

APLIKASI SITOKININ TIPE PURIN DAN UREA PADA MULTIPLIKASI TUNAS ANIS (*Pimpinella anisum* L.) IN VITRO

OTIH ROSTIANA

Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik
Jalan Tentara Pelajar No. 3, Bogor

ABSTRAK

Anis (*Pimpinella anisum* L.) merupakan tanaman herba tahunan yang termasuk ke dalam famili Umbelliferae. Buahnya diketahui mengandung minyak atsiri yang didominasi senyawa trans-anethol (90%) dan berkhasiat sebagai antiseptik, antispasmodik, antikanker, karminatif, pelega tenggorokan, obat bronkitis, serta digunakan dalam pembuatan sabun, parfum, pasta gigi, juga krim kulit. Sebagai tanaman bernilai ekonomi, upaya perbanyakan anis perlu dilakukan. Perbanyakan secara *in vitro* dengan teknik kultur jaringan merupakan salah satu metode alternatif yang dapat digunakan untuk menghasilkan bibit dalam jumlah banyak, seragam dan dalam waktu yang relatif singkat. Dengan penambahan sitokinin sintetik tipe urea seperti thidiazuron (TDZ) dan tipe purin seperti benzil amino purin (BAP) akan memacu inisiasi dan proliferasi tunas. Penelitian ini bertujuan mendapatkan media yang tepat untuk menginduksi tunas anis yang optimal dengan penambahan BAP atau TDZ, mengetahui respon pertumbuhan dan penampakan kultur akibat penambahan berbagai konsentrasi BAP atau TDZ, serta mempelajari sinergisme yang terjadi antara keduanya. Pada tahap inisiasi, eksplan berupa tunas pucuk diinduksi di dalam media MS padat dengan penambahan BAP (0,1 mg/l; 0,2 mg/l; 0,3 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l; 3 mg/l), atau TDZ dengan kisaran konsentrasi yang sama. Tunas terbanyak yang dihasilkan dari dua jenis sitokinin pada tahap ini disubkultur ke dalam media yang ditambahkan jenis sitokinin yang berbeda (TDZ ke BAP atau BAP ke TDZ) pada konsentrasi 0,3 mg/l atau 3 mg/l. Pada media yang ditambahkan TDZ dihasilkan tunas anis lebih banyak (3,62-6,28) dibandingkan pada media yang ditambahkan BAP (1,86-2,78), tetapi tunas yang dihasilkan pendek (roset). Sedangkan tunas yang dihasilkan dalam media yang ditambahkan BAP berupa lebih tinggi tetapi jumlah tunasnya sedikit. Subkultur tunas anis ke dalam media yang diperkaya dengan sitokinin yang berbeda meningkatkan jumlah tunas yang berproliferasi dan memperbaiki visual tunas.

Kata kunci: Anis, *Pimpinella anisum* L., minyak atsiri, multiplikasi tunas, *in vitro*, TDZ, BAP, Jawa Barat

ABSTRACT

Application of purine and urea types of cytokinins in shoot multiplication of Anise (Pimpinella anisum L.) in vitro

Pimpinella anisum L. or sweet anise is an annual-herbaceous plant belongs to the Umbelliferae family. The fruit of anise contains of essential oil, which is mainly consisted of trans-anethol (90%). Essential oils of anise is mainly used as an antiseptic, antispasmodic, anticancer, carminative, expectorant and has also been used as component in soap, perfumery, tooth paste, and skin cream productions. Since this crop is mainly cultivated in sub tropical region, anise cultivation in Indonesia has not been performed. To obtain sufficient numbers of anise planting materials *in vitro* propagation was conducted by applying benzyl amino purine (BAP) and thidiazuron (TDZ). In this research TDZ or BAP were applied at various concentrations (0,1 mg/l; 0,2 mg/l; 0,3 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l; 3 mg/l), to induce shoots in MS-solid culture media. The highest number of shoots obtained in those two type of cytokinins containing media from the initiation stage were subcultured into the media supplemented with different cytokinins (TDZ to BAP or BAP to TDZ) at 0,3 mg/l or 3 mg/l levels. The results showed that medium with the

addition of TDZ resulted in higher numbers of shoot (3,26-6,28) than that of medium with an addition of BAP (1,86-2,78). However, rosette shoots were dominant in TDZ containing medium. On the other hand, medium with an addition of BAP resulted in less numbers of shoots with taller nodes. Subculture of anise into different kinds of cytokinins increased the numbers of proliferated-shoots and recovered the abnormal shoots.

Key words: Anise, *Pimpinella anisum* L, essential oils, shoots multiplication, *in vitro*, TDZ, BAP, West Java

PENDAHULUAN

Anis (*Pimpinella anisum* L.) merupakan herba tahunan yang berasal dari kawasan Dunia Timur seperti Mesir dan Yunani serta dibudidayakan secara meluas di Spanyol, Bulgaria, Rumania dan beberapa negara Asia dan di Afrika Selatan (GUENTHER, 1990). Bagian yang dimanfaatkan adalah buahnya yang mengandung minyak atsiri dan didominasi oleh senyawa trans-anethol (maks. 90%), estragol (iso-anethol 2%), anis aldehida (<1%), himachalene (2%), dan senyawa lain yang khas, yaitu phenol ester 4-metoksi-2-phenol-2-metil-butirat. Buah anis berkhasiat sebagai antiseptik, antispasmodik, karminatif, pelega tenggorokan (ekspektoran), antikanker, serta penambah nafsu makan. Selain itu anis berpotensi untuk mendukung proses laktasi pada ibu menyusui, obat bronkitis akut, obat pencernaan, dengan sifat minyak atsirinya yang tidak berwarna, berbau lembut dan berasa manis bernilai dalam pembuatan sabun, parfum, pasta gigi, serta krim kulit (KATZER, 1998).

Sebagai tanaman bernilai ekonomi, maka upaya perbanyakan perlu dilakukan untuk mendukung penyediaan bibit untuk pembudidayaannya. Perbanyakan tanaman secara konvensional masih dibatasi dengan kemampuan tanaman untuk menghasilkan bibit baru dalam jumlah banyak, seragam, dan dalam waktu yang cepat. Teknik kultur jaringan merupakan metode alternatif yang dapat diaplikasikan untuk menghasilkan bibit dalam jumlah besar dalam waktu yang relatif singkat, seragam, bebas penyakit, dan produksi bibit yang tidak tergantung akan musim.

Perbanyakan anis secara *in vitro* dengan teknik kultur jaringan dapat dipacu dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Salah satunya adalah sitokinin. Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan untuk memacu inisiasi dan proliferasi tunas. Di dalam

jaringan tanaman, sitokinin berperan dalam proses pembelahan sel dan morfogenesis (GUNAWAN, 1988). Di antara beberapa jenis sitokinin yang sering digunakan di dalam kultur jaringan, aktivitas sitokinin tipe urea lebih kuat dibandingkan tipe purin atau adenin (HUETTEMAN dan PREECE, 1993).

Penggunaan tipe urea sitokinin seperti thidiazuron atau TDZ (*N*-phenil-*N'*-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) sebagai substitusi BAP (6-benzylaminopurin), terbukti meningkatkan kapasitas pembentukan tunas pada anggrek bulan (CHEN dan PILUEK, 1995). BAP merupakan salah satu jenis sitokinin yang sering digunakan dalam kultur jaringan. BAP merupakan turunan adenin yang disubstitusi pada posisi 6 yang bersifat paling aktif (WATTIMENA, 1988). Oleh karena itu, untuk menghasilkan jumlah tunas maksimum, penentuan jenis zat pengatur tumbuh dengan kombinasi metode pengkulturan merupakan salah satu kunci penting dalam kultur jaringan. Studi perbanyakan anis secara *in vitro* melalui kultur jaringan masih sangat terbatas.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan media yang tepat untuk menginduksi tunas optimal dengan penambahan sitokinin sintetik tipe urea (TDZ) atau tipe purin (BAP). Respon tanaman terhadap pemberian BAP dan TDZ pada berbagai konsentrasi dipelajari melalui tingkat pertumbuhan dan penampakan tanaman, baik pada tahap awal inisiasi maupun multiplikasi, serta mempelajari sinergisme yang terjadi antara BAP dan TDZ.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan September 2002 sampai dengan Januari 2003, di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Plasma Nutfah dan Pemuliaan, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO), Jalan Tentara Pelajar 3, Cimanggu, Bogor.

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap satu faktor, dengan 6 ulangan. Pada tahap inisiasi, terdapat 12 perlakuan yaitu pemberian sitokinin (BAP atau TDZ) dengan enam taraf konsentrasi (0,1 mg/l; 0,2 mg/l; 0,3 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l; 3 mg/l). Sedangkan pada tahap proliferasi terdapat 4 perlakuan yaitu pemberian sitokinin (BAP atau TDZ) dengan dua taraf konsentrasi (0,3 mg/l dan 3 mg/l).

Bahan tanaman (eksplan) yang digunakan adalah tunas pucuk dari kecambah aseptik berukuran panjang ± 1 cm, berumur 2 minggu setelah semai.

Inisiasi Tunas

Tunas pucuk dari kecambah yang berumur 2 minggu dengan 2 helai daun pertama, berukuran ± 1 cm, dikulturkan di dalam media perlakuan. Tunas diinduksi di dalam media MS padat (0,8% agar) dengan penambahan BAP (0,1 mg/l; 0,2 mg/l; 0,3 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l; 3 mg/l),

atau TDZ dengan kisaran konsentrasi yang sama. Selanjutnya tanaman diinkubasi di ruang kultur dengan suhu 16-18 °C pada kondisi pencahayaan ± 2000 lux, selama 24 jam.

Setelah ± 5 minggu dikulturkan, tunas terbanyak dari media perlakuan tersebut di atas disubkultur ke dalam media multiplikasi untuk mengetahui sinergisme antara BAP dengan TDZ atau sebaliknya.

Multiplikasi Tunas

Pada tahap ini, tunas terbanyak yang diperoleh dari media inisiasi yang diperkaya dengan BAP 3 mg/l dipisahkan dan dibagi dua bagian. Setengah bagian disubkultur kedalam media MS dengan penambahan TDZ pada konsentrasi 3 mg/l dan setengah bagiannya dipindahkan kedalam media MS dengan penambahan TDZ pada konsentrasi 0,3 mg/l. Begitu pula tunas terbanyak yang diperoleh dari media inisiasi yang diperkaya dengan TDZ 3 mg/l, setengahnya disubkultur kedalam media MS dengan penambahan BAP konsentrasi 3 mg/l dan sisanya kedalam media MS dengan penambahan BAP konsentrasi 0,3 mg/l.

Parameter yang diamati adalah data kualitatif dan kuantitatif baik pada tahap inisiasi maupun multiplikasi, seperti (1) tinggi tunas, (2) jumlah daun, (3) jumlah tunas, (4) persentase tunas berakar, (5) panjang akar, (6) laju pertumbuhan tunas, dan daun, serta (7) visual (penampakan) tunas dan akar. Data kuantitatif yang diperoleh dianalisis menggunakan program SAS (*Statistical Analysis System*) prosedur GLM (*General Linear Model*) dengan uji beda lanjut DUNCAN (DMRT) dan uji Kontras pada tingkat kepercayaan 95% ($p \leq 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inisiasi Tunas

Tunas pucuk dari kecambah yang berumur 2 minggu, menunjukkan respon yang berbeda terhadap media tumbuh yang digunakan. Perbedaan respon pertumbuhan eksplan terhadap media kultur pada minggu ke-5 dapat dilihat pada Tabel 1. Eksplan yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan BAP menghasilkan ukuran tunas baru yang lebih tinggi (4,10-5,88 cm) serta berbeda nyata dengan eksplan yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan TDZ (3,56-4,98 cm), pada uji Kontras ($p_{0,05}$); (Tabel 1). Peningkatan konsentrasi TDZ di dalam media menghasilkan tunas yang semakin pendek. Keadaan seperti ini juga diperlihatkan pada kultur *Pinus strobus* L., dengan menggunakan TDZ jumlah tunas adventif meningkat tetapi tinggi tunasnya semakin pendek dengan meningkatnya konsentrasi TDZ di dalam media

(PIJUT *et al.*, 1991 dalam HUETTEMAN dan PREECE, 1993). Diduga, penambahan TDZ dapat memacu produksi etilen endogen tanaman (SUTTLE, 1985 dalam LU, 1993). Etilen berpengaruh dalam menghambat pemanjangan batang, terutama pada tanaman dikotil (SALISBURY dan ROSS, 1998). Selain itu, SARWAR *et al.* (1998) melaporkan bahwa penambahan BAP menghasilkan pemanjangan batang yang lebih baik pada apel (*Malus x domestica* Borkh.) *in vitro* dibandingkan penambahan TDZ ataupun 2iP (2-isopenteniladenin).

Eksplan yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan TDZ menghasilkan jumlah tunas baru 3,62-6,28, sedangkan eksplan yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan BAP menghasilkan 1,86-2,78 tunas. Hasil ini berbeda nyata pada uji Kontras ($p_{0.05}$) dan memperkuat asumsi bahwa media yang diperkaya dengan TDZ menghasilkan jumlah tunas baru yang lebih banyak dibandingkan media yang diperkaya dengan BAP. Konsentrasi optimum TDZ untuk menghasilkan tunas terbanyak adalah 3 mg/l (Tabel 1). Tunas anis yang terbentuk di dalam media baik yang diperkaya BAP ataupun TDZ adalah tunas adventif dan lateral.

TDZ sebagai derivat phenilurea memacu pertumbuhan tunas lebih banyak karena TDZ memiliki struktur kimia lebih stabil (HUETTEMAN dan PREECE, 1993) serta aktivitas biologi yang lebih tinggi dibandingkan dengan BAP (MOK dan MOK, 1987). Hal ini didukung pada uji biologi kultur akar brokoli [*Brassica oleraceae* L. (Italica Group)] dalam hal multiplikasi (MOK dan MOK, 1987). Sedangkan pada apel (*Malus domestica*) aktivitas TDZ diperlihatkan dalam bentuk stimulasi pemecahan dormansi bakal tunas. Selain itu, TDZ juga menstimulir

organogenesis pada kultur protoplas mesofil *Populus* sp. (MOK dan MOK, 1987; RUSSEL dan MCCOWN, 1988 dalam HUETTEMAN dan PREECE, 1993). Hasil yang sama terjadi pula pada uji biologi kultur anyelir yang dilakukan LU (1993), di mana penambahan TDZ menghasilkan persentase dan rata-rata tunas lebih banyak, dibandingkan penambahan BAP. LU (1993) juga melaporkan bahwa pada kultur reseptakel mawar dengan perlakuan berbagai konsentrasi BAP tidak menghasilkan tunas adventif, sedangkan aplikasi TDZ meningkatkan persentase eksplan bertunas sebesar 25% dengan rata-rata 2,5 tunas/eksplan.

Aktivitas biologi TDZ yang tinggi dapat dilihat dari laju pertumbuhan tunas selama proses inisiasi berlangsung. Eksplan yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan TDZ laju pertumbuhannya lebih tinggi, dibandingkan dengan eksplan yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan BAP (Gambar 1). Hal ini terjadi karena TDZ lebih stabil, sehingga didegradasi lebih lambat dibandingkan BAP. TDZ juga dapat mengaktifkan biosintesis sitokinin endogen tipe purin, serta mempengaruhi metabolismenya yang mengakibatkan respon ganda terhadap eksplan, akibatnya jumlah tunas baru yang dihasilkan akan lebih banyak dibandingkan di dalam media yang diperkaya dengan BAP (MOK dan MOK, 1987). Hal ini telah diuji pada kalus kedelai [*Glycine max* (L) Merr.] dan *Phaseolus lunatus* L. yang ditumbuhkan di dalam media dengan penambahan TDZ dalam 2 taraf, di mana aktivitas sitokinin endogen lebih tinggi pada media dengan pemberian TDZ 1 mg/l, dibandingkan dengan TDZ 0,1 mg/l (MOK dan MOK, 1985; HUETTEMAN dan PREECE, 1993).

Berdasarkan data pertumbuhan dan uji Kontras (Tabel 1), jumlah daun dari tunas anis yang dikulturkan di

Tabel 1. Rerata tinggi tunas, jumlah daun, jumlah tunas, persentase tunas berakar, serta panjang akar anis di dalam media kultur yang diperkaya dengan BAP atau TDZ pada berbagai konsentrasi, pada umur 5 minggu tahap inisiasi

Table 1. Average shoot height, number of leaves and shoots, percentage of rooted-shoots and length of root of Anise on culture media supplemented with various concentrations of BAP or TDZ, 5 weeks of initiation stage

Perlakuan Treatments	Tinggi tunas Shoots height (cm)	Jumlah daun No. of leaf	Jumlah tunas No. of shoots	Persentase tunas berakar # Percentage of rooted-shoot	Panjang akar ## Root length (cm)
MS+TDZ 3 mg/l	3,56 d	13,14 bcd	6,28 a	0,07	0,87
MS+TDZ 2 mg/l	3,70 cd	10,48 cdef	4,05 bcd	0,12	1,04
MS+TDZ 1 mg/l	3,86 bcd	14,54 abc	4,56 abcd	0,06	0,77
MS+TDZ 0,3 mg/l	4,28 bcd	17,82 a	5,58 ab	0,07	0,77
MS+TDZ 0,2 mg/l	4,88 abc	14,78 ab	4,78 abc	0,01	0,71
MS+TDZ 0,1 mg/l	4,98 ab	12,80 bcde	3,62 cde	0,01	0,71
MS+BAP 3 mg/l	4,93 ab	9,26 def	2,78 de	0,27	1,05
MS+BAP 2 mg/l	4,98 ab	8,88 def	2,00 e	0,37	1,16
MS+BAP 1 mg/l	4,10 bcd	7,28 f	2,00 e	0,35	1,05
MS+BAP 0,3 mg/l	5,57 a	9,50 def	1,86 e	0,14	0,92
MS+BAP 0,2 mg/l	5,68 a	8,54 ef	2,00 e	0,17	0,93
MS+BAP 0,1 mg/l	5,88 a	8,82 ef	2,00 e	0,31	0,97
Kontras (BAP vs TDZ)	*	*	*		

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama tidak nyata menurut uji Duncan pada taraf 5%

Notes : Numbers followed by the same letters within each column are not significantly different according to 5% DMRT

Data ditransformasi ke dalam bentuk arcsin Y dan ## $(Y+0.5)^{1/2}$

Arcsin Y-transformed data and ## $(Y+0.5)^{1/2}$ -transformed data

• Perlakuan BAP dan TDZ berbeda nyata menurut uji kontras pada taraf 5%

• BAP and TDZ treatments are significantly different according to 5% contrast test

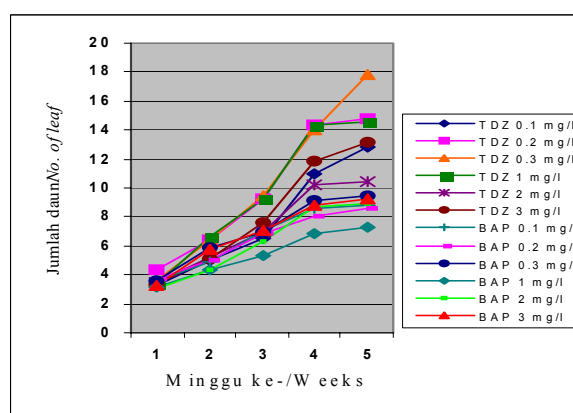
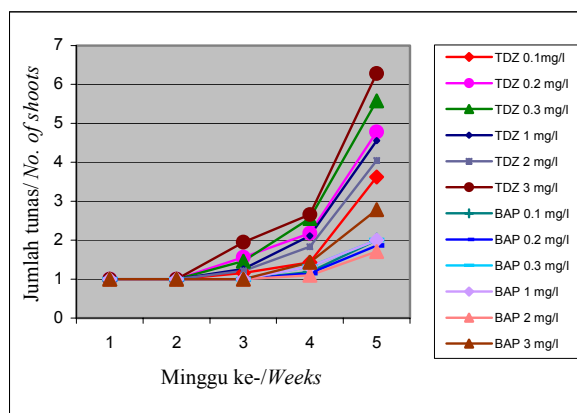
dalam media yang diperkaya dengan TDZ lebih banyak (10,48-17,82) dibandingkan pada media yang diperkaya BAP (7,28-9,26). Hasil ini berbeda nyata pada uji Kontras ($p_{0.05}$). Konsentrasi optimum TDZ untuk menghasilkan daun terbanyak adalah 0,3 mg/l. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan jumlah daun sebanding dengan pertumbuhan jumlah tunas, di mana meningkatnya jumlah daun seperti halnya jumlah tunas dipengaruhi oleh penambahan TDZ ke dalam media kultur, karena TDZ lebih resisten dan lebih lambat didegradasi oleh sitokinin oksidase daripada BAP (MOK dan MOK, 1985). Oleh karena itu, efek TDZ di dalam jaringan tanaman lebih panjang. Hal ini bisa dilihat dari laju pertumbuhan jumlah daun selama proses inisiasi berlangsung (Gambar 1).

Eksplan yang ditanam di dalam media yang diperkaya dengan TDZ, jumlah tunas dan daunnya masih menunjukkan kecenderungan untuk tumbuh dan bertambah, sedangkan di dalam media yang diperkaya BAP menunjukkan pertumbuhan yang lebih rendah atau mendekati stasioner (Gambar 1).

Di dalam penelitian ini sitokinin diaplikasikan untuk mendorong pertumbuhan tunas, tetapi 20,56% tunas berakar. Hal ini terjadi karena sumber eksplan yang berupa tunas pucuk, kaya akan auksin endogen yang mampu memacu inisiasi atau pertumbuhan awal akar (SALISBURY dan ROSS, 1998). Inisiasi akar mulai terjadi pada minggu ke dua hingga ke tiga dari kultur anis. Berdasarkan sidik ragam, penambahan sitokinin baik BAP maupun TDZ pada berbagai konsentrasi tidak berpengaruh nyata terhadap persentase tunas berakar dan panjang akar. Namun, secara umum terlihat penambahan BAP ke dalam media menghasilkan persentase tunas berakar lebih tinggi (25-44,4%) dibandingkan TDZ (0-11,1%) (Tabel 1). Hal yang sama juga terjadi pada kultur *Vitis rotundifolia* di mana pada media yang mengandung 0,5 μ M TDZ, akar diinduksi

sebesar 8% sedangkan pada media yang mengandung 5 μ M BAP 34% (HUETTEMAN dan PREECE, 1993). Begitu pula halnya untuk panjang akar, media yang ditambahkan BAP menghasilkan akar anis yang lebih panjang (0,36 – 0,85 cm) dibandingkan media yang ditambahkan TDZ (0-0,26 cm) (Tabel 1). Diduga penambahan TDZ dapat memacu produksi etilen endogen tanaman (SUTTLE, 1985 dalam LU, 1993), karena selain menghambat pemanjangan batang pengaruh etilen juga menghambat pemanjangan akar (SALISBURY dan ROSS, 1998).

Penampakan visual tunas anis di dalam media yang diperkaya dengan TDZ secara umum bertunas banyak dengan pertumbuhan yang serempak, roset, dengan ukuran batang besar, daun banyak, berwarna hijau kekuningan, akar sedikit, lebih tebal dan kecokelatan. Sedangkan tanaman yang ditumbuhkan di dalam media yang diperkaya dengan BAP, daun berwarna hijau tua, batang tinggi dan kurus, bahkan pada minggu ke-3 batang saling membelit satu sama lain karena keadaan batang yang lemah, kurus tetapi tetap terjadi pemanjangan batang dengan jumlah tunas sedikit, berakar banyak dengan diameter kecil, dan berwarna putih. Selain itu, tunas yang ditumbuhkan di dalam media yang diperkaya dengan BAP cenderung beruas dengan rata-rata 2 ruas per eksplan, sedangkan pertumbuhan tunas baru tanpa atau dengan ruas yang pendek, bahkan cenderung roset (Gambar 2). Penampakan tunas roset akibat penambahan TDZ ke dalam media, secara umum dapat ditemukan pada kultur tanaman berkayu seperti *Cercis canadensis* var. *alba* L., *Hibiscus rosa-sinensis* L, Apel Gala, *Populus* sp. dan *Quercus robur* L. (HUETTEMAN dan PREECE, 1993). Selain itu gejala fisiologis sering ditemukan pada tunas yang ditumbuhkan di dalam media yang diperkaya dengan TDZ (GRIBAUDO dan FRONDA, 1991 dalam HUETTEMAN dan PREECE, 1993).



Gambar 1. Laju pertumbuhan jumlah tunas (kiri) dan daun (kanan) anis pada minggu ke-1 hingga ke-5 di dalam media MS padat yang diperkaya berbagai konsentrasi BAP atau TDZ pada tahap inisiasi

Figure 1. The growth-rate of Anise shoots (left) and leaves (right) on MS-agar solidified media supplemented with various concentrations of BAP or TDZ, at first to 5 weeks of initiation stage

Gejala tersebut ditemukan pada tunas anis yang ditumbuhkan di dalam media yang diperkaya dengan TDZ 3 mg/l dan ditandai dengan pucuk yang berwarna hijau muda, daun dan batang agak transparan, dan rapuh sebagai akibat kurangnya lignin. Sedangkan penampakan visual daun anis yang ditumbuhkan di dalam media yang diperkaya dengan BAP berwarna hijau lebih tua dengan jumlah daun yang lebih sedikit dibandingkan daun dari tunas di dalam media yang diperkaya dengan TDZ.

Multiplikasi Tunas

Untuk meningkatkan jumlah tunas anis, dilakukan subkultur ke dalam media baru. Penggunaan sitokinin yang berbeda, telah dilakukan pada kultur apel (*Malus domestica*), pear (*Pyrus communis* L.), *Populus* sp. dan *Rhododendron* dengan hasil peningkatan jumlah tunas (HUETTEMAN dan PREECE, 1993; NIELSEN *et al.*, 1995).

Di dalam penelitian ini, tunas yang berasal dari media yang diperkaya dengan TDZ 3 mg/l disubkultur ke dalam media yang diperkaya dengan BAP 3 mg/l atau 0,3 mg/l. Sebaliknya tunas dari media yang diperkaya dengan BAP 3 mg/l disubkultur ke dalam media yang diperkaya dengan TDZ 3 mg/l atau 0,3 mg/l. Media yang diperkaya dengan TDZ atau BAP 3 mg/l merupakan media inisiasi yang menghasilkan tunas terbanyak.

Berdasarkan Tabel 2 dan uji Kontras ($p_{0,05}$) proliferasi tunas yang berasal dari media yang diperkaya dengan TDZ 3 mg/l, di dalam media subkultur yang diperkaya dengan BAP dihasilkan jumlah tunas lebih banyak yaitu 5,87 dan 6,91 tunas per eksplan dan berbeda nyata dibandingkan tunas yang berasal dari media dengan BAP 3 mg/l dan disubkultur ke dalam media yang diperkaya TDZ yaitu 3,41 dan 3,59 tunas.



Gambar 2. Pertumbuhan tunas anis di dalam media MS yang diperkaya dengan TDZ yang beruas pendek (A) dan beruas panjang di dalam media MS yang diperkaya dengan BAP (B)

Figure 2. The growth of anise shoots on MS media supplemented with TDZ showing shorter-shoots (A) and longer shoots on MS media supplemented with BAP (B)

Tabel 2. Jumlah tunas anis di dalam media subkultur yang diperkaya dengan berbagai konsentrasi BAP atau TDZ pada minggu ke-1 hingga minggu ke-3 tahap multiplikasi

Table 2. Number of anise shoots on subculture media supplemented with various concentrations of BAP or TDZ, at first to 3 weeks of multiplication stage

Perlakuan Treatments (mg/l)	Jumlah tunas minggu ke- Number of shoots, weeks		
	1	2	3
TDZ 3-BAP 0,3	2,75 a	4,12 ab	5,87 b
TDZ 3-BAP 3	3,39 a	4,68 a	6,91 a
BAP 3-TDZ 0,3	1,92 b	2,87 bc	3,41 c
BAP 3-TDZ 3	1,78 b	3,31 c	3,59 c
Kontras TDZ –BAP vs BAP-TDZ			*

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama tidak nyata menurut uji Duncan pada taraf 5%

Note : Numbers followed by the same letters within each column are not significantly different according to 5% DMRT

* Berbeda nyata pada uji Kontras taraf 5%
Significant at 5% Contrast test

Hasil pengamatan menunjukkan, jumlah daun terbanyak pada minggu ke-3 tahap multiplikasi diperoleh pada tunas yang berasal dari media yang diperkaya dengan TDZ 3 mg/l dan disubkultur ke dalam media yang diperkaya dengan BAP (17,28 dan 21,11) serta berbeda nyata dengan daun yang diperoleh dari media yang diperkaya dengan BAP 3 mg/l dan disubkultur ke dalam media yang diperkaya dengan TDZ (13,45 dan 15,71) pada uji Kontras $p_{0,05}$ (Tabel 3).

Penampakan visual daun dari tunas yang disubkultur dari media yang diperkaya dengan TDZ ke dalam media yang diperkaya dengan BAP warnanya lebih hijau dengan ukuran yang lebih kecil dan warna batang hijau. Sementara daun dari tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan BAP dan disubkultur ke dalam media yang diperkaya dengan TDZ, berwarna hijau muda, berukuran sedang dan batang kehijauan atau transparan.

Tabel 3. Jumlah daun anis di dalam media subkultur yang diperkaya dengan berbagai konsentrasi BAP atau TDZ pada minggu ke-1 hingga minggu ke-3 tahap multiplikasi

Table 3. Number of anise leaves on subculture media supplemented with various concentrations of BAP or TDZ, at first to 3 weeks of multiplication stage

Perlakuan Treatments	Jumlah daun minggu ke- Number of leaves, weeks		
(mg/l)	1	2	3
TDZ 3-BAP 0,3	12,00 a	18,27 a	21,11 a
TDZ 3-BAP 3	10,64 a	14,74 b	17,28 ab
BAP 3-TDZ 0,3	6,77 b	12,09 bc	15,71 b
BAP 3-TDZ 3	7,08 b	9,18 c	13,45 b
Kontras	*		
TDZ –BAP vs BAP-TDZ			

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 5%

Note : Numbers followed by the same letters within each column are significantly different according to 5% DMRT

* Berbeda nyata pada uji kontras taraf 5%

Significant at 5% contrast test

Pada perlakuan ini ditemukan gejala vitrifikasi yang disertai penyebaran klorofil yang tidak merata. Gejala ini meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi TDZ, sama seperti pada tahap inisiasi.

Pengamatan pada minggu ke-3 terlihat bahwa tunas tertinggi diperoleh pada tunas yang berasal dari media yang diperkaya dengan BAP dan disubkultur ke dalam media yang diperkaya dengan TDZ 0,3 mg/l yaitu 4,22 cm serta berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (Tabel 4).

Proses subkultur tunas anis ke dalam media yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh yang berbeda, memberikan efek peningkatan laju pertumbuhan tunas dan daun. Seperti terlihat pada Gambar 3, tunas yang berasal dari media inisiasi dengan penambahan TDZ 3 mg/l menghasilkan tunas dan daun terbanyak ketika disubkultur ke dalam media yang diperkaya dengan BAP. Hal ini terjadi karena efek berlanjut dari TDZ yang memiliki

struktur lebih stabil daripada BAP, sehingga lebih resisten dan lebih lambat didegradasi oleh sitokinin oksidase (MOK dan MOK, 1987). Selain itu karena strukturnya yang stabil, TDZ bertahan lebih lama di dalam jaringan tanaman sehingga tetap terekspresi walaupun telah dipindahkan pada media baru yang tidak mengandung TDZ. Hasil yang sama terjadi pada kultur *Acer x fremanii*, *Fraxinus americana*, *Pyrus communis* L. dan *Vitis rotundifolia*, karena tunas dari media yang diperkaya dengan TDZ setelah disubkultur ke dalam media yang mengandung BAP meningkatkan jumlah tunas aksilar (HUETTEMAN dan PREECE, 1993). PREECE dan IMEL, (1991) juga melaporkan bahwa penggunaan media inisiasi yang mengandung TDZ untuk menginduksi tunas adventif, diikuti dengan subkultur ke dalam media kedua yang mengandung sitokinin jenis lain meningkatkan jumlah tunas adventif pada kultur hibrid *Rhododendron*.

Tabel 4. Tinggi tunas anis di dalam media subkultur yang diperkaya dengan berbagai konsentrasi BAP atau TDZ pada minggu ke-1 hingga minggu ke-3 tahap multiplikasi

Table 4. Length of anise shoots on subculture media supplemented with various concentrations of BAP or TDZ, at first to 3 weeks of multiplication stage

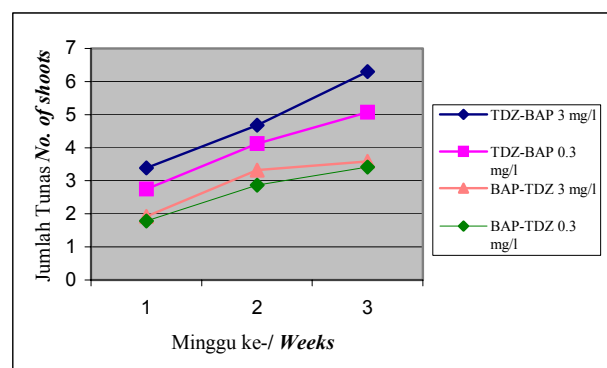
Perlakuan Treatments	Tinggi tunas (cm) minggu ke- Shoots height (cm), weeks		
(mg/l)	1	2	3
TDZ 3-BAP 0,3	1,85 a	2,85 b	3,47 b
TDZ 3-BAP 3	1,57 a	2,51 b	3,12 b
BAP 3-TDZ 0,3	1,86 a	3,81 a	4,22 a
BAP 3-TDZ 3	1,81 a	2,52 b	3,26 b
Kontras	*		
TDZ –BAP vs BAP-TDZ			

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 5%

Notes : Numbers followed by the same letters within each column are not significantly different according to 5% DMRT

* Berbeda nyata pada uji kontras taraf 5%

Significant at 5% contrast test



Gambar 3. Laju pertumbuhan jumlah tunas (kiri) dan daun (kanan) anis pada media subkultur yang diperkaya BAP atau TDZ dengan konsentrasi 0,3 mg/l dan 3 mg/l, minggu ke-3 tahap multiplikasi

Figure 3. The growth-rate of Anise shoots (left) and leaves (right) on MS-agar solidified media supplemented with 0.3 and 3.0 mg/l of BAP or TDZ, at 3 weeks of multiplication stage

Dari penelitian ini terlihat, penambahan TDZ pada tahap inisiasi lebih berperan di dalam meningkatkan jumlah tunas pada tahap multiplikasi.

Penampakan visual tunas yang disubkultur dari media yang diperkaya dengan TDZ ke dalam media yang diperkaya dengan BAP membentuk tunas roset dan rimbun dengan daun yang berwarna hijau dan normal. Sedangkan tunas yang disubkultur dari media yang diperkaya dengan BAP ke dalam media yang diperkaya dengan TDZ tunasnya lebih tinggi, dengan daun lebih jarang dan berwarna hijau muda, kadang-kadang disertai gejala vitrifikasi. Diduga, respon dari akumulasi TDZ yang berasal dari tahap inisiasi terlihat pada peubah yang bersifat kuantitatif (pertambahan jumlah tunas), sedangkan BAP pada peubah yang bersifat kualitatif (penampakan visual tunas).

KESIMPULAN

Thidiazuron (TDZ), sitokinin sintetik tipe urea, menginduksi inisiasi tunas lebih cepat dan memacu pertambahan jumlah daun dan tunas lebih baik dibandingkan sitokinin sintetik tipe purin Benzil Amino Purin (BAP). Sedangkan BAP lebih memacu pertumbuhan tinggi tunas pada tahap inisiasi kultur anis. Induksi tunas optimal (6,28 tunas) pada tahap inisiasi terjadi pada media yang diperkaya dengan TDZ 3 mg/l.

Subkultur anis dari media awal yang diperkaya dengan TDZ ke dalam media yang diperkaya dengan BAP meningkatkan jumlah tunas, daun dan memperbaiki visual tunas.

Induksi tunas optimal (6,91 tunas) pada tahap proliferasi terjadi pada media yang diperkaya TDZ dan disubkultur ke dalam BAP 3 mg/l.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Saudari Ari Wigayati serta semua pihak yang telah berpartisipasi dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan naskah.

DAFTAR PUSTAKA

- CHEN Y, PILUEK CH. 1995. Effects of thidiazuron and *N*-6 benzilaminopurine on shoot regeneration of *Phalaecopsis*. *Plant Growth Regulation* 16: 99-101.
- GUENTHER E. 1990. Minyak Atsiri. Jilid IV B. Ketaren S dan Mulyono RJ, penerjemah. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. p.621-753.
- GUNAWAN LW. 1988. Teknik Kultur Jaringan. IPB. Bogor. 252p.
- HUETTEMAN CA and PREECE IA. 1993. Thidiazuron : a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.
- KATZER G. 1998. Anis (*Pimpinella anisum* L.) www.ang.kfuningraj.ac.at.
- LU CJ. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29 :92-96.
- MOK MC and MOK DW. 1985. The metabolism of [¹⁴C]-thidiazuron in callus cultures of *Phaseolus lunatus*. *Physiol Plants*. 65: 427-432.
- MOK MC and MOK DW. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenilurea derivates in tissue culture systems. *Horticulture Science* 22 (6):1194-1201.
- NIELSEN JM , HANSEN J, BRANDT K. 1995. Synergism of thidiazuron and benzyladenin in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus X ogiformis* 'Giganteus'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 41:165-170.
- PREECE JE and IMEL MR. 1991. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'PJM. Hybrids'. *Science Hort.* 48: 159-170.
- SALISBURY F. B FRANK dan ROSS CW. 1998. Fisiologi Tumbuhan. Jilid 3. Penerbit ITB Bandung. Bandung. 343p.
- SARWAR M, SKIRVIN M, KUSHAD and M. A. NORTON. 1998. Selecting dwarf apple (*Malus x domestica* Borkh.) trees *in vitro* : multiple cytokinin tolerance expressed among three strains of 'McIntosh' that differ in their growth habit under field conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54: 71-76.
- WATTIMENA GA. 1988. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. 247p.