur, f. Tanaman hasil aklimatisasi 1.5 bulan setelah aklimatisasi.

13. Teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-1: Kultur Tunas Pucuk

Pendahuluan

Perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui embryogenesis atau plb telah dilaporkan. Teknologi tersebut menggunakan variasi eksplan, seperti: daun, tunas pucuk, tangkai bunga, protocorm like bodies (plbs); Murashige dan Skoog (MS) dan variasinya. Teknologi tersebut berhasil dikembangkan pada *P. Richard Shaffer* 'Santa Cruz' (Ishii *et al.*, 1998), *P. Tinny Sunshine* 'Annie', 'Taisuco Hatarot', Teipei Gold 'Golden Star', dan Tinny Galaxy 'Annie' (Park *et al.*, 2002), *P. 'Snow Parade*' dan *P. 'Wedding Promenade*' (Tokuhana dan Mii, 2003), *P. amabilis* var. 'Formosa Shimadzu' (Chen dan Chang, 2006), *P. 'Little Steve*' (Kuo *et al.*, 2005), *P. 'Hwa Feng Red Jewel*' (Liu *et al.*, 2006), *P. gigantea* (Murdad *et al.*, 2006), *P. amabilis* (Nhut *et al.*, 2006; Gow *et al.*, 2008), *P. amabilis* cv. 'Golden Horizon' (Sinha dan Jahan, 2011), *P. 'Nebula*' (Gow *et al.*, 2009) dan *Phalaenopsis sp.* (Rianawati *et al.*, 2009; Samson *et al.*, 2010), dimulai dari tahap inisiasi hingga aklimatisasinya. Embryogenesis diawali dengan terbentuknya sel-sel embriogenik, sel embriogenik selanjutnya bertumbuh membentuk globular (*globular shape*) → bentuk hati (*heart shape*) → bentuk torpedo (*torpedo shape*) → embrio dewasa (*cotyledonary stage*) (Umehara *et al.*, 2007).

Pada bagian ini akan diuraikan teknologi perbanyakan masa *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-1: Kultur Tunas Pucuk (Winarto *et al.*, 2012 dan 2013). Teknologi ini terdiri dari (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan dan penyiapan eksplan, (3) inisiasi tunas aksiler dan isolasi tunas pucuk, (4) inisiasi embrio, (5) perbanyakan embrio, (6) perkecambahan embrio dan penyiapan plantlets dan (7) aklimatisasi plantlets (Gambar 13)

Teknologi perbanyakkan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-1: Kultur Tunas Pucuk Bahan dan alat

Bahan

- Klon *Phalaenopsis* Balithi yang terseleksi.
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- Thidiazuron (TDZ= 0,5-1,5 mg/l), N6-benzyladenine (BA= 0,25 mg/l) (Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)
- 0,05% dan 0,01% HgCl₂ (Merck)
- Sukrosa (20 g/l) (Merck)
- Alkohol 96%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Tween 20 (Applichem-Darmstadt-Jerman)
- Sunlight (Unilever, Bekasi, Jawa Barat-Indonesia)
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- Growmore (NPK, 32:10:10, New Century Drive, Gardena, CA-USA)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Mikroskop stereo
- Lampu belajar
- Botol chicken brand/balsam/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (10 dan 25 cm)

- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah klon *Phalaenopsis* Balithi yang terseleksi yang tumbuh subur dan sehat, berumur 1,0-1,5 tahun. Tanaman donor ditanam dalam pot tanah/plastik (diameter 20 cm, berisi arang kayu dan potongan pakis). Tanaman donor ditempatkan dalam rumah kaca/rumah plastik dan dipelihara melalui penyiraman dan pemupukan. Pupuk cair (1-2 g/l Growmore: 32N:10P:10K) diaplikasikan setiap 2 hari sekali dengan cara disemprotkan. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Tangkai bunga dimana 50-100% kuncup bunga mekar dapat digunakan dan dipanen sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tangkai bunga infloresen dipanen dari tanaman donor dengan cara memotongnya pada bagian bawah (2-3 cm dari bagian pangkal tangkai). Tangkai bunga selanjutnya di usap merata beberapa kali dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol 96%. Setelah itu eksplan dipotong menggunakan pisau kultur dengan panjang 1,5-2,0 cm dibawah dan dibagian atas ruas tunas. Ruas tangkai bunga yang digunakan adalah tangkai bunga tanpa kuncup bunga yang jumlahnya hanya 3-4 ruas. Eksplan selanjutnya diletakkan dibawah air mengalir selama \pm 1 jam, direndam dalam larutan detergen 1% selama 30 menit, 1% larutan pestisida (50% benomyl dan 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit sambil digojok, kemudian dibilas beberapa kali dengan air hingga bersih.

Tangkai bunga tanpa kuncup bunga selanjutnya disterilisasi menggunakan 0,05% $HgCl_2$ yang telah ditambah beberapa tetes Tween 20 selama 10 menit sambaik digojok. Bilas eksplan dengan air steril hingga

bersih (5-6x, @ 3 menit). Setelah itu pembuangan seludang ruas yang menutupi bakal tunas dengan pisau kultur. Eksplan kemudian direndam dalam larutan 0,01 % HgCl_2 yang telah ditambah dengan beberapa tetes Tween 20 selama 2-3 menit sambil digojok, bilas dengan air destilasi steril 5-6x (@ 3 menit). Eksplan selanjutnya ditiriskan dalam petri steril yang berisi tisu steril.

Inisiasi tunas aksiler dan isolasi tunas pucuk (meristem dan empulur)

Inisiasi tunas aksiler yang akan digunakan sebagai donor eksplan dilakukan dengan menanam nodus pada posisi tegak lurus pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 1,5 mg/l TDZ, 0,25 mg/l BA, 20 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite. Kultur selanjutnya diinkubasi dalam kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama 1,0-1,5 bulan. Tunas pada nodus umumnya mulai pecah masa dormansinya dan tumbuh 5-10 hari setelah kultur. Tunas terus tumbuh dan berkembang dan mencapai ukuran 0,5-0,8 cm pada akhir masa inkubasi. Tunas inilah yang selanjutnya digunakan sebagai sumber eksplan dalam perbanyakkan masa Phalaenopsis.

Tunas yang sudah siap selanjutnya diletakkan di bawah mikroskop stereo untuk tujuan isolasi sel meristem dan empulur pada pembesaran 20-40 \times . Dengan bantuan cahaya lampu yang ditambahkan dan menggunakan pinset dan pisau kultur, isolasi meristem dan empulur dilakukan dengan cara membuka seludang dan bakal daun secara hati-hati. Satu demi satu bakal daun dibuka hingga titik tumbuh (*apical dome*; ukuran 0,2-0,4 mm) ditemukan. Setelah apical dome mudah terlihat, dengan menggunakan pisau yang berbeda dilakukan pemotongan tegak lurus kearah pangkal tunas dengan ukuran $\pm 0,3 \times 0,3 \times 0,6$ mm (panjang \times lebar \times tinggi). Titik tumbuh yang mengandung sel-sel meristem dan empulur selanjutnya diletakkan pada tempat yang terpisah dan segera dilakukan pemotongan dan pemisahan mulai dari titik tumbuh, $0,3 \times 0,3 \times 0,1$ mm (panjang \times lebar \times tinggi); sel-sel meristem, $0,3 \times 0,3 \times 0,2$ mm (panjang \times lebar \times tinggi) dan empulur, $0,3 \times 0,3 \times 0,3$ mm (panjang \times lebar \times tinggi). Setelah isolasi berhasil dilakukan, eksplan sel meristem dan empulur **harus segera ditanam** untuk menghindari terjadinya dehidrasi eksplan

yang menyebabkan kematian. Tahap ini merupakan tahap paling kritis dan sulit dalam teknologi ini.

Inisiasi embrio

Inisiasi embrio dilakukan dengan cara menanam eksplan dalam bentuk sel meristem dan empulur pada medium $\frac{1}{2}$ MS dengan Fe dan vitamin penuh yang ditambah dengan 0,5 atau 0,75 mg/l TDZ, 0,25 mg/l BA, 20 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite atau medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah 1,0-1,5 mg/l TDZ, 0,25 mg/l BA, 20 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite (untuk varietas atau klon yang kurang responsif). Kultur kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 1,5-2,0 bulan. Kalus embriogenik umumnya mulai terbentuk 10-15 hari setelah kultur hampir pada seluruh permukaan eksplan. Bakal embrio mulai jelas terlihat 1,0-1,5 bulan setelah kultur dan embrio yang masih berukuran kecil mudah diamati diakhir masa inkubasi. Kultur selanjutnya dipindahkan pada inkubasi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama 1,0-1,5 bulan untuk pembesaran embrio. Pada tahap ini jumlah embrio bervariasi dari 8-27 embrio per eksplan, terutama pada bagian empulur.

Perbanyakkan tunas embrio

Perbanyakkan embrio dilakukan dengan cara kultur embrio tunggal pada medium yang sama. Embrio hasil kegiatan inisiasi diletakkan pada cawan petri steril di bawah mikroskop stereo. Dengan penambahan cahaya dan menggunakan pisau kultur dan pinset dilakukan isolasi embrio dengan cara memisahkan satu dengan yang lain secara hati-hati. Embrio kemudian dikultur pada medium $\frac{1}{2}$ MS dengan Fe dan vitamin penuh yang ditambah 0,5-0,75 mg/l TDZ, 0,25 mg/l BA, 20 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite. Kultur embrio tunggal diinkubasi pada kondisi gelap 1,0-1,5 bulan, kemudian dipindahkan dalam kondisi terang selama 1,0-1,5 bulan. Bakal embrio mulai terbentuk pada bagian tengah embrio dengan terlihatnya tonjolan-tonjolan diseluruh permukaan 15-20 hari. Bakal embrio makin jelas terlihat 1,0-1,5 bulan setelah kultur. Embrio berukuran kecil makin bertumbuh dan berkembang dan embrio yang

siap disubkultur pada tahap berikutnya mudah jelas terlihat diakhir masa inkubasi. Pada tahap ini jumlah embrio sekunder yang dihasilkan berkisar antara 10-30 embrio. Subkultur embrio untuk tujuan produksi embrio sekunder dapat dilakukan hingga subkultur yang ke-5, setelah itu produksi embrio sekunder menurun dalam jumlah dan kualitas.

Perkecambahan embrio dan penyiapan plantlets

Perkecambahan embrio dilakukan dengan menanam embrio dalam kondisi tunggal atau berkelompok pada medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh tanpa hormon pada kondisi terang selama 2,0-3,0 bulan. Pada tahap ini perkecambahan embrio mulai terjadi 10-15 hari setelah kultur yang terlihat dengan pecahnya koleoptilar dan membentuk bakal daun. Bakal daun pertama mulai terlihat 15-20 hari setelah kultur. Tunas dengan 2-3 daun dan 1-3 akar dapat diamati pada akhir masa inkubasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 1-3 akar dari dalam botol kultur menggunakan pinset. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar yang menempel dengan cara mencuci akar di bawah air yang mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan diatas kertas Koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam bak/pot plastik yang berisi potongan pakis yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Pot plastik dengan plantlet kemudian ditempatkan pada tempat yang teduh (penutupan pot plastik dengan plastik transparan dapat dilakukan pada 5-7 hari diawal aklimatisasi jika diperlukan). Dua hingga tiga bulan setelah aklimatisasi pengepotan tanaman tunggal dapat dilakukan. Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 80-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakkan *Phalaenopsis* melalui inisiasi dan proliferasi embrio telah berhasil dikembangkan. Pengembangan teknologi ini membutuhkan waktu \pm 4 tahun. Titik kritis teknologi ini terletak pada

tahap isolasi dan kultur inisiasi karena adanya resiko pencoklatan eksplan dan kontaminasi. Keberhasilan teknologi ini sangat dipengaruhi oleh (1) kualitas komponen media yang digunakan dan (2) keberhasilan isolasi sel meristem dan (3) inisiasi embrio. Pada banyak kasus yang ditemukan di lapangan, substitusi beberapa komponen medium dapat menyebabkan penurunan dan bahkan kegagalan aplikasi teknologi ini. Keberhasilan teknologi ini dapat ditingkatkan dengan melakukan subkultur berulang eksplan (pada setiap tahapan) pada medium yang sama setiap 15 hari sekali. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 8-30 embrio. Jika rata-rata embrio yang dihasilkan adalah 10 embrio tiap subkultur, 5 kali subkultur dapat dilakukan, maka total embrio yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 100.000 embrio dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan perkecambahan dan penyiapan plantlets adalah 10%, maka 90.000 plantlets akan dihasilkan setelah 16,5 bulan; kemudian persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10% juga, maka 81.000 tanaman dari 1 eksplan akan dihasilkan setelah 19,5 bulan. Teknologi ini berhasil diaplikasikan pada berbagai varietas dan klon terseleksi *Phalaenopsis* Balithi. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, regenerasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi ZPT (dinaikkan atau diturunkan) kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih berkualitas *Phalaenopsis*. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Chen, J.T., Chang, W.C., 2006, 'Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*', *Biol. Plant.*, vol. 50, no. 2, pp. 169-173
2. Gow, W.P., Chen, J.T., Chang, W.C., 2008, 'Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids', *Acta Physiol Plant.*, vol. 30, pp. 507-512/
3. Gow, W.P., Chen, J.T., Chang, W.C., 2009, 'Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length', *Acta Physiol Plant.* Published online: 22 December 2009

4. Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M., Tanaka, M., 1998, 'Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*', *Plant Cell Rep.*, vol. 17, pp. 446–450.
5. Kuo, H.L., Chen, J.T., Chang, W.C., 2005, 'Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'', *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, vol. 41, pp. 453–456.
6. 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.*, vol. 86, pp. 125–129.
7. Murdad, R., K.S. Hwa, C.K. Seng, M.A. Latip, Z.A Aziz, R. Ripin (2006) High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique', *Sci. Hort.*, vol. 111, pp. 73–79.
8. Nhut, D.T., Hai, N.T., Don, N.T., Teixeira da Silva, J.A., Tran Thanh Van, K., 2006, 'Latest applications of Thin Cell Layer (TCL) culture systems in plant regeneration and morphogenesis', In: Teixeira da Silva, J.A. (Ed), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues* (1st Edn, Vol II), Global Science Books, London, UK, pp. 465-471.
9. Park, S.Y., Murthy, H.N., Paek, K.Y., 2002, 'Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves', *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, vol. 38, pp. 168–172.
10. Rianawati, S., Purwito, A., Marwoto, B., Kurniati, R., Suryanah, 2009, 'Embriogenesis somatik dari eksplan daun Anggrek *Phalaenopsis sp. L.*', *J. Agron. Indonesia*, vol. 37, no. 3, pp. 240-248.
11. Samson, I., Hamama, L., Letouze, R., Samson, I., 2010, 'The role of new synthetic cytokinin in the improvement of mass propagation of *Phalaenopsis* via protocorms regeneration', *ISHS Acta Horticulturae 508: XIX International Symposium on Improvement of Ornamental Plants*.
12. Sinha, P., Jahan, M.A.A., 2011, 'Clonal Propagation of *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL. cv. 'Golden Horizon' Through *In vitro* Culture of Leaf Segments', *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, vol. 46, no. 2, pp. 163-68.
13. Umehara, M., Ikeda, M., Kamada, H., 2007, 'Endogenous Factors that Regulate Plant Embryogenesis: Recent Advances', *Jap. J. Plant Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 1-6.
14. Winarto, B., Shintiavira, H., Wegadara, M., 2012, 'Optimasi media-sumber karbon, posisi-ukuran eksplan, dan media proliferasi yang optimal untuk perbanyakkan *Phalaenopsis* Balithi secara meriklon dan perbanyakkan klon-klon terpilih', Laporan Hasil Penelitian, Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln. Raya Ciherang, Pacet-Cianjur 43253, Jawa Barat, Indonesia, 30 hal.
15. Winarto, B., Rianawati, S., Shintiavira, H., 2013, 'Optimasi kultur meristem dan aplikasi 'Thin Cell Layer (TCL)' untuk perbanyakkan masa *Phalaenopsis* Balithi', Laporan Hasil Penelitian, Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln. Raya Ciherang, Pacety-Cianjur, 43253, Jawa Barat, Indonesia, 21 hal.



Gambar 13. Teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio, a. Nodus eksplan tanpa kuncup bunga yang digunakan sebagai sumber eksplan, b. Tangkai bunga dengan bakal tunas yang mulai pecah 10 hari setelah kultur, c. Tunas yang tumbuh dan siap digunakan sebagai sumber eksplan 1,5 bulan setelah kultur, d. Peralatan yang dibutuhkan untuk melakukan isolasi sel meristem dan empulur, e. Tunas yang telah dipotong pada 2 sisinya untuk menunjukkan kondisi sel meristem yang akan diisolasi, f. Titik tumbuh, sel meristem dan empulur yang berhasil diisolasi. Lingkaran merah menunjukkan daerah yang diisolasi, g. Sel meristem pada awal kultur, h. Sel meristem yang telah membentuk bakal embrio 1,5 bulan setelah kultur, i. Embrio kecil yang terbentuk 2,2 bulan setelah kultur, j. Embrio dewasa yang siap disubkultur 3 bulan setelah kultur, k. Embrio tunggal hasil isolasi yang siap disubkultur untuk tujuan perbanyakan embrio, l. Inisiasi bakal embrio sekunder \pm 1,3 bulan setelah subkultur, m. Embrio sekunder dewasa yang siap disubkultur untuk tahap perbanyakan berikutnya, n. Perkecambahan embrio 1,6 bulan setelah kultur, o. Plantlets dengan 1-2 akar, p. Plantlets hasil aklimatisasi 2 bulan setelah aklimatisasi.

14. Teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-2: Kultur Nodus Tangkai Bunga

Pendahuluan

Perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui embryogenesis menggunakan tangkai bunga sebagai sumber eksplan telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Chin (1987) menggunakan tangkai bunga untuk menginduksi protocorm like bodies (plbs) pada medium Vacin dan Went yang ditambah dengan 1 mg/l BA. Plbs dalam jumlah mencapai 10.000 berhasil diproduksi melalui subkultur berulang tunas pucuk yang dikultur pada medium New Dogasima (NDM) yang mengandung 1,0 mg/l BAP dan 0,1 mg/l NAA (Tokuhara dan Mii, 1993; 2001). Daun dari tunas yang dinisiasi dari tangkai bunga membentuk 10-13 plbs pada medium Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan 2,0 mg/l BA dan 0,1 mg/l NAA (Park *et al.*, 2002). Tangkai bunga yang dikultur pada medium MS yang ditambah dengan 2,0 mg/l BA dan 1,5 mg/l NAA dapat menghasilkan 36 tanaman pada akhir studi (Roxana dan Bála, 2012). Sedangkan penggunaan nodus secara langsung untuk produksi embrio belum pernah dilaporkan pada kultur *in vitro* *Phalaenopsis*.

Teknologi perbanyakan masa *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-2: Kultur nodus tangkai bunga telah berhasil dikembangkan (Winarto *et al.*, 2012 dan 2013). Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan dan penyiapan eksplan, (3) inisiasi embrio, (4) perbanyakan embrio, (5) perkecambahan embrio dan penyiapan plantlets dan (6) aklimatisasi plantlets (Gambar 14).

Teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik-2: Kultur Nodus Tangkai Bunga

Bahan dan alat

Bahan

- Klon *Phalaenopsis* Balithi yang terseleksi.
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- Thidiazuron (TDZ= 0,5-1,5 mg/l), N6-benzyladenine (BA= 0,25 mg/l) (Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)
- 0,05% dan 0,01% HgCl₂ (Merck)
- Sukrosa (20 g/l) (Merck)
- Alkohol 96%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Tween 20 (Applichem-Darmstadt-Jerman)
- Sunlight (Unilever, Bekasi, Jawa Barat-Indonesia)
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- Growmore (NPK, 32:10:10, New Century Drive, Gardena, CA-USA)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/balsam/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (10 dan 25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah klon *Phalaenopsis* Balithi yang terseleksi yang tumbuh subur dan sehat, berumur 1,0-1,5 tahun. Tanaman donor ditanam dalam pot tanah/plastik (diameter 20 cm, berisi arang kayu dan potongan pakis). Tanaman donor ditempatkan dalam rumah kaca/rumah plastik dan dipelihara melalui penyiraman dan pemupukan. Pupuk cair (1-2 g/l Growmore: 32N:10P:10K) diaplikasikan setiap 2 hari sekali dengan cara disemprotkan. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin untuk mengurangi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Tangkai bunga dengan kuncup bunga yang belum mekar hingga 1 kuncup bunga yang mekar merupakan kondisi tangkai bunga yang sesuai untuk teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* model ke-2. Tangkai tersebut kemudian dipanen dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tangkai bunga dipanen dari tanaman donor dengan cara memotongnya pada bagian bawah (2-3 cm dari bagian pangkal tangkai). Tangkai bunga selanjutnya di usap merata beberapa kali dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol 96%. Setelah itu eksplan dipotong menggunakan pisau kultur dengan panjang 1,5-2,0 cm di bawah dan di bagian atas ruas tunas. Ruas tangkai bunga yang digunakan adalah tangkai bunga dengan kuncup bunga yang jumlahnya berkisar 8-15 ruas. Eksplan selanjutnya diletakkan di bawah air mengalir selama \pm 1 jam, direndam dalam larutan detergen 1% selama 30 menit, 1% larutan pestisida (50% benomyl dan 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit sambil digojok, kemudian dibilas beberapa kali dengan air hingga bersih.

Tangkai bunga dengan kuncup bunga selanjutnya disterilisasi menggunakan 0,05% $HgCl_2$ yang telah ditambah beberapa tetes Tween 20 selama 10 menit sambil digojok. Bilas eksplan dengan air steril hingga bersih (5-6x, @ 3 menit). Setelah itu pembuangan seludang ruas yang menutupi pangkal tangkai kuncup bunga dan pemotongan pangkal kuncup bunga rata dengan permukaan tangkai bunga dilakukan menggunakan pisau kultur. Eksplan kemudian direndam dalam

larutan 0,01 % HgCl_2 yang telah ditambah dengan beberapa tetes Tween 20 selama 2-3 menit sambil digojok, bilas dengan air destilasi steril 5-6x (@ 3 menit). Eksplan selanjutnya ditiriskan dalam petri steril yang berisi tisu steril.

Inisiasi embrio

Inisiasi embrio dilakukan dengan menanam nodus pada posisi horizontal dengan posisi bagian pangkal kuncup bunga yang dilukai berada di bagian atas pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan 1,5 mg/l TDZ, 0,25 mg/l BA, 20 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite. Kultur kemudian diinkubasi dalam kondisi gelap selama 1,0-1,5 bulan, kemudian eksplan dipindahkan di bawah kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ selama 1,0-1,5 bulan. Bakal embrio umumnya mulai terinisiasi disekitar daerah pangkal kuncup bunga yang dilukai 12-17 hari setelah kultur. Inisiasi bakal embrio terus bertumbuh dan berkembang menjadi bakal embrio yang mudah diamati 1,0-1,4 bulan setelah kultur. Variasi jumlah embrio dari 3-18 embrio dengan kualitas yang juga berbeda (Gambar 15)

Perbanyakkan tunas embrio

Perbanyakkan embrio dilakukan dengan cara kultur embrio tunggal pada medium yang sama. Embrio hasil kegiatan inisiasi diletakkan pada cawan petri steril di bawah mikroskop stereo. Dengan penambahan cahaya dan menggunakan pisau kultur dan pinset dilakukan isolasi embrio dengan cara memisahkan satu dengan yang lain secara hati-hati. Embrio kemudian dikultur pada medium $\frac{1}{2}$ MS dengan Fe dan vitamin penuh yang ditambah 0,5-0,75 mg/l TDZ, 0,25 mg/l BA, 20 g/l sukrosa dan 2 g/l gelrite. Kultur embrio tunggal diinkubasi pada kondisi gelap 1,0-1,5 bulan, kemudian dipindahkan dalam kondisi terang selama 1,0-1,5 bulan. Bakal embrio mulai terbentuk pada bagian tengah embrio dengan terlihatnya tonjolan-tonjolan diseluruh permukaan 17-25 hari. Bakal embrio makin jelas terlihat 1,0-1,5 bulan setelah kultur. Embrio berukuran makin bertumbuh dan berkembang dan embrio yang siap disubkultur pada tahap berikutnya mudah jelas terlihat diakhir masa inkubasi. Jika

tidak segera dilakukan pemisahan embrio dan subkultur pada medium yang baru, embrio akan segera berkecambah. Pada tahap ini jumlah embrio sekunder yang dihasilkan berkisar antara 5-16 embrio. Subkultur embrio untuk tujuan produksi embrio sekunder dapat dilakukan hingga subkultur yang ke-4, setelah itu produksi embrio sekunder menurun jumlah, kualitas dan mudah berkecambah.

Perkecambahan embrio dan penyiapan plantlets

Perkecambahan embrio dilakukan dengan menanam embrio dalam kondisi tunggal atau berkelompok pada medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh tanpa hormon pada kondisi terang selama 2,0-3,0 bulan. Pada tahap ini perkecambahan embrio mulai terjadi 12-18 hari setelah kultur yang terlihat dengan pecahnya koleoptilar dan membentuk bakal daun. Bakal daun pertama mulai terlihat 17-26 hari setelah kultur. Tunas dengan 2-3 daun dan 1-3 akar dapat diamati pada akhir masa inkubasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 1-3 akar dari dalam botol kultur menggunakan pinset. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar yang menempel dengan cara mencuci akar di bawah air mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan di atas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam bak/pot plastik yang berisi potongan pakis yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Pot plastik dengan plantlet kemudian ditempatkan pada tempat yang teduh (penutupan pot plastik dengan plastik transparan dapat dilakukan pada 5-7 hari diawal aklimatisasi jika diperlukan). Dua hingga tiga bulan setelah aklimatisasi pengepotan tanaman tunggal dapat dilakukan. Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 80-100%.

Efisiensi dan aplikasi

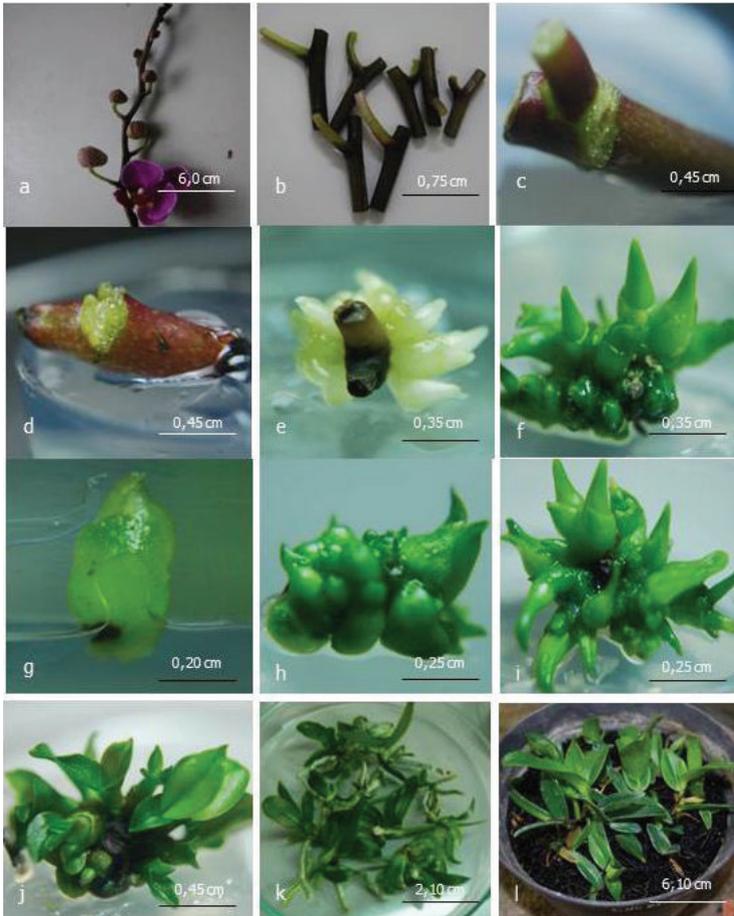
Teknologi perbanyakkan *Phalaenopsis* melalui inisiasi dan proliferasi

embrio somatik-2 menggunakan nodus sebagai sumber eksplan telah berhasil dikembangkan. Pengembangan teknologi ini membutuhkan waktu \pm 1,8 tahun. Titik kritis teknologi ini terletak pada tahap inisiasi. Keberhasilan teknologi ini sangat dipengaruhi oleh (1) respon genetik varietas atau klon yang digunakan, (2) kualitas komponen media yang digunakan dan (3) inisiasi embrio. Pada banyak kasus yang ditemukan dilapangan, substitusi beberapa komponen medium dapat menyebabkan penurunan dan bahkan kegagalan aplikasi teknologi ini. Keberhasilan teknologi ini dapat ditingkatkan dengan melakukan subkultur berulang eksplan (pada setiap tahapan) pada medium yang sama setiap 15 hari sekali. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 2-18 embrio. Jika rata-rata embrio berkualitas yang dihasilkan adalah 6 embrio tiap subkultur, 4 kali subkultur dapat dilakukan, maka total embrio yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 1200 embrio dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan perkecambahan dan penyiapan plantlets adalah 10%, maka 1080 plantlets akan dihasilkan setelah 13,5 bulan; kemudian persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10% juga, maka 972 tanaman dari 1 eksplan akan dihasilkan setelah 16,5 bulan. Teknologi ini berhasil diaplikasikan pada berbagai varietas dan klon terseleksi *Phalaenopsis* Balithi. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, khususnya konsentrasi hormon (dinaikkan atau diturunkan) kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakkan benih berkualitas *Phalaenopsis*. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakkan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Chin, C.L., 1987, 'Histological observation on in vitro formation of protocorm like bodies from flower stalk internodes of *Phalaenopsis*', *Lindleyana*, vol. 2, no. 1, pp. 58-65.
2. Park, S.Y., Murthy, H.N., Paek, K.Y., 2002, 'Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves', *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, vol. 38, pp. 168-172.

3. Roxana, D., Bala, M., 2012, 'Preliminary results on influence of growth hormones on the in vitro regeneration of *Phalaenopsis* flower stalks', *J. Hort. For. Biotech.*, vol. 16, no. 4, pp. 24-27.
4. Tokuhara, K., Mii, M., 1993, 'Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds', *Plant Cell Rep.*, vol. 13, pp. 7-11.
5. Tokuhara, K., Mii, M., 2001, 'Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae)', *In Vitro Cell, Dev. Biol.-Plant*, vol. 37, pp. 457-461.
6. Winarto, B., Shintiavira, H., Wegadara, M., 2012, 'Optimasi media-sumber karbon, posisi-ukuran eksplan, dan media proliferasi yang optimal untuk perbanyakkan *Phalaenopsis* Balithi secara meriklon dan perbanyakkan klon-klon terpilih', Laporan Hasil Penelitian, Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln. Raya Ciherang, Pacet-Cianjur 43253, Jawa Barat, Indonesia, 30 hal.
7. Winarto, B., Rianawati, S., Shintiavira, H., 2013, 'Optimasi kultur meristem dan aplikasi 'Thin Cell Layer (TCL)' untuk perbanyakkan masa *Phalaenopsis* Balithi', Laporan Hasil Penelitian, Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln. Raya Ciherang, Pacety-Cianjur, 43253, Jawa Barat, Indonesia, 21 hal.



Gambar 14. Teknologi perbanyakan *Phalaenopsis* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi embrio somatik, a. Tangkai bunga dengan satu kuncup bunga yang mekar, Nodus eksplan dengan kuncup bunga yang digunakan sebagai sumber eksplan, c. Nodus eksplan dengan inisiasi bakal embrio 13 hari setelah kultur, d. Bakal embrio makin terlihat pada 20 hari setelah kultur, e. Nodus dengan embrio 1,5 bulan setelah kultur, f. Embrio dewasa yang siap untuk perbanyakan, g. Embrio tunggal hasil isolasi pada awal disubkultur, h. Bakal embrio sekunder \pm 1,6 bulan setelah subkultur, i. Embrio sekunder dewasa yang siap disubkultur untuk tahap perbanyakan berikutnya, j. Perkecambahan embrio 1,6 bulan setelah kultur, k. Plantlets dengan 1-3 akar yang siap diaklimatisasi, l. Plantlets hasil aklimatisasi 2 bulan setelah aklimatisasi.

15. Teknologi perbanyakan *Philodendron* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler.

Pendahuluan

Philodendron adalah tanaman hias daun bernilai ekonomi tinggi yang digunakan baik sebagai daun potong maupun tanaman pot (Phartasaraty dan Phartasaraty, 1999). Nilai jual *Philodendron* ‘Black Cardinal’ yang tingginya 10 cm berkisar antara 15.000,00 - 75.000,00 per tanaman. *Philodendron* ‘Williamsii’ bernilai Rp. 130.000,00 - 150.000,00, ‘Sonora’, ‘Angela’, ‘Soledat’, ‘Orange Delight’, dan ‘Red Congo’ bernilai Rp.300.000,00 - 600.000,00. Sedangkan jenis *Philodendron* Eceng berharga sekitar Rp. 2.000.000,00 (Herlina 2005 komunikasi pribadi).

Philodendron diperbanyak secara konvensional melalui stek batang, perundukan, pemisahan anakan dan biji (Henley *et al.*, 2005). Cara konvensional tersebut berlangsung lambat, memerlukan waktu dan tenaga yang banyak dengan hasil yang tidak maksimal; sementara perbanyakan dengan biji menghasilkan benih dengan kualitas yang rendah. Oleh karena itu teknologi perbanyakan masa secara *in vitro* yang mampu menghasilkan benih berkualitas dalam jumlah yang banyak, sehat dan seragam sangat diperlukan.

Teknologi perbanyakan *Philodendron* secara *in vitro* yang sudah dipublikasikan dan dilaporkan masih sangat terbatas jumlahnya. Jämbor-Benczür dan Märta-Riffer (1990) berhasil mengembangkan teknologi perbanyakan *P. tuxtlanum* menggunakan tunas lateral dan medium $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah 20 mg/l BA untuk induksi tunas; 8 mg/l BA untuk pertumbuhan tunas dan 2 g/l arang aktif dan 0,5 mg/l NAA. Tunas pucuk yang dikultur pada medium MS yang ditambah 1,0-3,0 mg/l BA; 0,5-2,0 mg/l IBA untuk pengakaran berhasil diaplikasikan pada *P. cannifolium* (Han dan Park, 2008), Nodus batang dan medium MS yang ditambah dengan 1 mg/l Kin dan 1 mg/l BA; dan 0,1 mg/l IBA untuk pengakaran (Chen *et al.*, 2012). Sedangkan teknologi perbanyakan masa *Philodendron* ‘Moon Light’ belum pernah dilaporkan dan dipublikasikan.

Metode perbanyakan *Philodendron* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan (Winarto *et al.*, 2007). Teknologi ini telah diterbitkan pada jurnal yang terakreditasi. Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas adventif, (4) perbanyakan tunas adventif, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (gambar 15)

Teknologi perbanyakan *Philodendron* ‘Moon Light’ secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif

Bahan dan alat

Bahan

- *Philodendron* ‘Moon Light’
- Medium Murashige dan Skoog (1962) (Merck dan Sigma)
- N6-benzyladenine (BA= 0,2 mg/l) dan α -naphthalene acetic acid (NAA= 0,01 mg/l) (Sigma)
- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)
- Sukrosa (15 g/l) (Merck)
- Glukosa ((Merck)
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/jam
- Pinset (25 cm)
- Scalpel

- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Bak plastik (20 × 10 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan penyiapan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *Philodendron* ‘Moon Light’ hasil kultur *in vitro* yang berumur 8 bulan dalam botol jam. Tunas dengan 2-3 daun adalah sumber eksplan yang digunakan sebagai sumber eksplan. Tunas pucuk diisolasi dengan cara membuang beberapa daun yang melekat secara hati-hati menggunakan pisau kultur. Setelah daun terakhir, tunas dipotong dengan ukuran panjang ± 3-4 mm. Tunas pucuk siap dikultur pada medium inisiasi.

Inisiasi tunas aksiler

Inisiasi tunas aksiler dilakukan dengan cara menanam tunas pucuk pada medium MS yang ditambah dengan 0,2 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA, 15 g/l sukrosa, 15 g/l glukosa dan 1,8 gelrite. Kultur tunas pucuk diinkubasi pada kondisi terang 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas ~ 13 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ selama ± 1,5 bulan. Tunas pucuk mulai tumbuh 3-5 hari setelah kultur. Tunas terus tumbuh dan berkembang seiring dengan masa inkubasi. Jumlah tunas yang teregenerasi makin bertambah dari 1 menjadi 2, 3, 5, 7 tunas dengan 1-3 daun.

Perbanyak tunas aksiler

Perbanyak tunas aksiler dilakukan dengan cara memindahkan tunas aksiler hasil inisiasi secara tunggal pada medium dan kondisi inkubasi yang sama selama 1,5 bulan. Subkultur tunas aksiler dapat dilakukan berulang setiap 1,5 bulan sekali hingga subkultur yang ke-5. Tunas yang dihasilkan berkisar antara 3-8 tunas.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 daun ke medium, kondisi dan waktu inkubasi yang sama. Akar umumnya mulai terbentuk 8-11 hari setelah kultur. Jumlah akar yang terbentuk per tunas berkisar antara 2-6 akar dengan panjang yang bervariasi setelah 1,5 bulan masa inkubasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-3 daun dan 2-6 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa agar yang melekat dengan cara mencuci akar di bawah air yang mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan di atas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam bak-bak plastik yang berisi arang sekam yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup bak plastik dengan plastik transparan, letakkan di tempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Setelah 1,5-2,0 bulan masa aklimatisasi, tanaman dapat dipindah dalam polybag (diameter 10 cm) arang sekam, sekam dan humus bambu/pupuk organik (1:1:1, v/v/v). Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 90-100%.

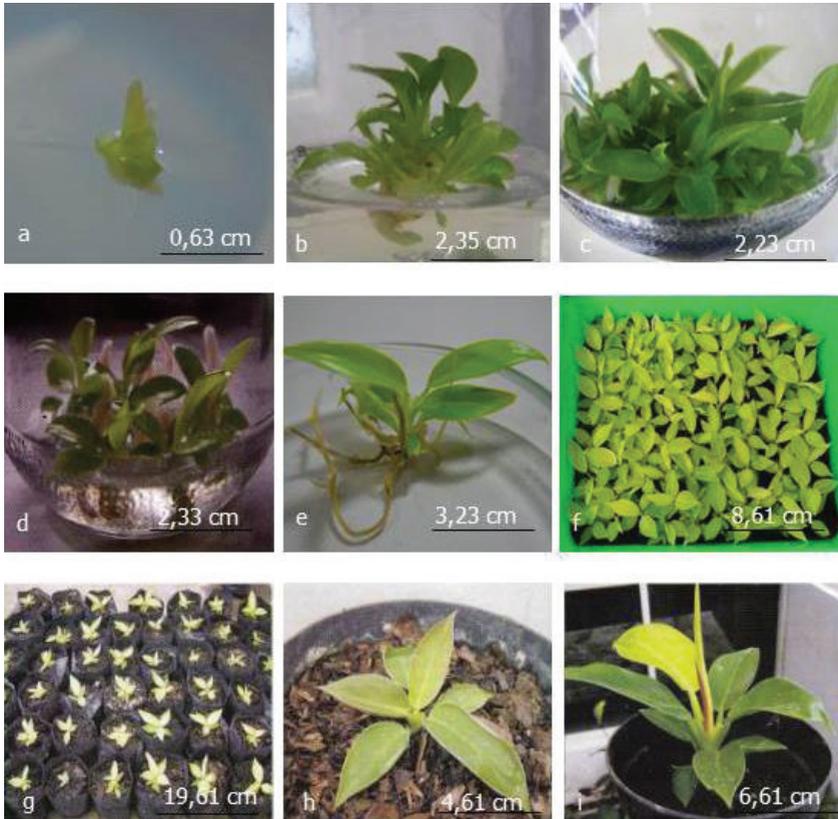
Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakan *Philodendron* 'Moon Light' secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler telah berhasil dikembangkan selama \pm 1.3 tahun. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 3-8 tunas. Jika rata-rata tunas yang dihasilkan adalah 6 tunas tiap subkultur, 5 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan pada subkultur terakhir \pm 7.500 tunas dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 6.750 plantlets akan dihasilkan setelah 9,5 bulan. Teknologi ini dapat diaplikasikan pada

varietas yang lain. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon varietas yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, regenerasi dan proliferasi, khususnya konsentrasi hormon (dinaikkan atau diturunkan) dan penggunaan arang aktif kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih berkualitas *Philodendron*.

Daftar Pustaka

1. Chen, F.C., Wang, C.Y., Fang, J.Y., 2012, 'Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration, *Sci. Hort.*, vol. 141, pp 23-29.
2. Han, B.H., Park, B.M., 2008, 'In vitro propagation of *Philodendron cannifolium*, ' *J. Plant Biotechnol.* Vol. 35, no. 3, pp. 203-208.
3. Jambor-Benczur, E., Marta-Riffer, A., 1990, 'In vitro propagation of *Philodendron tuxtlanum* Bunting with benzylaminopurine', *Acta Agronomica Hungarica.*, vol. 39, no. 3-4, pp.341-348.
4. Parthasarathy, V.A., Parthasarathy, U., 1999, 'House plants', In: Parthasarathy, V.A., Bose, T.K., Das, P., (Eds.), *Biotechnology in Horticultural Crops*, Naya Prokash, India., vol.1.3, pp. 289-314.
5. Winarto, B., rianawati, S., Herlina, D., 2007, 'Pengaruh media regenerasi terhadap pembentukan tunas aksiler dan adventif pada *Philodendron* 'Moon Light'', *J. Hort.*, vol. 17, no. 1, pp.8-16..



Gambar 15. Teknologi perbanyakan masa *Philodendron* ‘Moon Light’ secara in vitro melalui inisiasi dan proliferasi tunas aksiler, a. Tunas pucuk 10 hari setelah kultur, b. Tunas pucuk yang beregenerasi dan membentuk tunas aksiler 1,5 bulan setelah kultur pada medium MS yang ditambah dengan 0,2 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA, 15 g/l sukrosa, 15 g/l glukosa dan 1,8 gelrite, c. Tunas aksiler hasil perbanyakan pada subkultur ke 2, 1,5 bulan setelah subkultur pada medium yang sama, d. Tunas aksiler tunggal hasil subkultur ke-5 yang berhasil diakarkan (2-6 akar) pada medium perbanyakan, e. Plantlet yang siap diaklimatisasi, f. Plantlet hasil aklimatisasi 1,5 bulan setelah aklimatisasi, g. Plantlets hasil pengepotan ulang, h. Kondisi plantlet hasil pengepotan ulang 1,5 bulan setelah pengepotan, i. Tanaman hasil aklimatisasi 4 bulan setelah repotting.

16. Teknologi perbanyakkan *Ruscus hypophyllum* L. secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif

Pendahuluan

Ruscus hypophyllum L. (Famili: Liliaceae) adalah tanaman hias daun semi berkayu, penutup tanah selalu hijau, berasal dari Afrika utara yang dapat digunakan sebagai tanaman taman, dalam ruang (indoor) dan daun potong (Stamps, 2001). Tanaman ini memiliki pembengkakan batang yang mirip daun (cladodes) sementara daun berubah menjadi organ mirip duri yang terletak di bagian apex cladodes. Sebagai daun potong, tanaman ini unik, memiliki nilai estetika dan masa simpan yang panjang lebih dari satu bulan (Stamps dan Boone, 1992, Purwito *et al.*, 2005). Di Indonesia, *R. hypophyllum* banyak dibudidayakan di daerah Pasir Sarongge dan Cipanas, Cianjur; Cisarua-Bogor; dan Cihideung-Bandung di Jawa Barat. Di Bandung, khususnya di daerah Cihideung, petani mampu memproduksi lebih dari 500 ikat per minggu dan dijual dengan harga Rp. 8.000,00 – Rp. 10.000,00 per ikat.

Secara konvensional, *R. hypophyllum* diperbanyak menggunakan biji, stek dan pemisahan rhizome (Stamps, 2001). Perbanyakkan menggunakan biji menghasilkan benih yang bervariasi, sementara stek dan pemisahan rhizome meskipun menghasilkan benih yang identik dengan induknya, namun jumlah benih yang dihasilkan tidak mampu mendukung pengembangan tanaman secara komersial. Keterbatasan benih yang berkualitas, ternyata juga dihadapi oleh petani ruscus di Indonesia. Oleh karena itu perbanyakkan tanaman menggunakan kultur jaringan dapat menjadi salah satu alternatif terbaik dalam menyediakan benih berkualitas secara berkesinambungan baik dalam kuantitas maupun kualitas (Abou-Dahab *et al.*, 2005).

Teknologi perbanyakkan masa *Ruscus* secara *in vitro* belum banyak dilaporkan dan/atau dipublikasikan. Ziv (1983) menggunakan tunas pucuk dan infloresen yang dikultur pada medium Linsmaier dan Skoog cair yang mengandung 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) dan BA untuk pre-kultur. Eksplan kemudian disubkultur setiap 25 hari sekali pada medium yang sama dengan rasio cytokinin:auksin (5:1)

untuk perkembangan tunas. Regenerasi tunas dari embryo yang masak berhasil dikembangkan pada medium MS yang ditambah dengan 2 mg/l NAA (Ivanova *et al.*, 2008). Sembilan tunas dari tunas pucuk berhasil diregenerasi pada medium MS yang ditambah dengan 1-2 mg/l BAP dan 0,2 mg/l NAA setelah 8 minggu setelah kultur (Purwito *et al.*, 2005). Tunas kemudian diiakarkan pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang mengandung 1,5 mg/l IBA dan diaklimatisasi pada campuran tanah dan arang sekam (1:1, v/v). Medium MS yang ditambah 0,05 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l BAP juga sesuai untuk inisiasi dan proliferasi tunas (Jha dan Sen, 1985). Pada jenis ruscus yang lain, teknologi perbanyakkan dilaporkan pada *R. hypoglossum* (Tarek dan Abou-Dahab, 2004; Abou-Dahab *et al.*, 2005; Ivanova, 2012, Ivanova *et al.*, 2013) dan *R. aculeatus* (Moyano *et al.*, 2006). Oleh karena itu teknologi perbanyakkan *R. hypophyllum* yang berhasil dikembangkan di Balithi semakin memperkaya pengetahuan tentang perbanyakkan masa ruscus yang ada.

Teknologi perbanyakkan *R. hypophyllum* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan (Winarto dan Setyawati, 2014). Teknologi ini telah dipublikasikan di jurnal internasional yang kredibel. Teknologi ini terdiri atas (1) tanaman donor dan pemanenan eksplan, (2) sterilisasi eksplan, (3) inisiasi tunas adventif, (4) perbanyakkan tunas adventif, (5) penyiapan plantlets dan (5) aklimatisasi plantlets (Gambar 16)

Teknologi perbanyakkan *R. hypophyllum* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif.

Bahan dan alat

Bahan

- *R. hypophyllum*.
- Medium Winarto-Teixeira (WT), Murashige dan Skoog (MS) (Sigma dan Sigma)
- N6-benzyladenine (BA= 0,25-0,5 mg/l), Kinetin (Kin= 0,5 mg/l) dan indole-3-acetic acid (IAA= 0,05-0,5 mg/l) (Sigma)
- Air kelapa

- Agar Swallow (7 g/l), gelrite (2 g/l) (Duchefa)
- 1% dan 2% (5,25% NaOCl)
- Sukrosa (20 g/l)
- Alkohol 80%
- Air destilasi steril
- Tisu steril
- Fungisida (bahan aktif 50% benomil)
- Bakterisida (bahan aktif 20% kanamycin sulfat)
- Media pot (arang sekam, sekam, humus bambu atau pupuk organik)
- NPK (20:15:15)

Alat

- Laminar air flow cabinet
- Botol chicken brand/balsam/jam
- Botol sterilisasi (Botol anggrek/Erlenmeyer 1000/2000 ml)
- Pinset (25 cm)
- Scalpel
- Pisau kultur
- Cawan petri (diameter 9 atau 15 cm)
- Polibag/pot plastik (diameter 30 cm)

Tanaman donor dan pemanenan eksplan

Tanaman donor yang digunakan adalah *R. hypophyllum* yang tumbuh subur dan sehat, berumur 0,6-1,0 tahun. Tanaman donor ditanam dalam bedengan yang berisi campuran arang sekam, sekam, dan humus bambu/bahan organik (1:1:1, v/v/v) dibawah screen house. Tanaman dipelihara melalui penyiraman (2 kali seminggu) dan pemupukan (15 g/tanaman, NPK, 20:15:15) setiap bulan sekali. Aplikasi pestisida untuk tujuan pengendalian hama dan penyakit diupayakan seminimal mungkin

untuk mengurangi potensi munculnya kontaminan, baik bakteri maupun jamur. Tunas muda dengan 5-6 cladodes dipanen dari tanaman induk dan digunakan sebagai donor eksplan.

Sterilisasi dan penyiapan eksplan

Tunas muda dengan 5-6 nodus yang telah dipanen dipotong pada tiap nodusnya dan menjadi sumber eksplan. Potongan nodus selanjutnya dicuci di bawah air mengalir selama 30 menit. Eksplan selanjutnya direndam dalam 1% larutan pestisida (50% benomyl dan 20% kanamycin sulfat) selama 30 menit sambil digojok, kemudian dibilas beberapa kali dengan air hingga bersih. Eksplan kemudian dibawa ke dalam laminar air flow cabinet dan disterilisasi dengan 1% NaOCl selama 10 menit, 2% NaOCl selama 5 menit, 80% alkohol selama 30 detik dan terakhir dibilas dengan air destilata steril 5-6x (@ 3-5 menit). Eksplan selanjutnya ditiriskan dalam cawan Petri steril yang berisi tisu steril.

Setelah sterilisasi, eksplan diambil dan diletakkan diatas cawan Petri steril. Bagian eksplan yang rusak akibat sterilisasi dipotong dan dibuang menggunakan pisau kultur. Pada bagian pangkal cladode dipotong mendatar hingga terlihat hampir rata dengan permukaan batang. Nodus kemudian ditanam dalam medium inisiasi.

Inisiasi tunas adventif

Inisiasi tunas adventif dilakukan dengan cara menanam nodus sebagai sumber eksplan pada medium $\frac{1}{4}$ MS yang ditambah dengan 200 ml/l air kelapa, 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l IAA, 20 g/l sukrosa dan 1,8 g/l gelrite. Kultur nodus kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 2,0 bulan. Kalus umumnya akan terbentuk pada semua bagian eksplan yang mengalami pelukaan, terutama pada bagian pangkal cladode 15-20 hari setelah kultur. Ukuran kalus terus bertumbuh dan berkembang dan membentuk kalus dengan ukuran 0,4 cm mudah diamati 35 hari setelah kultur. Setelah 2 bulan, jumlah bakal tunas adventif yang dihasilkan berkisar antara 10-17 bakal tunas.

Regenerasi dan Perbanyak tunas adventif

Regenerasi tunas adventif dilakukan dengan cara memindahkan dan memecah ukuran kalus dengan bakal tunas (jika ukuran kalus besar lebih dari 0,5 cm) dan menanamnya pada medium $\frac{3}{4}$ WT medium yang mengandung 0,25 mg/l BA, 0,5 mg/l Kin, 0,05 mg/l IAA, 1 g/l arang aktif, 20 g/l sukrosa dan 1,8 g/l gelrite. Kultur selanjutnya diinkubasi pada kondisi terang dengan 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, pada suhu $23,5 \pm 1,1^\circ\text{C}$ dan kelembaban relative $60,6 \pm 3,8 \%$ selama 2 bulan. Pada tahap regenerasi dapat dihasilkan 8-9 tunas per kalus yang disubkultur. Sedangkan perbanyak tunas adventif dilakukan dengan cara yang sama dengan tahap regenerasi dan menanam kalus dengan tunas pada medium $\frac{1}{2}$ MS dengan vitamin penuh pada kondisi inkubasi yang sama. Pada tahap ini jumlah tunas baru yang dihasilkan dapat mencapai 9 tunas. Perbanyak tunas ini dapat dilakukan hingga subkultur yang ke-6. Subkultur kalus dengan tunas dapat dilakukan berulang setiap 2 bulan sekali hingga 5-6 kali. Subkultur disarankan untuk dihentikan saat tunas sudah mencapai 6 kali.

Penyiapan plantlets

Penyiapan plantlets dilakukan dengan memilih dan menanam tunas yang tumbuh sehat dan vigor dengan 2-3 cladodes pada medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh tanpa hormon dengan 20 g/l sukrosa dan 7 g/l agar Swallow. Kultur tunas kemudian disimpan pada kondisi inkubasi yang sama dengan tahap sebelumnya. Akar umumnya mulai terbentuk 10-15 hari setelah kultur. Jumlah akar yang terbentuk per tunas berkisar antara 2-4 akar dengan panjang yang bervariasi setelah 2 bulan masa inkubasi.

Aklimatisasi plantlets

Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan mengeluarkan plantlet yang sehat dan tumbuh vigor dengan 2-4 cladodes dan 2-4 akar diambil dan dikeluarkan dari dalam botol kultur. Akar plantlets selanjutnya dibersihkan

dari sisa-sisa dengan cara mencuci akar di bawah air yang mengalir. Akar plantlets yang telah bersih direndam dalam 1% larutan pestisida (1% fungisida dan 1% bakterisida) selama 3 menit, kemudian ditiriskan di atas kertas koran atau tisu. Plantlets kemudian ditanam dalam pot-pot plastik yang berisi arang sekam yang telah dibasahi dan cukup dengan air. Tutup pot plastik dengan plastik transparan, letakkan ditempat yang agak teduh di rumah kaca/plastik selama 7-10 hari. Buka plastik dan biarkan tanaman tetap pada tempat teduh. Setelah 1,5-2,0 bulan masa aklimatisasi, tanaman dapat dipindah dalam polybag (diameter 10 cm) yang berisi media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1, v/v) atau arang sekam, sekam dan humus bambu/pupuk organik (1:1:1, v/v/v). Satu bulan setelah pengepotan tanaman tunggal, tanaman siap digunakan oleh petani/pengguna. Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 90-100%.

Efisiensi dan aplikasi

Teknologi perbanyakan *R. hypophyllum* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif telah berhasil dikembangkan. Pengembangan teknologi ini memerlukan waktu 1.8 tahun. Titik kritis teknologi terdapat pada tahap inisiasi. Potensi produksi benih dari 1 eksplan responsif akan menghasilkan 5-12 tunas. Jika rata-rata tunas yang dihasilkan adalah 8 tunas tiap subkultur, 5 kali subkultur dapat dilakukan, maka total tunas yang dihasilkan pada subkultur terakhir ± 32.000 tunas dari satu eksplan. Jika persentase kegagalan aklimatisasi adalah 10%, maka 28.800 plantlets akan dihasilkan setelah 15 bulan. Teknologi ini dapat diaplikasikan pada *Ruscus* jenis yang lain. Potensi produksi benih yang dihasilkan dapat lebih tinggi atau lebih rendah tergantung dari respon *Ruscus* jenis lain yang digunakan sebagai tanaman donor. Modifikasi komposisi medium inisiasi, khususnya konsentrasi hormone (dinaikkan atau diturunkan) kadang diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi ini dalam perbanyakan benih berkualitas *Ruscus* jenis yang lain. Seleksi benih pada tiap tahap perbanyakan secara *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keseragaman benih yang dihasilkan.

Daftar Pustaka

1. Abou-Dahab, A.M., Habib, A.M.A., Hosni, Y.A., Gabr, A.M.M., 2005, 'Effect of some sterilization treatments and growth regulator on *Ruscus hypoglossum* L.', *Arab J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 1, pp. 127-140.
2. Jha, S., Sen, S., 1985, '*In vitro* regeneration of *Ruscus hypophyllum* L. plants', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 5, pp. 79-87.
3. Ivanova, T., Gussev, C., Bosseva, Y., Stanilova, M., Stoeva, T., 2008, '*In vitro* regeneration of *Ruscus aculeatus* L. - Effective micropropagation by shoot cultures', *Prop. Ornamental Plants*, vol. 8, no. 1, pp. 39-41
4. Ivanova, T., Gussev, C., Bosseva, Y., Stoeva, T., 2011, '*In vitro* conservation of micro-propagated *Ruscus aculeatus* L. (*Liliaceae*) plants', *Botanica Serbica*, vol. 35, no. 1, pp. 61-66.
5. Ivanova, T., 2012, '*In vitro* cultivation of *Ruscus aculeatus* L. and *Ruscus hypoglossum* L. (*Liliaceae*)', PhD Thesis, Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences; 23 Acad. G. Bonchev Str., Sofia 1000, Bulgaria.
6. Ivanova, T., Dimitrova, D., Angelov, D., Gussev, C., Bosseva, Y., Stoeva, T., 2013, 'Callus cultures and indirect regeneration of *Ruscus hypoglossum* *in vitro*'. *Bul. J. Agric. Sci.*, vol. 19, no. 2, pp. 49-51.
7. Moyano, E., Montero, M., Bonfill, M., Cusidó, R.M., Palazón, J., Piñol, M.T., 2006, '*In vitro* micropropagation of *Ruscus aculeatus*.' *Biol. Plant.*, vol. 50, no. 3, pp. 441-443.
8. Purwito, A., Muklisa, P., Maharijaya, A., 2005, '*In vitro* propagation of *Ruscus* (*Ruscus hypophyllum* L.)', *Bull. Agron.*, vol. 32, no. 2, pp. 39-45.
9. Stamps, R.H., 2001, 'Florida/Holland/Israeli *Ruscus* production and use', Extension, University of Florida, Circular 1268 (ENH844), 5 pages
10. Stamps, R.H., Boone, C.C., 1992, 'Effects of Growing Medium, Shade Level and Fertilizer Rate on Cladode Color, Yield and Vase Life of *Ruscus hypophyllum*', *J. Environ. Hort.*, vol. 10, no. 3, pp. 150-152.
11. Tarek, Abou-Dahab, A.M., 2004, 'Effect of some natural culture media on *in vitro* shootlet proliferation of *Ruscus hypoglossum* L. and *Aspidistra elatior* Blume', *Arab J. Biotechnol.*, vol. 7, no. 2, pp. 239-250.
12. Ziv, M., 1983, 'The stimulatory effect of liquid induction medium on shoot proliferation of *Ruscus hypophyllum* L.', *Sci. Hort.*, vol. 19, no. 3-4, pp. 387-394.
13. Winarto, B., Setyawati, A.S., 2014, 'Young shoot nodes derived organogenesis *in vitro* in mass propagation of *Ruscus hypophyllum* L.', *South Western J. Hort. Biol. Environ.*, vol. 5, no. 2, pp. 63-82.



Gambar 16. Teknologi perbanyakan *R. hypophyllum* secara *in vitro* melalui inisiasi dan proliferasi tunas adventif, a. Eksplan nodus pada awal kultur, b. Kalus yang teregenerasi pada medium $\frac{1}{4}$ MS yang ditambah dengan 200 ml/l air kelapa, 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l IAA \pm 35 hari setelah kultur, c. Kalus yang teregenerasi \pm 2 bulan setelah kultur, d. Tunas yang teregenerasi pada $\frac{3}{4}$ WT medium yang ditambah 0,25 mg/l BA, 0,5 mg/l Kin, 0,05 mg/l IAA \pm 1,5 bulan setelah kultur, e. Peningkatan jumlah tunas yang dihasilkan pada medium $\frac{1}{2}$ MS dengan vitamin penuh tanpa hormon \pm 2,5 bulan setelah kultur, f. Tunas yang teregenerasi pada subkultur ke-5, \pm 2,5 bulan setelah kultur, g. Pengakaran tunas pada medium $\frac{1}{2}$ MS vitamin penuh tanpa hormon \pm 2 bulan setelah kultur, h. Plantlets yang siap untuk diaklimatisasi, i. Perendaman plantlets pada 1% larutan pestisida selama 3 menit, j-k. Plantlets yang tumbuh \pm 1 bulan setelah aklimatisasi, l. Pertumbuhan plantlets \pm 3 bulan setelah aklimatisasi.

Penutup

Dari seluruh teknologi perbanyakkan masa tanaman hias secara *in vitro* yang berhasil dikembangkan dari sebuah proses penelitian yang bertahap dari kegiatan pendahuluan, penelitian dan optimalisasinya. Satu teknologi umumnya membutuhkan waktu penelitian berkisar antara 1-5 tahun, sejak dari proses penyiapan eksplan, inisiasi, regenerasi, perbanyakkan, pengakaran hingga aklimatisasinya. Dari berbagai teknologi yang berhasil dikembangkan, secara umum terdapat beberapa hal penting dan sering menjadi titik kritis penunjang keberhasilan penelitian, yaitu: (1) penyiapan tanaman donor, (2) respon genetik tanaman, (3) kualitas dan kemurnian komponen media, (4) tahap inisiasi (kultur aseptik) dan (5) seleksi eksplan/regeneran hasil perbanyakkan pada setiap tahap kultur *in vitro* yang harus dilalui. Potensi subkultur untuk perbanyakkan benih berkualitas yang diuraikan pada setiap teknologi dihitung mulai subkultur ke-2 setelah proses inisiasi dan regenerasi tunas atau pembentukan embrio/plbs. Setiap teknologi memiliki persentase *repeatability* dan *reproducibility* yang tinggi jika semua persyaratan yang diperlukan dalam tiap teknologi dapat dipenuhi. Kegagalan aplikasi teknologi umumnya terjadi jika persyaratan yang dibutuhkan tidak terpenuhi, terutama terkait dengan kemurnian dan kualitas komponen medium yang dipersyaratkan. Modifikasi, terkait utamanya dengan komposisi dan konsentrasi hormon, kadang sangat diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan aplikasi teknologi pada varietas/klon yang berbeda.

Teknologi-teknologi yang ditulis dalam buku Seri Teknologi Perbanyakkan Tanaman Hias secara *in vitro*, murni adalah hasil dan pengalaman selama bekerja di Balai penelitian Tanaman Hias sejak 2000 hingga 2014. Teknologi-teknologi yang diuraikan dalam buku ini diharapkan dapat dimanfaatkan oleh berbagai pihak untuk berbagai tujuan terkait dengan pengembangan ilmu pengetahuan, perbanyakkan benih berkualitas dan pengembangan ketrampilan SDM. Disadari bahwa buku ini belum sempurna, oleh karena itu untuk meningkatkan kualitas dan kesempurnaan buku ini, kritik dan masukan yang bersifat konstruktif sangat dibutuhkan dari berbagai pihak yang membaca dan memanfaatkan buku ini.

Indek Tanaman

- Alpinia purpurata*, *Alpinia*; 2
Anthurium andreanum Linden ex André; *Anthurium*; v, vii, 7, 10, 11, 13, 14, 15; 16, 17; 18; 19; 22, 24, 25, 26
A. andreanum ‘Agnihothi’; 7; 13
A. andreanum ‘Amigo’; 7; 13
A. andreanum ‘Antadra’; 7
A. andreanum ‘Arizona’; 7
A. andreanum ‘Carnaval’; 13; 23, 25
A. andreanum ‘Casino’; 7, 13; 23
A. andreanum ‘Flamingo’; 7
A. andreanum ‘Laguna’; 13; 23
A. andreanum ‘Nitta’; 7
A. andreanum ‘Midori’; 13
A. andreanum ‘Safari’; 23
A. andreanum ‘Sumi’; 7
A. andreanum ‘Tropical’; vii, 7, 8, 12, 15; 17, 18, 19, 22, 24, 26, 27
A. scherzerianum; 13
Anthurium lokal; p 13, 23
Aspidistra elatior Blume;
Begonia; 58
Begonia x hiemalis; 58, 63
Begonia tuberosus; 64
Brassica napus L; 24
Capsicum annuum L; 24
Carica papaya; 58, 64
Cattleya; 41
Chlorophytum borivilianum; 64
Chrysanthemum morifolium Ramat, Krisan; v, vii, 67, 68, 69, 73
Chrysanthemum ‘Madam E Roger’; 59
C. morifolium ‘Pasopati’; vii, 68, 69, 72, 74
C. morifolium ‘Puspita Nusantara’; 72
Cyclamen persicum, *Cyclamen*; 17, 23

Cyclamen purpurascens; 23

Cymbidium; 58

Datura innoxia; *Datura*; 16, 23

D. aggregatum; 41, 47

D. candidum; 58, 65

D. densiflorum; 47

D. microbulbon; 41, 47

D. primulinum; 41, 47

D. transparens;

Dendrobium ‘Chiengmai Pink’; 41, 47

Dendrobium ‘Gradita 10’; 46

Dendrobium ‘Gradita 31’; 46, 47

Dendrobium ‘Zahra FR 62’, *Dendrobium*: vi, vii, 41, 42, 43, 46, 48

Dianthus caryophyllus L., Anyelir; v, vi, 2, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 39

D. caryophyllus ‘Brenda’; 32, 39

D. caryophyllus ‘Chabaud’; 35

D. caryophyllus ‘Eskimo Mogr’; 35

D. caryophyllus ‘Indios’; 28

D. caryophyllus ‘Innove Orange Bogr’; 35

D. caryophyllus ‘Impulse’; 28, 35

D. caryophyllus ‘Laura’; 32, 39

D. caryophyllus ‘Nelson’; 28, 35

D. caryophyllus ‘Maldives’; vi, 28, 29, 30, 32, 34, 35, 36, 38, 40

D. caryophyllus ‘Sagres’; 28, 35

D. caryophyllus ‘Sitari’; 32, 39

D. caryophyllus ‘Spirit’; 28, 35

D. caryophyllus ‘Yair’; 35

D. chinensis; 28,

Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn, Lisianthus; v, vii, 83, 84, 85, 88, 89

E. grandiflorum ‘White Lavender’; vii, 84, 85, 88, 90

Fuchsia hybrida; 58

Gerbera jamesonii Bolus, *Gerbera*; v, vii, 49, 50, 51, 54, 57, 58, 64, 65

G. jamesonii ‘Black Jack’; 55

- G. jamesonii* 'Bonnie'; 50
G. jamesonii 'Carambol'; vii, 50, 51, 54, 57, 63
G. jamesonii 'Diabolo'; 55, 63
G. jamesonii 'Nuance'; 55, 59, 60, 66
G. jamesonii 'Marleen'; 50
G. jamesonii 'Samson'; 55, 63
G. jamesonii 'Sunglow'; 50, 55
G. jamesonii 'Tobia'; 50
G. jamesonii 'Violente'; 55, 63
G. jamesonii klon 11.46; 55, 63
G. jamesonii klon 01.098; 55, 63
G. jamesonii klon 06.078; 55, 63
G. jamesonii klon 04.03; 55, 63
Gladiol: 2
Helianthus anuus L., Bunga Matahari; 17, 24
Lili : 2; 17
Matteuccia struthiopteris; 76, 81
Neprolepis exaltata Schott cv. 'Bostoniensis'; 76, 81
Oncidium; 34
Phalaenopsis; vi, vii, 41, 99, 100, 101, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 113, 114, 115
P. amabilis; 99, 105
P. amabilis var. 'Formosa Shimadzu'; 99
P. amabilis 'Golden Horizon'; 99
P. 'Hwa Feng Red Jewel'; 99
P. 'Little Steve'; 99, 106
P. 'Nebula'; 99
P. 'Snow Parade'; 99
P. Richard Shaffer 'Santa Cruz'; 99
P. Tinny Sunshine 'Annie', 'Taisuco Hatarot'; 99
P. Teipei Gold 'Golden Star'; 99
P. Tinny Galaxy 'Annie'; 99
P. 'Wedding Promenade'; 99

P. gigantea; 99, 106

Phaseolus vulgaris; 58, 63

Philodendron cannifolium; 116, 120

Philodendron ‘Angela’; 116

Philodendron ‘Black Cardinal’; 116

Philodendron Eceng; 116

Philodendron ‘Moon Light’, *Philodendron*; vi, vii, 116, 117, 118, 119, 120, 121

Philodendron ‘Orange Delight’; 116

Philodendron ‘Soledat’; 116

Philodendron ‘Sonora’; 116

Philodendron ‘Red Congo’; 116

Philodendron ‘Williamsii’; 116

P. tuxtlanum; 116, 120

Picrorhiza scrophulariiflora; 58, 63

Polypodium cambricum; 75, 80

Rosa hybrida L., Mawar; v, vii, 91, 92, 94, 96, 98

R. hybrida ‘Black Baccara’; 91, 97

R. hybrida ‘Baccara’; 91

R. hybrida ‘Kiss’; 92, 94, 96, 98

R. hybrida ‘Perfume Delight’; 91, 97

R. indica; 92, 97

R. persica; 92, 97

Rosa damascena; 58, 92, 97

R. damascena ‘Ispahan’; 92, 97

Rumohra adiantiformis (G. Forst.) Ching, Leather leaf fern; v, vii, 75, 76, 77, 80, 81, 82

Ruscus aculeatus; 123, 128

R. hypoglossum; 123, 128

R. hypophyllum L., *Ruscus*; vi, vii, 122, 123, 124, 127, 128, 129

Sedap malam; 2

Spathoglottis; 2

Spatiphyllum wallisii ; *Spatiphyllum*; 17, 23

Tapeinochilos annanasease; 2

Vanda; 41

Zingiber spektakile: 2

RIWAYAT PENULIS



Penulis dilahirkan di Grobogan, 04 Agustus 1967 anak ke-2 dari empat bersaudara pasangan suami-istri Sugiyono (Alm.) dan Sulastri. Pendidikan S1 Biologi diselesaikannya di Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana Salatiga pada 1990. Pada 1995, tepatnya 5 Agustus 1995, bergabung dengan Balai Penelitian Tanaman Hias (Dahulu Sub Balai Hortikultura Segunung) sebagai staf peneliti di laboratorium biokontrol hingga 1998. Dari 1998-2000 menjadi staf peneliti laboratorium mikologi. Pada 2000, penulis mendapat kesempatan melanjutkan studi S2 di Universiti Putra Malaysia bidang Bioteknologi Pertanian, di Departemen Sains Tanaman pada Fakultas Pertanian yang diselesaikan 2002. Pada 2006, melanjutkan studi S3 di Sekolah Pasca-Sarjana, Institute Pertanian Bogor, bidang Bioteknologi Pertanian, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, diselesaikan 2009. Sejak 2003 hingga sekarang penulis aktif dalam meneliti dan mengembangkan teknologi-teknologi perbanyakan tanaman hias secara *in vitro*.

Sebelum menulis buku Seri Teknologi Perbanyakan Tanaman Hias secara *in vitro*, penulis pernah terlibat dalam penulisan Modul Pelatihan Teknologi Krisan Berbasis Kompetensi tahun 2012 dan Modul Pelatihan Teknologi Perbenihan dan Budidaya Anggrek Berbasis Kompetensi tahun 2013 sebagai anggota tim penyunting. Menjadi ketua dewan editor penyusunan Prosiding Seminar Anggrek Nasional 2012 dan Prosiding Seminar Inovasi Florikultura 2013. Penulis juga terlibat sebagai co-author pada penulisan bagian buku bersama dengan Jaime. A. Teixeira da Silva, Ph.D dengan judul: 'Somatic embryogenesis in two orchid genera (*Cymbidium*, *Dendrobium*)' yang akan diterbitkan oleh Springer Science + Business Media, B.V, The Netherland pada akhir 2014.

PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN HORTIKULTURA

Jln. Raya Ragunan 29A Pasar Minggu-Jakarta Selatan 12540 Indonesia

Telp: +62(21)7805768, 7892205 Fax: +62(21) 7805135, 7892205

E-mail: puslitbanghorti@litbang.deptan.go.id, pushorti@yahoo.com

Website:<http://hortikultura.litbang.deptan.go.id>