

# Aplikasi Modifikasi Media Generik Dalam Produksi Bibit Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) Berkualitas Melalui Kultur *In Vitro*

## [Application of Modified Generic Media on *In Vitro* Culture Production of Qualified *Chrysanthemum* Seeds (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)]

Shintiavira, H, Rahmawati, I, dan Winarto, B

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

E-mail: virgro@yahoo.co.id

Naskah diterima tanggal 14 April 2014 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 23 Juni 2014

**ABSTRAK.** Aplikasi media generik yang lebih murah menggantikan media Murashige dan Skoog (MS) yang mahal dan tetap mampu menghasilkan bibit krisan berkualitas secara masal memiliki pengaruh yang besar terhadap efisiensi produksi benih secara *in vitro*. Tujuan penelitian adalah mendapatkan media generik yang optimal untuk produksi benih berkualitas pada beberapa varietas krisan secara *in vitro*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kebun Percobaan Balai Penelitian Tanaman Hias Cipanas pada bulan Januari sampai dengan Desember 2011. Perlakuan varietas dan media disusun menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial dengan tiga ulangan. Faktor pertama varietas krisan yaitu Ratnahapsari, Kusumapatria, Cintamani, Sasikirana, dan Kusumaswasti. Faktor kedua adalah modifikasi media generik yaitu (1) ½ MS + 0,1 mg/l IAA sebagai kontrol, (2) 3 g/l Hyponex (20N:20K:20P) + vitamin MS + 0,1 mg/l IAA, (3) 3 g/l Hyponex (20N:20K:20P) dengan 50% air kelapa, (4) 3 g/l Hyponex (20N:20K:20P) + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA, (5) 2 g/l Gandasil D + vitamin MS + 0,1 mg/l IAA, (6) 2 g/l Gandasil D dengan 50% air kelapa, (7) 2 g/l Gandasil D + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA, dan (8) ½ MS dengan bahan teknis + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Ratnahapsari merupakan varietas yang paling responsif dalam kultur *in vitro* dan memiliki tinggi tunas hingga 7,2 cm dengan 7,5 jumlah daun per tunas, 4,0 akar per tunas dan 4,6 cm panjang akar, sementara 3 g/l Hyponex + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA (M63) merupakan media generik yang paling sesuai untuk menggantikan media MS yang menghasilkan planlet dengan tinggi tunas hingga 7,0 cm, 8,8 jumlah daun per tunas, 3,5 akar per tunas, dan 6,9 cm panjang akar dengan efisiensi biaya sebesar 52,38%. Pada tahap aklimatisasi Sasikirana memberikan hasil yang baik dengan tinggi tanaman mencapai 9,2 cm, 10 daun per tanaman, 5,5 akar per tanaman, dan 7,9 cm panjang akar. Media kultur *in vitro* krisan menggunakan MG3 merupakan media pertumbuhan terbaik ketika diaklimatisasi menggunakan arang sekam dengan tinggi tanaman mencapai 10,2 cm, 10,4 daun per tanaman, 6,8 akar per tanaman, dan 6,1 cm panjang akar. Keberhasilan aklimatisasi planlet krisan pada kondisi *ex vitro* berkisar antara 74–99%.

Katakunci: Media generik; Benih berkualitas; *In vitro*; *Dendranthema grandiflora* Tzvelev

**ABSTRACT.** Application of generic media which are cheaper to substitute the expensive Murashige and Skoog media and keep in resulting mass qualified chrysanthemum seeds has high impact in cost efficiency of the *in vitro* production of qualified seeds. Objective of the study was to find optimal generic media to produce qualified seeds for several varieties of chrysanthemum. The experiment was conducted at the Tissue Culture Laboratory, Cipanas Experimental Garden of Indonesian Ornamental Plant Research Institute from January to December 2011. Two treatments tested in the study i.e. varieties and modified-generic media were arranged in a randomized complete block design with three replications. The first factor was varieties of Ratnahapsari, Kusumapatria, Cintamani, Sasikirana, and Kusumaswasti. The second factor was the modification of the generic media *viz.* (1) half strength Murashige and Skoog (MS) containing 0.1 mg/l IAA as control, (2) 3 g/l Hyponex (20N:20K:20P) with MS vitamin supplemented with 0.1 mg/l IAA, (3) 3 g/l Hyponex (20N:20K:20P) with 50% coconut water (CW), (4) 3 g/l Hyponex (20N:20K:20P) augmented with 0.1 mg/l technical vitamin B complex and 0.1 mg/l IAA, (5) 2 g/l Gandasil D with MS vitamin containing 0.1 mg/l IAA, (6) 2 g/l Gandasil D with 50% CW, (7) 2 g/l Gandasil D added with 0.1 mg/l technical vitamin B complex and 0.1 mg/l IAA, and (8) half strength MS media using technical quality materials supplemented with 0.1 mg/l technical vitamin B complex and 0.1 mg/l IAA. Results of the study indicated that Ratnahapsari was responsive variety in *in vitro* culture that produced plantlets with 7.2 cm height, 7.5 leaves per plantlet, 4.0 roots per plantlet and 4.6 cm root length. 3 g/l Hyponex (20N:20K:20P) supplemented with 0.1 mg/l technical vitamin B complex and 0.1 mg/l IAA (MG3) was suitable generic medium to substitute MS medium in *in vitro* culture of chrysanthemum. The medium stimulated plantlet growth with 7.0 plantlet height, 8.8 leaves per plantlet, 3.5 roots per plantlet and 6.9 cm root length with 52.38% efficiency cost. In acclimatization stage, Sasikirana was responsive variety with 9.2 cm plant height, 10 leaves per plant, 5.5 roots per plant and 7.9 cm root length. *In vitro* culture medium of chrysant using MG3 was the best medium while acclimatized using rice husk with 10.2 plant height, 10.4 leaves per plant, 6.8 roots per plant and 6.1 cm root length. Percentage of survivability of chrysanthemum plantlets in *ex vitro* condition was about 74–99%.

Keywords: Generic media; Qualified-seed; *In vitro*; *Dendranthema grandiflora* Tzvelev

Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) merupakan komoditas tanaman hias dengan nilai ekonomi tinggi di Indonesia. Produksi krisan terus

meningkat dari tahun ke tahun. Tahun 2010 produksi krisan mencapai 185.232.970 tangkai per tahun, meningkat menjadi 305.867.882 tangkai pada tahun

2011 dan 397.228.983 tangkai pada tahun 2012 (Badan Pusat Statistik 2012). Produksi yang terus meningkat juga menyebabkan permintaan benih yang meningkat. Produksi benih krisan berkualitas umumnya dihasilkan melalui perbanyakan *in vitro* menggunakan media Murashige dan Skoog (MS) yang mahal harganya. Aplikasi medium MS pada perbanyakan krisan secara *in vitro* telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Ilahi et al. (2007) menggunakan medium MS yang ditambah dengan 0,1 mg/l *benzylamino purine* (BAP) dan 0,1 mg/l *asam asetat naftalen* (NAA) untuk induksi kalus embriogenik dari nodus sebagai sumber eksplan, MS yang ditambah dengan 2 mg/l N-6 *benzyladenine* (BA) dan 0,1 mg/l kinetin sesuai untuk perbanyakan tunas berkualitas dari petal (Nahid et al. 2007), 1 mg/l BAP untuk produksi tunas dari tunas pucuk (Waseem et al. 2009, 2011), 0,3 mg/l *indol-3-butiric acid* (IBA) (Waseem et al. 2009), 0,5 mg/l BAP dan 0,2 mg/l NAA (Barakat et al. 2010), dan 0,3 mg/l BAP (Shatnawi et al. 2010).

Penggunaan medium MS dalam perbanyakan *in vitro* krisan untuk menghasilkan benih berkualitas telah banyak diaplikasikan, namun membutuhkan biaya yang lebih mahal. Hasil analisis ekonomi pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa untuk 1 liter medium MS dibutuhkan biaya hingga Rp6.560,00, sementara pemanfaatan medium generik dapat menghemat biaya hingga 35% (Shintiavira et al. 2012). Medium generik disamping lebih murah harganya, bahan ini juga mudah didapatkan di toko-toko penyedia sarana produksi pertanian. Oleh karena itu aplikasi dan modifikasi medium generik dalam produksi dan perbanyakan benih krisan berkualitas menjadi penting artinya berkaitan dengan efisiensi biaya produksi yang harus dikeluarkan oleh pelaku usaha benih krisan yang menggunakan kultur *in vitro* sebagai bagian dari proses produksi benihnya.

Bahan-bahan yang dapat digunakan sebagai pengganti media MS di antaranya pupuk majemuk dengan kandungan hara makro dan mikro yang lengkap, bahan kimia makro dan mikro teknis, vitamin teknis, dan air kelapa (Shintiavira et al. 2012). Pupuk majemuk seperti, Hyponex, Growmore, Rosasol, dan Gandasil merupakan beberapa jenis pupuk majemuk yang mudah ditemukan dan murah. Beberapa aplikasi media generik pada kultur *in vitro* krisan untuk substitusi media MS telah dilaporkan oleh Da Silva (2003) dan Shintiavira et al. (2012). Pada *thin cell layer* (TCL) nodus eksplan yang dikultur pada 3 g/l Hyponex dengan 20 g/l sukrosa mampu menginduksi pertumbuhan tunas (Da Silva 2003), sementara nodus eksplan yang dikultur pada 3 g/l Hyponex (20N:20K:20P) mampu menghasilkan bibit kualitas krisan dan pemanfaatan

media generik tersebut mampu menekan biaya hingga 35% (Shintiavira et al. 2012). Selanjutnya aplikasi air kelapa dalam kultur *in vitro* krisan telah dilaporkan oleh Alejandro et al. (1999), Faisal & SI-amin (2000), dan Matulata (2003). Medium MS yang ditambah dengan 1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 10% air kelapa, dan 2% sukrosa efektif untuk perbanyakan tunas (Alejandro et al. 1999), medium yang sama yang ditambah 0,8 mg/l Kin + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA + 0,5 mg/l NAA + 10% air kelapa optimal untuk induksi kalus dan perbanyakan tunas (Faisal & SI-amin 2000) dan penambahan 50% air kelapa pada medium yang sama menghasilkan pertumbuhan planlet yang lebih baik dibanding tanpa air kelapa (Matulata 2003), sedangkan kombinasi aplikasi media generik, bahan teknis, dan air kelapa pada perbanyakan benih krisan berkualitas pada beberapa varietas yang dihasilkan Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi) belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi media generik, bahan teknis, dan air kelapa untuk substitusi medium MS pada kultur *in vitro* beberapa varietas krisan Balithi. Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini minimal didapatkan satu kombinasi media generik yang optimal untuk substitusi medium MS pada kultur *in vitro* krisan pada beberapa varietas krisan Balithi. Diharapkan melalui studi ini ditemukan media substitusi MS yang optimal untuk kultur *in vitro* krisan beberapa varietas krisan Balithi.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan Bahan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca, Kebun Percobaan Cipanas, Balai Penelitian Tanaman Hias dari bulan Januari sampai dengan Desember 2011. Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah stek pucuk varietas krisan Balithi, yaitu: Ratnahapsari, Kusumapatria, Cintamani, Sasikirana, dan Kusumaswasti. Tanaman dipelihara di Rumah Kaca Kebun Percobaan Cipanas sesuai dengan prosedur operasional standar budidaya tanaman induk krisan Balithi. Stek yang digunakan berasal dari tanaman yang bebas *chrysanthemum virus B* (CVB), sedangkan eksplan yang digunakan berupa nodus.

### Sterilisasi Eksplan

Eksplan dipotong sesuai ruas dengan menyisakan tangkai dan dirompes daunnya, kemudian dicuci dengan air mengalir menggunakan sabun cair 1 ml/ 100 ml selama 5 menit. Setelah dicuci bersih, direndam pada alkohol 10% selama 3 menit dan dibilas tiga kali menggunakan air bersih. Eksplan

selanjutnya dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan bakterisida dan fungisida (masing-masing 5 g/l) selama 45 menit dan digojok di atas *shaker* pada kecepatan 200 rpm. Setelah itu, buang larutan pestisida dan bilas eksplan dengan akuades sebanyak tiga kali (@ 5 menit) dan pembilasan tersebut dilakukan dalam *laminair air flow*. Eksplan kemudian direndam pada larutan Clorox 10 % selama 3 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali masing-masing 5 menit. Setelah sterilisasi, eksplan dalam bentuk tunas pucuk dan nodus dikultur pada media inisiasi.

**Penyiapan Media dan Eksplan**

Penyiapan media dilakukan dengan menimbang bahan sesuai komposisi medium MS sebagai kontrol, menimbang 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) dan 2 g/l Gandasil D, dilarutkan dalam 500–750 air destilasi. Menambahkan 20 g/l sukrosa dan 7 g agar pada tiap media, menambahkan air destilasi hingga volume 995 ml, mengukur dan mengatur pH medium menggunakan larutan 1N NaOH atau HCl hingga pH 5,8. Memasak media hingga mendidih dan menuangkan pada botol kultur jam ( $\pm$  30 ml/botol), menutup dengan plastik dan mengikat dengan karet. Botol berisi media selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, 15 kPa selama 20 menit.

Penyiapan eksplan nodus untuk percobaan dilakukan dengan menanam nodus dan pucuk pada medium ½ MS. Tunas yang tumbuh setelah inisiasi awal pada media MS disubkultur dengan memotong tiap nodus dengan helaian daunnya menjadi sumber eksplan. Eksplan yang ditanam pada media perlakuan diperoleh dari hasil subkultur keempat. Eksplan baik untuk tujuan inisiasi maupun perlakuan diinkubasi pada kondisi terang 16 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas cahaya  $\pm$  13  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s pada suhu 24 $\pm$ 1°C.

**Pengaruh Varietas dan Modifikasi Media Generik Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Krisan Pada Kondisi *In Vitro* dan *Ex Vitro***

Pada percobaan ini terdapat dua perlakuan yang diuji coba. Perlakuan pertama adalah varietas krisan Balithi yang terdiri atas varietas Ratnahapsari, Kusumapatria, Cintamani, Sasikirana, dan Kusumaswasti. Faktor kedua adalah modifikasi media generik, yang terdiri atas delapan macam, yaitu: MG0=½ MS + IAA 0,1 mg/l (kontrol), MG1= 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) + 0,1 mg/l IAA, MG2= 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) dengan 50% air kelapa, MG3 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA, MG4= 2 g/l Gandasil D + 0,1 mg/l IAA, MG5= 2 g/l Gandasil D dengan 50% air kelapa, MG6= 2 g/l Gandasil D + 0,1 mg/l vitamin B kompleks

**Tabel 1. Komposisi pupuk majemuk Hyponex 20:20:20 dan Gandasil D (*Composition of Hyponex complex fertilizer 20:20:20 and Gandasil D*)**

| Unsur (Element)                       | Kandungan dalam pupuk majemuk (Content of complex fertilizer) |            |
|---------------------------------------|---|------------|
|                                       | Hyponex 20:20:20  | Gandasil D |
| <b>N (%)</b>                          |   |            |
| Organik                               | 4,01  | 12,06      |
| NH <sub>4</sub>                       | 5,88  | 9,26       |
| NO <sub>3</sub>                       | 5,68  | 1,60       |
| Ntotal                                | 15,57   | 22,93      |
| <b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (%)</b> |   |            |
| As.sitrat 2%                          |   |            |
| Air                                   |   |            |
| Total                                 | 19,5  | 16,95      |
| <b>K<sub>2</sub>O (%)</b>             | 19,21   | 12,45      |
| <b>CaO (%)</b>                        | 0,07  | 0,01       |
| <b>MgO (%)</b>                        | 0,11  | 0,07       |
| <b>S (%)</b>                          | td  | 5,29       |
| <b>Fe (ppm)</b>                       | 5,95  | 413        |
| <b>Mn (ppm)</b>                       | 217   | 1088       |
| <b>Cu (ppm)</b>                       | 19  | 339        |
| <b>Zn (ppm)</b>                       | 22  | 58         |
| <b>B (ppm)</b>                        | 70  | 891        |
| <b>Co (ppm)</b>                       | 12,55   | 1,1        |
| <b>Mo (ppm)</b>                       | td  | 69         |
| Kadar air (Water content), %          | 6,56  | 1,54       |

**Tabel 2. Komposisi media MS (*Media MS composition*)**

| Unsur (Element)                                     | Berat (Weight), mg/l |
|---|----------------------|
| <b>Makro (Macro)</b>                                |                      |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 332,02               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170,00               |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1900,00              |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | 180,54               |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650,00              |
| <b>Mikro (Micro)</b>                                |                      |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,025                |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,025                |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,20                 |
| KI  | 0,83                 |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 22,3                 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                 |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8,60                 |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 27,8                 |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                | 37,3                 |
| <b>Vitamin</b>                                      |                      |
| Thiamine HCL  | 0,10                 |
| Nicotianic acid                                     | 0,50                 |
| Pyridoxine HCL                                      | 0,50                 |
| Glycine   | 2,00                 |
| Myoinositol   | 100                  |

**Tabel 3. Vitamin B kompleks teknis dari vitamin B kompleks IPI (Technical vitamine B-complex from IPI vitamine B-complex)**

| Unsur (Element)       | Berat (Weight)<br>mg/250 mg |
|-----------------------|-----------------------------|
| Vitamin B1            | 2                           |
| Vitamin B2            | 2                           |
| Vitamin B6            | 2                           |
| Calcium penthathonate | 10                          |
| Nicotianic acid       | 20                          |

teknis + 0,1 mg/l IAA, MG7= media ½ MS dengan kualitas teknis + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA.

Percobaan disusun menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial dengan tiga ulangan. Tiap perlakuan terdiri atas lima botol. Tiap botol terdapat lima eksplan yang ditanam. Tunas hasil percobaan disubkultur setiap 8 minggu hingga empat kali.

#### Aklimatisasi Tunas Hasil Perbanyak

Delapan minggu setelah tanam pada subkultur keempat, tanaman diaklimatisasi di lapangan selama 4 minggu. Saat aklimatisasi, tanaman yang telah bersih dari media agar direndam bakterisida Agrept 1 g/l dan fungisida Benlox 1 g/l selama 5 menit kemudian ditanam pada media arang sekam. Pada percobaan ini terdapat dua perlakuan yang diuji coba. Perlakuan pertama adalah varietas krisan Balithi yang terdiri atas Ratnahapsari, Kusumapatria, Cintamani, Sasikirana, dan Kusumaswasti. Perlakuan kedua adalah planlet yang ditanam pada media *in vitro* yang berbeda (MG0-MG7) yang kemudian diaklimatisasi pada arang sekam. Percobaan disusun menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial dengan tiga ulangan. Tiap perlakuan terdiri atas satu bak aklimatisasi. Tiap bak aklimatisasi terdapat 10 eksplan yang ditanam. Total planlet yang diaklimatisasi tiap perlakuan adalah 30 planlet. Pemeliharaan tanaman saat aklimatisasi dilakukan dengan menyiram setiap hari untuk menjaga kelembaban media. Tanaman hasil aklimatisasi selanjutnya diamati kemampuan tumbuhnya pada kondisi *ex vitro*.

#### Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati saat inkubasi adalah (1) tinggi planlet (cm), (2) jumlah daun, (3) jumlah akar, (4) panjang akar (cm), (5) tingkat multiplikasi daun adalah parameter pada percobaan 1, (6) persentase tanaman hidup (%), (7) tinggi tanaman (cm), (8) jumlah daun, (9) jumlah akar, (10) panjang akar (cm) adalah parameter yang diukur pada percobaan aklimatisasi. Pengukuran parameter dilakukan pada 8 minggu

setelah kultur *in vitro*. Pengamatan secara periodik 4 minggu sekali dilakukan untuk mengetahui trend pertumbuhan tanaman pada semua parameter yang diamati. Persentase tanaman hidup adalah jumlah tanaman yang hidup dibagi dengan jumlah tanaman yang diaklimatisasi kali 100%. Semua parameter diamati pada 4 minggu setelah tanam.

#### Analisis Data

Data yang terkumpul dalam percobaan ini dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) menggunakan program SAS *Release Window* 9.12. Jika terdapat pengaruh nyata perlakuan, maka dilakukan pengujian nilai rerata perlakuan menggunakan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 95%. Kemudian diukur regresi korelasi pertumbuhan planlet *in vitro* dengan *ex vitro*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh Varietas dan Modifikasi Media Generik Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Krisan Pada Kondisi *In Vitro*

Hasil pengamatan secara periodik menunjukkan bahwa rerata inisiasi tunas terjadi dalam 5–10 hari, sementara inisiasi akar terjadi dalam waktu 7–12 hari. Pada pengamatan lima varietas yang diuji pada 8 minggu setelah kultur menunjukkan bahwa tinggi tanaman bervariasi antara 2,7–7,2 cm dengan 6,5–7,5 jumlah daun per tunas, 2,8–4,0 akar per tunas dan 4,6 – 9,5 cm panjang akar.

Perlakuan varietas dan media memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur *in vitro* krisan. Namun kedua perlakuan tersebut tidak memberikan pengaruh interaksi yang nyata pada semua peubah yang diamati. Dari lima varietas yang diuji coba terlihat bahwa varietas Ratnahapsari merupakan varietas yang memiliki respons pertumbuhan dan perkembangan yang paling baik dan berbeda nyata dibanding varietas yang lain. Varietas ini memiliki tinggi tunas hingga 7,2 cm dengan 7,5 jumlah daun per tunas, 4,0 akar per tunas dan 4,6 cm panjang akar (Tabel 4). Sementara respons pertumbuhan yang tidak maksimal terdapat pada varietas Cintamani. Selanjutnya medium MG3 merupakan medium terbaik dalam mendukung pertumbuhan eksplan dibanding media lain dan kontrol. Medium tersebut mampu menstimulasi pertumbuhan tinggi tunas hingga 7,0 cm dengan 8,8 jumlah daun per tunas, 3,5 akar per tunas dan 6,9 cm panjang akar (Tabel 4). Sementara MG4 merupakan medium dengan kemampuan mendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan terendah dibanding media lain dan kontrol.

Krisan yang ditanam pada media yang mengandung media dasar Hyponex pertumbuhannya hampir sama dengan eksplan yang ditanam pada media MS. Hasil yang tidak maksimal terdapat pada eksplan yang ditanam pada media Gandasil D. Pada media dasar Gandasil D, pertumbuhan dan perkembangan tunas terhambat. Tunas lebih pendek dan warna daun hijau muda dan cenderung kuning. Komposisi magnesium pada Hyponex hijau sebesar 0,11%, sedangkan pada Gandasil D sebesar 0,07% (Tabel 1), gejala kekurangan magnesium tampak klorosis di antara urat daun, disamping terdapat di klorofil magnesium bergabung dengan ATP mengaktifkan banyak enzim yang diperlukan dalam fotosintesis, respirasi, pembentukan DNA dan RNA (Salisbury & Ross 1995). Pada media MS *grade* teknis, tunas tumbuh dengan warna daun yang hijau tua, namun lebih pendek dibandingkan tunas yang tumbuh pada medium MS *grade* pro analisis (kontrol), sedangkan eksplan yang dikultur pada medium yang mengandung air kelapa menghasilkan kalus pada dasar tunas pada tahap awal sebelum inisiasi akar, namun kalus mengalami pencokelatan dan mati, tetapi akar tetap tumbuh sempurna. Hal ini karena air kelapa mampu menginduksi pembelahan

dan pertumbuhan sel tanaman secara cepat, sehingga mampu menginduksi kalus dan morfogenesis (Molnar *et al.* 2011). Komposisi 50% air kelapa pada kultur *in vitro* krisan menstimulasi pertumbuhan kalus pada dasar potongan eksplan namun terjadi pencokelatan karena terjadinya oksidasi dan senyawa fenolik dalam jaringan eksplan dan sekresi eksplan (Dan *et al.* 2009).

Pada pengamatan secara periodik setiap 4 minggu terlihat bahwa aplikasi media generik memiliki respons yang berbeda terhadap pertumbuhan planlet krisan. MG3 (medium 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) yang ditambah dengan 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis dan 0,1 mg/l IAA memiliki kemampuan yang sebanding dengan medium MS (MG0) dalam mendukung pertumbuhan planlet terkait dengan pertambahan tinggi dan jumlah daun, diikuti dengan medium MG1. Sementara terhadap pertumbuhan akar, MG2 merupakan medium dengan kemampuan menginduksi pertumbuhan akar lebih baik dibanding media MG0 (Gambar 1). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemanfaatan medium generik dalam produksi benih berkualitas krisan sangat dimungkinkan dan dapat diaplikasikan pada skala komersial.

**Tabel 4. Pengaruh varietas dan media terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan krisan pada kultur *in vitro* 8 minggu setelah kultur inisiasi (Effect of varieties and media on growth and development of *in vitro* culture of chrysanthemum explant 8 weeks after culture initiation)**

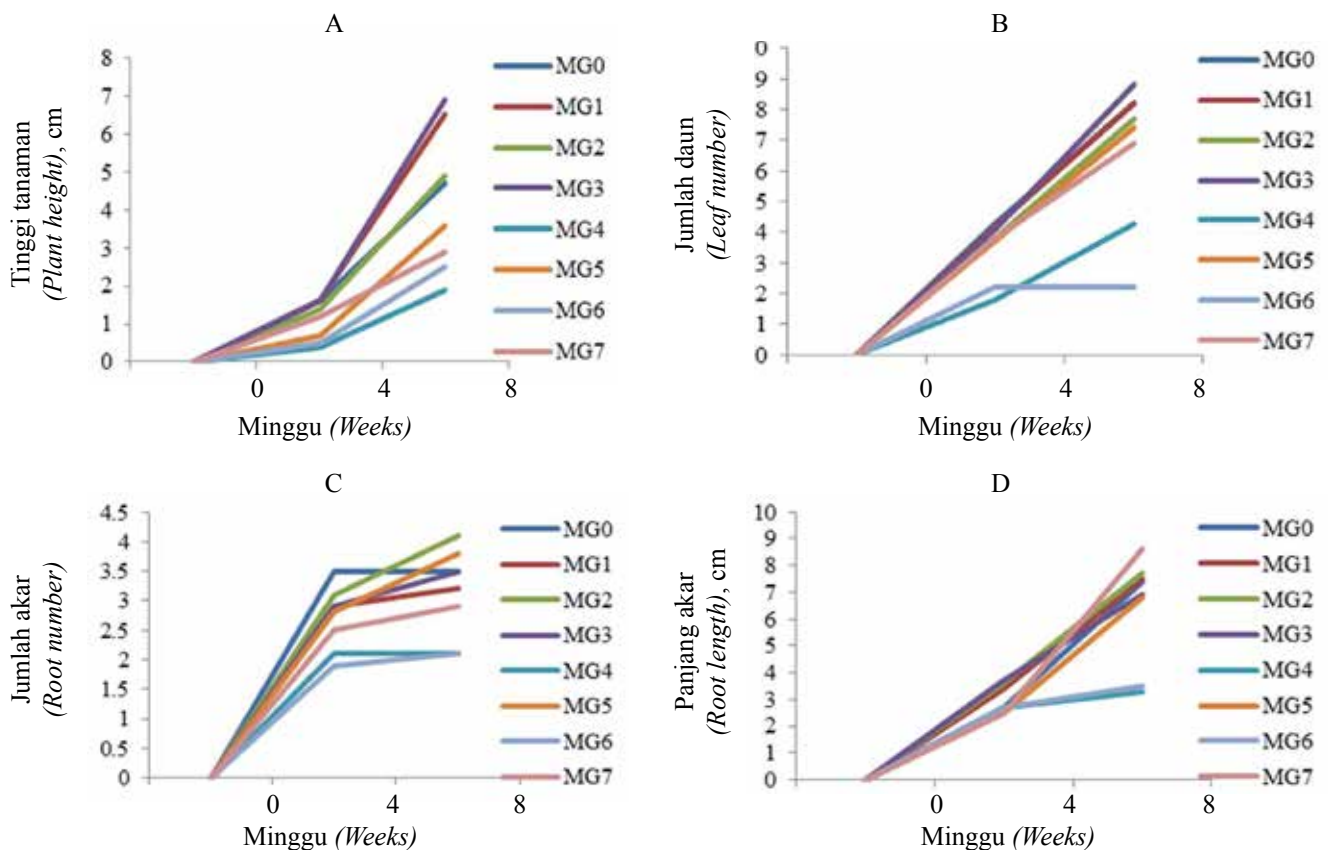
| Jenis varietas<br>(Type of variety) | Tinggi planlet<br>(Plantlet height) cm | Jumlah daun<br>(Number of leaves) | Jumlah akar<br>(Number of roots) | Panjang akar<br>(Root length) cm |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Ratnahapsari                        | 7,2 a                                  | 7,5                               | 4,0 a                            | 4,6 c                            |
| Kusumapatria                        | 3,4 c                                  | 7,2                               | 2,9 b                            | 6,5 b                            |
| Cintamani                           | 3,1 cd                                 | 7,1                               | 2,4 b                            | 4,9 c                            |
| Sasikirana                          | 4,9 b                                  | 7,2                               | 3,7 a                            | 6,9 b                            |
| Kusumaswasti                        | 2,7 d                                  | 6,5                               | 2,8 b                            | 9,5 a                            |
| <b>KK (CV), %</b>                   | 12,97                                  | 11,90                             | 16,77                            | 17,34                            |
| <b>Jenis media (Type of medium)</b> |  |                                   |                                  |                                  |
| MG0                                 | 4,7 b                                  | 8,2 ab                            | 3,5 ab                           | 7,4 a                            |
| MG1                                 | 6,5 a                                  | 8,2 ab                            | 3,2 ab                           | 7,5 a                            |
| MG2                                 | 4,9 b                                  | 7,7 ab                            | 4,1 a                            | 7,7 a                            |
| MG3                                 | 6,9 a                                  | 8,8 a                             | 3,5 ab                           | 6,9 a                            |
| MG4                                 | 1,9 e                                  | 4,3 c                             | 2,1 c                            | 3,3 b                            |
| MG5                                 | 3,6 c                                  | 7,4 b                             | 3,8 ab                           | 6,8 a                            |
| MG6                                 | 2,5 de                                 | 5,2 c                             | 2,1 c                            | 3,5 b                            |
| MG7                                 | 2,9 cd                                 | 6,9 b                             | 2,9 bc                           | 8,6 a                            |
| <b>KK(CV), %</b>                    | 12,97                                  | 11,90                             | 16,78                            | 17,34                            |

KK = koefisien keragaman, MG0 = ½ MS + 0,1 mg/l IAA (kontrol), MG1 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) + 0,1 mg/l IAA, MG2 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) dengan 50% air kelapa, MG3 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA, MG4 = 2 g/l Gandasil D + 0,1 mg/l IAA, MG5 = 2 g/l Gandasil D dengan 50% air kelapa, MG6 = 2 g/l Gandasil D + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA, MG7 = media ½ MS dengan kualitas teknis + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA. Angka rerata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan taraf kepercayaan 95% (CV = coefficient of variation, MG0 = half-strength MS medium containing 0.1 mg/l IAA (as control), MG1 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) supplemented with 0.1 mg/l IAA, MG2 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) augmented with 50% coconut water (CW), MG3 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) containing 0.1 mg/l technical complex B vitamins and 0.1 mg/l IAA, MG4 = 2 g/l Gandasil D supplemented with 0.1 mg/l IAA, MG5 = 2 g/l Gandasil D augmented with 50% CW, MG6 = 2 g/l Gandasil D containing 0.1 mg/l technical complex B vitamins and 0.1 mg/l IAA, MG7 = technical grades of half-strength MS medium containing 0.1 mg/l technical complex B vitamins and 0.1 mg/l IAA, Means followed the same letter in the same column are not significantly difference based on Duncan Multiple Range Test (DMRT) p= 0.05)

### Pengaruh Varietas dan Modifikasi Media Generik Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Krisan Pada Kondisi *Ex Vitro*

Perlakuan varietas dan media kultur *in vitro* yang kemudian diaklimatisasi pada media arang sekam juga berpengaruh nyata terhadap keberhasilan aklimatisasi, pertumbuhan dan perkembangan planlet pada kondisi *ex vitro*. Namun kedua perlakuan tersebut juga tidak memberikan pengaruh interaksi yang nyata pada semua peubah yang diamati. Dari lima varietas yang diuji terlihat bahwa persentase keberhasilan aklimatisasi mencapai 92% ditunjukkan oleh Kusumaswasti, meski secara statistik tidak

berbeda nyata dengan varietas yang lain. Sementara berdasarkan pertumbuhan dan perkembangan planlet, Sasikirana memberikan hasil yang baik tinggi tanaman mencapai 9,2 cm, 10 daun per planlet, 5,5 akar per planlet dan 7,9 cm panjang akar (Tabel 5), sedangkan berdasarkan media *in vitro*, keberhasilan aklimatisasi tertinggi mencapai 99,1% ditunjukkan oleh planlet yang dikultur pada media MG7. Sementara berdasarkan pertumbuhan dan perkembangan planlet terbaik terlihat pada planlet yang dikultur pada media MG3 dengan tinggi tanaman mencapai 10,2 cm, 10,4 daun per planlet, 6,8 akar per planlet dan 6,1 cm panjang akar (Tabel 5).



**Gambar 1.** Pertumbuhan plantlet krisan pada tiap 4 minggu pada delapan media yang diuji. (A) tinggi planlet, (B). jumlah daun, (C) jumlah akar, dan (D) panjang akar (cm) MG0 =  $\frac{1}{2}$  MS + 0,1 mg/l IAA (kontrol), MG1 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) + 0,1 mg/l IAA, MG2 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) dengan 50% air kelapa, MG3 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA, MG4 = 2 g/l Gandasil D + 0,1 mg/l IAA, MG5 = 2 g/l Gandasil D dengan 50% air kelapa, MG6 = 2 g/l Gandasil D + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA, MG7 = media  $\frac{1}{2}$  MS dengan kualitas teknis + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA. (*Chrysanthemum plantlet growth each 4 week observation on eight media tested, (A) height plantlet, (B) leaf number, (C) root number, and (D) root length (cm). MG0 = half-strength MS medium containing 0.1 mg/l IAA (as control), MG1 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) supplemented with 0.1 mg/l IAA, MG2 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) augmented with 50% coconut water (CW), MG3 = 3 g/l Hyponex (20N:20P:20K) containing 0.1 mg/l technical complex B vitamins and 0.1 mg/l IAA, MG4 = 2 g/l Gandasil D supplemented with 0.1 mg/l IAA, MG5 = 2 g/l Gandasil D augmented with 50% CW, MG6 = 2 g/l Gandasil D containing 0.1 mg/l technical complex B vitamins and 0.1 mg/l IAA, MG7 = technical grades of half-strength MS medium containing 0.1 mg/l technical complex B vitamins and 0.1 mg/l IAA*)

**Hubungan Pertumbuhan Tanaman Pada Kondisi In Vitro Dengan Ex Vitro**

Hasil analisis regresi korelasi data pada semua peubah terhadap keberhasilan aklimatisasi terlihat bahwa tidak ada korelasi dengan tingkat kepercayaan yang mencapai lebih dari 50% pada semua peubah yang diamati. Hasil analisis pada tinggi planlet, jumlah akar, jumlah daun, dan panjang akar hanya 14, 28, 38, dan 38% secara berurutan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan antara perlakuan media *in vitro* dengan keberhasilan aklimatisasi, pertumbuhan, dan perkembangan planlet.

Tiap eksplan dan tiap varietas memiliki respons pertumbuhan dan perkembangan yang berbeda baik pada kondisi *in vitro* maupun *ex vitro*. Perbedaan respons tersebut juga ditemukan pada penelitian ini. Eksplan yang diambil dari varietas Ratnahapsari memiliki respons pertumbuhan dan perkembangan *in vitro* yang lebih baik dibanding varietas yang lain. Sementara pada pertumbuhan dan perkembangan planlet pada kondisi *ex vitro*, planlet dari Sasikirana memberikan hasil yang lebih baik dibanding varietas yang lain. Hasil ini juga memberi bukti bahwa perbedaan lingkungan tumbuh juga berpengaruh terhadap respons pertumbuhan dan perkembangan yang berbeda pada tiap varietas. Barakat *et al.* (2010) menemukan eksplan bunga pita dari kultivar Ping Pong memiliki respons tumbuh yang lebih baik dibanding

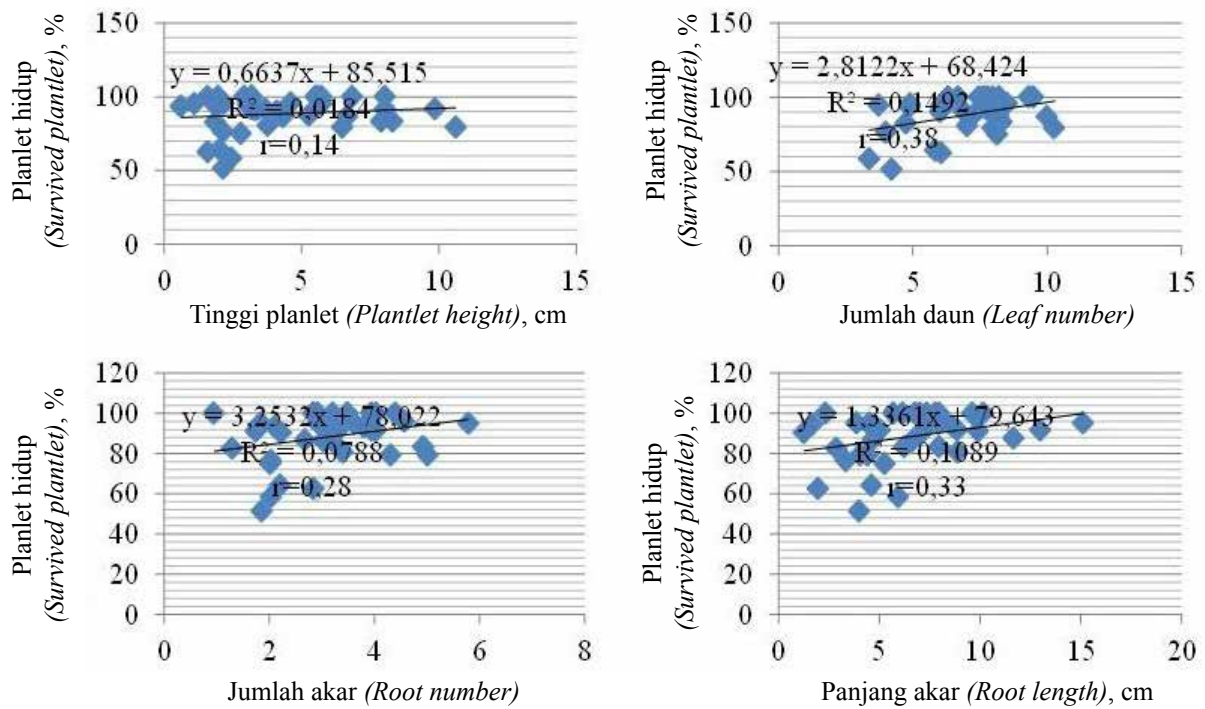
kultivar PalisadeWhite dan Delistar White dalam pembentukan kalus. Genotip 89 dan 4037 memberikan respons lebih baik dalam pembentukan tunas dengan petal sebagai sumber eksplan dibanding genotip 4038, 4040 dan 78 (Nahid *et al.* 2007).

Aplikasi medium Hyponex sebagai pengganti media MS sebagai media dasar yang ditambah 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis dan 0,1 mg/l IAA dalam kultur *in vitro* krisan berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan planlet, baik terhadap tinggi planlet, jumlah daun, akar, dan panjang akar. Young *et al.* (2000) mencatat bahwa aplikasi medium Hyponex berpengaruh nyata terhadap konversi plb *Phalaenopsis* menjadi planlet dengan peningkatan konversi mencapai 80%. Medium Hyponex® (3,5 g/l 6,5 N:6,0 P:19 K) yang ditambah dengan 2 g/l peptone sesuai untuk perkecambahan biji, pembentukan plb dan regenerasi planlet *Doriella Tiny* (Duan & Yasawa 1995), ditambah dengan 2 mg/l BA, 2 g/l arang aktif, dan 30 g/l sukrosa sesuai untuk perbanyak tunas dan penambahan berat basah tunas *Anoectochilus formosanus* (Yoon *et al.* 2007), 2 g/l peptone, 3% (w/v) ekstrak kentang, dan 0,05% arang aktif cocok untuk proliferasi plb *Phalaenopsis* cv. Tinny Sunshine Annie, Taisuco Hatarot, Teipei Gold Golden Star, Tinny Galaxy Annie (Park *et al.* 2002), 0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BA, 2 g/l arang aktif, dan 2 g/l peptone optimal untuk proliferasi kalus, pembentukan, dan

**Tabel 5. Pengaruh varietas dan media *in vitro* terhadap aklimatisasi, pertumbuhan, dan perkembangan planlet 4 minggu setelah tanam pada media arang sekam (Effect of varieties and *in vitro* media on acclimatization, growth, and development of plantlets 4 weeks after culture in rice-husk media)**

| Varietas<br>(Type of varieties) | Tanaman hidup<br>(Survive plants), % | Tinggi tanaman<br>(Plantlet height)<br>cm | Jumlah daun<br>(Number of<br>leaves) | Jumlah akar<br>(Number of<br>roots) | Panjang akar<br>(Root length)<br>cm |
|---------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Ratnahapsari                    | 89,8                                 | 9,3 a                                     | 8,8 c                                | 5,1 b                               | 4,0 c                               |
| Kusumapatria                    | 84,1                                 | 7,9 b                                     | 11,7 a                               | 6,9 a                               | 8,4 a                               |
| Cintamani                       | 87,1                                 | 5,4 c                                     | 8,5 c                                | 4,9 b                               | 5,8 b                               |
| Sasikirana                      | 88,3                                 | 9,2 a                                     | 10,0 b                               | 5,5 b                               | 7,9 a                               |
| Kusumaswasti                    | 92,4                                 | 5,1 c                                     | 9,9 b                                | 5,2 b                               | 8,1 a                               |
| KK (CV), %                      | 10,18                                | 13,64                                     | 9,02                                 | 12,95                               | 16,57                               |
| Jenis media<br>(Type of medium) | Tanaman hidup<br>(Survive plants), % | Tinggi tanaman<br>(Plantlet height)<br>cm | Jumlah daun<br>(Number of<br>leaves) | Jumlah akar<br>(Number of<br>root)  | Panjang akar<br>(Root length)<br>cm |
| MG0                             | 95,0 a                               | 8,2 b                                     | 9,6 c                                | 5,4 bc                              | 7,7 ab                              |
| MG1                             | 93,2 a                               | 9,9 a                                     | 9,3 c                                | 5,4 bc                              | 6,3 b                               |
| MG2                             | 91,8 ab                              | 7,8 b                                     | 11,0 ab                              | 5,0 bc                              | 9,9 a                               |
| MG3                             | 86,3 ab                              | 10,2 a                                    | 10,4 abc                             | 6,8 a                               | 6,1 b                               |
| MG4                             | 79,6 bc                              | 5,3 c                                     | 7,8 d                                | 4,5 c                               | 4,5 c                               |
| MG5                             | 87,7 ab                              | 6,7 c                                     | 11,3 a                               | 5,8 ab                              | 7,2 ab                              |
| MG6                             | 74,1 c                               | 5,8 c                                     | 9,1 cd                               | 5,8 ab                              | 6,2 bc                              |
| MG7                             | 99,1 a                               | 5,6 c                                     | 9,6 bc                               | 5,5 abc                             | 7,8 ab                              |
| KK(CV), %                       | 10,18                                | 13,64                                     | 9,02                                 | 12,95                               | 16,57                               |

Angka rerata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan taraf kepercayaan 95% (Mean followed by the same letter in the same column are not significantly difference based on Duncan Multiple Range Test (DMRT)  $p= 0.05$ )



**Gambar 2.** Regresi korelasi pertumbuhan plantlet pada kultur *in vitro* (X) dengan persentase hidup di lapangan/*in vivo* (Y) [Regression correlation of plantlet growth in vitro culture (X) with the percentage living on the ground / in vivo (Y)]

diferensiasi plb *Dendrobium crumenatum* (Meesawat & Kanchanapoom 2002), 8 g/l peptone, 2 g/l arang aktif, 8 g/l agar, dan 30 g/l sukrosa berpengaruh nyata terhadap perkecambahan biji, pembentukan plb, dan planlet *Dendrobium transparens* (Alam et al. 2002), 50 ml/l air kelapa dapat meningkatkan berat segar dan berat kering biomasa, jumlah akar, dan luas daun pada *Calanthe* hybrids (Baque et al. 2012). Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa aplikasi medium generik memiliki potensi yang tinggi untuk diaplikasikan pada skala komersial

Aklimatisasi sebagai salah satu titik kritis dalam kultur *in vitro* tanaman hias, ternyata juga berhasil dilakukan pada percobaan ini. Keberhasilan aklimatisasi planlet krisan pada kondisi *ex vitro* berkisar antara 74–99%. Ini mengindikasikan bahwa aklimatisasi hasil kultur *in vitro* krisan ke kondisi *ex vitro* bukan merupakan masalah kritis. Hasil penelitian yang hampir sama pada krisan juga dilaporkan oleh Nahid et al. (2007) yang mendapatkan keberhasilan aklimatisasi pada beberapa genotip krisan (89, 4037, 4038, 4040, dan 78) mencapai 80%.

Menurut Sudjana (2002) interpretasi nilai korelasi (r) memiliki kisaran yang berbeda. Korelasi sangat kuat terjadi jika nilai  $r = 0,8-1,00$ ,  $r = 0,6-0,79$  adalah kuat,  $r = 0,4-0,59$  adalah sedang,  $r = 0,2-0,39$  adalah rendah, dan  $r = 0,00-0,19$  adalah sangat rendah. Berdasarkan nilai hasil analisis regresi korelasi pada percobaan ini terlihat bahwa hubungan antara perlakuan dan

peubah yang diamati berada pada kisaran yang rendah. Hasil penelitian lain pada sembilan genotip krisan [*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat) Kitam] menunjukkan terdapat hubungan yang sangat kuat antara panjang planlet *in vitro* dengan panjang tanaman di lapangan dengan nilai koefisien korelasi +0,94 (Nancheva et al. 2006). Pada kultur anyelir, vigor yang baik dari beberapa genotip di rumah kaca tidak dipengaruhi pertumbuhan dari *in vitro* (Sestras 2007).

#### Efisiensi Biaya Penggunaan Media Generik

Pada Tabel 6, efisiensi harga yang tinggi dengan diiringi kualitas planlet yang bagus adalah penggunaan media MG3 yaitu sekitar 52,38 %. Pada media MG6

**Tabel 6.** Harga media uji per liter (Cost of medium tested per liter)

| Media kultur (Culture medium) | Harga per liter media (Medium cost per liter), Rp | Persentase efisiensi (Percentage of efficiency), % |
|-------------------------------|---|--|
| MG0                           | 6.561,38  | -  |
| MG1                           | 3.869,64  | 41,02  |
| MG2                           | 5.807,14  | 11,50  |
| MG3                           | 3.124,30  | 52,38  |
| MG4                           | 3.636,30  | 44,58  |
| MG5                           | 5.573,81  | 15,05  |
| MG6                           | 2.724,30  | 58,48  |
| MG7                           | 2.914,25  | 55,48  |



dan MG7 efisiensi tinggi antara 55,48–58,48% namun kualitas planlet tidak lebih bagus daripada kontrol sehingga tidak direkomendasikan.

## KESIMPULAN DAN SARAN

1. Ratnahapsari merupakan varietas yang paling responsif dalam kultur *in vitro* dan memiliki tinggi tunas hingga 7,2 cm dengan 7,5 jumlah daun per tunas, 4,0 akar per tunas dan 4,6 cm panjang akar.
2. 3 g/l Hyponex + 0,1 mg/l vitamin B kompleks teknis + 0,1 mg/l IAA merupakan media generik yang paling sesuai untuk menggantikan media MS yang menghasilkan planlet dengan tinggi tunas hingga 7,0 cm, 8,8 jumlah daun per tunas, 3,5 akar per tunas dan 6,9 cm panjang akar dengan efisiensi biaya 52,38%.
3. Sasikirana memberikan hasil yang baik dengan tinggi tanaman mencapai 9,2 cm, 10 daun per tanaman, 5,5 akar per tanaman dan 7,9 cm panjang akar pada pertumbuhan setelah aklimatisasi.
4. Media kultur *in vitro* krisan menggunakan MG3 adalah media pertumbuhan terbaik ketika diaklimatisasi menggunakan arang sekam dengan tinggi tanaman mencapai 10,2 cm, 10,4 daun per tanaman, 6,8 akar per tanaman, dan 6,1 cm panjang akar.
5. Keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 74–99%

## PUSTAKA

1. Alam, MK, Rashid, MH, Hossain, MS, Salam, MA & Rouf, MA 2002, 'In vitro seed propagation of dendrobium (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media', *Biotechnol.*, vol. 1, no. 2-4, pp. 111-5.
2. Alejandro, VD, Tandang, LL, Boteng, JD, Ongat, GM, Eusebio, VT & Eyadan, MB 1999, *Varietal evaluation and mass propagation of chrysanthemum*, Terminal report, Integrated Ornamental Horticulture R&D Program, BSU, 66p.
3. Badan Pusat Statistik 2011, *Produksi tanaman hias menurut provinsi (tangkai)*, diunduh 15 Agustus 2011, <<http://www.bps.go.id/>>.
4. Barakat, MN, Fattah, RSA, Badr, M & El-Torky, MG 2010, 'In vitro culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 9, no. 8, pp. 1151-58.
5. Baque, MA, Shin, YK, Elshmary, T, Lee, EJ & Paek, KY 2011, 'Effect of light quality, sucrose, coconut water concentration on the micropropagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' x 'Hyesung' and 'Chunkwang' x 'Hyesung')', *Aus. J. Crop Sci.*, vol. 5, no. 10, pp. 1247-54.
6. Da Silva, JAT 2003, 'Chrysanthemum : Advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology', *Biotechnology Advances*, vol. 21, no. 2003, pp. 715-66.

7. Dan, Y, Armstrong, CL, Dong, J, Feng, X, Fry, JE, Keithly, GE, Martinell, BJ, Roberts, GA, Smith, LA & Tan, LJ 2009, 'Lipolic acid-an unique plant transformation enhancer', *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*, vol. 45, no. 6, pp. 630-8.
8. Duan, XJ & Yasawa, S 1995, 'Induction of precocious flowering and seed formation of *Doriella* Tiny (*Dorotis pulcherrima* x *Kingiella philippinensis*) in vitro and in vivo', *Acta Hort.*, vol. 397, pp. 103-10.
9. Faisal, SM & SI-Amin, M 2000, 'Rapid multiplication of two *Chrysanthemum* cultivars through in vitro shoot tip culture', *Plant Tissue Cult.*, vol. 10, no. 2, pp. 131-6.
10. Gantait, SS, Pal, P & Saha, A 2010, 'Predicting crop yield and yield components of spray chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) in relation to weather variables', *ISHS Acta Horticulturae 937: XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Advances in Ornamentals, Landscape and Urban Horticulture*.
11. Ilahi, I, Jabeen, M & Sadaf, SN 2007, 'Rapid clonal propagation of chrysanthemum through embryogenic callus formation', *Pak. J. Bot.*, vol. 39, no.6, pp. 1945-52.
12. Matulata, AV 2003, 'Substitusi media MS dengan air kelapa dan Gandasil D pada kultur jaringan krisan', *Eugenia*, vol. 9, no. 4, hlm. 203-11.
13. Meesawat, U & Kanchanapoom, K, 2002, 'In vitro plant regeneration through embryogenesis and organogenesis from callus culture of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.)', *Thammasat Int. J. Sci.Tech.*, vol. 7, no. 2, pp. 9-17.
14. Molnar, Z, Virag, E & Ordog, V 2011, 'Natural substances in tissue culture media of higher plants', *Acta Biologica*, vol. 55, no. 1, pp.123-7.
15. Murashige, T & Skoog, F 1962, 'A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures', *Physiol Plant.*, vol. 15, no.3, pp. 473-97.
16. Nahid, J, Shyamali, S & Kazumi, H 2007, 'High frequency shoot regeneration from petal explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat in vitro', *Pakistan J. Biol. Sci.*, vol. 10, no.19, pp. 3356-61.
17. Nancheva, D 2006, 'In vitro prediction of plant height for *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam', *J. Fruit and Ornamental Plant Research*, vol. 14, pp. 223-32.
18. Park, SO, Murthy, HN, & Paek, KY, 2002, 'Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves', *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, vol. 38, pp.168-72.
19. Salisbury, FB & Ross, CW 1995, *Fisiologi tumbuhan Jilid 1* (Terjemahan: Lukman, DR dan Sumaryono), ITB, press, Bandung, hlm. 240.
20. Sestras, R, Tamas, E, Pamfil, D, Milhate, L, Sestras, A, Chis, L & Qin, C 2007, 'The influence of the genotype upon the in vitro and in vivo growth of greenhouse carnations', *Agronomy Research*, vol. 5, no. 1, pp. 51-8.
21. Shatnawi, M, Al-fauri, A, Megdadi, H, Al-, MK, Shibli, R Al-ghzawi, A 2010, 'In vitro multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat and it is responses to NaCl induced salinity', *Jordan J. Biol. Sci.*, vol.3, no.3, pp. 101-10.
22. Shintiavira, H, Soedarjo, M, Suryawati & Winarto, B 2012, 'Studi pengaruh substitusi hara makro dan mikro media MS dengan pupuk majemuk dengan kultur in vitro krisan', *J. Hort.*, vol. 22, no. 4, hlm. 334-41.
23. Sudjana 2002, *Metode statistika*, Tarsito, Bandung.

24. Waseem, K, Jilani, MS & Khan, MS 2009, 'Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture', *African J. Biotechnol.*, vol. B, no.9, pp. 1871-77.
25. Waseem, K, Jilani, MS, Khan, MS, Kiran, M & Khan, G 2011, 'Efficient in vitro regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) plantlets from nodal segments', *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1477-84.
26. Yoon, YJ, Murthy, HN & Paek, PK 2007, 'Biomass production of *Anoetochilus formosanus* Hayata in a bioreactor system', *J. Plant Biol.*, vol. 50, no. 5, pp. 573-6.
27. Young, PS, Murthy, HN & Yoeup, PK 2000, 'Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*', *Plant Cell, Tissue and Organ. Culture*, vol. 63, pp. 67-72.