

Perbanyak Anyelir Secara In Vitro Melalui Induksi Pembentukan Tunas Adventif

Winarto, B¹., M.A. Aziz², A.A. Rashid², dan M.R. Ismail²

¹Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln Raya Ciherang-Pacet, Cianjur 43253

²Department of Crop Science, Faculty of Agriculture, Universiti Putra Malaysia, Malaysia.

Naskah diterima tanggal 27 Februari 2004 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 19 Oktober 2004

ABSTRAK. Perbanyak anyelir secara in vitro melalui induksi pembentukan tunas adventif sangat potensial untuk produksi masal bahan tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan teknik perbanyakan secara in vitro yang sesuai untuk *D. caryophyllus* L. cv. Maldives melalui pembentukan tunas adventif, penggandaan tunas, pengakaran, dan aklimisasinya. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, dan rumahkaca IPPT, UPM, Malaysia dari bulan Mei 2000 hingga November 2001. Tiga jenis eksplan (daun muda pertama, kedua, dan internodus muda) dan media MS dengan lima konsentrasi BA dan NAA yang berbeda (2,0 mg/l + 0,9 mg/l, 0,9 mg/l + 0,3 mg/l, 3,0 mg/l + 0,9 mg/l, 0,1 mg/l BA + 0,1 mg/l, dan 0,1 mg/l + 0,01 mg/l) diseleksi, diikuti dengan perbanyakan tunas pada media terseleksi, pengakaran dan diaklimatisasi pada media yang berbeda. Percobaan menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial dengan empat ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun muda pertama yang berkembang penuh dan media MS yang mengandung 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA merupakan eksplan dan konsentrasi hormon yang sesuai untuk induksi pembentukan tunas adventif. Konsentrasi tersebut juga sesuai untuk mempersiapkan tunas yang diakarkan. Tunas mudah diakarkan pada media setengah MS. Plantlet mudah diaklimatisasikan pada media campuran antara humus dan arang sekam (1:1 v/v) dengan ketahanan hidup hingga 100%. Media tersebut juga menghasilkan plantlet yang vigor dan tumbuh cepat. Abnormalitas tanaman adalah 6% dari total plantlet yang diaklimatisasikan. Tanaman berbunga pada 4,5 hingga 5 bulan setelah aklimatisasi. Hasil studi ini diharapkan dapat digunakan sebagai salah satu acuan dalam perbanyakan masal anyelir melalui induksi tunas adventif.

Kata kunci: *Dianthus caryophyllus*; Perbanyakan in vitro; Induksi tunas adventif

ABSTRACT. Winarto, B., M.A. Aziz, A.A. Rashid, and M.R. Ismail. 2005. In vitro propagation of carnation through induction of adventitious shoot formation. The technique has an important role in mass production of planting material. The objective of this study was to obtain suitable in vitro propagation of *D. caryophyllus* L. cv. Maldives through induction of adventitious shoot formation, followed by multiplication of shoots, rooting and acclimatization. The study was conducted at Tissue Culture Laboratory and Glasshouse of IPPT, UPM, Malaysia from Mei 2000 to November 2001. Three different types of explant (first and second young fully developed leaves and young internodus) and MS medium at five different concentrations of BA and NAA (2.0 mg/l + 0.9 mg/l, 0.9 mg/l + 0.3 mg/l, 3.0 mg/l + 0.9 mg/l, 0.1 mg/l + 0.1 mg/l and 0.1 mg/l + 0.01 mg/l) were selected, shoots obtained from the system were multiplied, rooted and acclimatized in different media. Factorial experiment was arranged in randomized complete block design with four replications. Results of the experiment exhibited that the first young fully developed leaves and MS medium containing 0.1 mg/l BA and 0.01 mg/l NAA was the appropriate explant and concentration of BA and NAA to produce highest numbers of adventitious shoot. The concentration of BA and NAA was also suitable for preparing rooted shoots. Shoots were easily rooted on half-strength of MS media. Plantlets were simply acclimatized in a mixture medium of kossas peat and paddy charcoal (1:1 v/v) with 100% of survivability. Vigorous and healthy plantlets were also resulted in the medium. Abnormality of plants was 6% from total acclimatized-plantlets. The plantlets flowered at 4.5 to 5 months after acclimatization. The results expected can be used as a standard protocol in mass-production of carnation through adventitious shoot formation.

Keywords: *Dianthus caryophyllus*; In vitro propagation; Adventitious shoot induction

Perbanyakan anyelir secara in vitro melalui pembentukan tunas adventif telah dilaporkan dapat diinduksi dari eksplan yang berbeda, seperti hipokotil, petal, daun, internodus, nodus batang, kalik, akar, dan lain-lain (Frey & Janick 1991; van Altvorst *et al.* 1992; 1994; Messegueur *et al.* 1993; Nakano *et al.* 1994). Kedudukan dan kondisi eksplan pada tanaman donor yang diambil dan digunakan dalam kultur jaringan

anyelir sangat penting artinya untuk mendapatkan tunas adventif yang maksimal. Eksplan yang lebih muda (meristematis) umumnya memberikan respons yang terbaik (van Altvorst *et al.* 1992; 1994; Nakano *et al.* 1994). Dilaporkan juga bahwa setiap kultivar memiliki kemampuan membentuk tunas adventif yang berbeda (van Altvorst *et al.* 1992; Nakano *et al.* 1994).

Beberapa penelitian melaporkan keberhasilan induksi tunas adventif pada anyelir di antaranya adalah van Altvorst *et al.* (1992) menggunakan media MS yang mengandung 0,9 mg/l 6-benzyladenine (BA) dan 0,3 mg/l -naphthalene acetic acid (NAA) untuk menginduksi tunas adventif dari eksplan daun. Respons eksplan tersebut ditingkatkan melalui seleksi, pemotongan secara memanjang dan pelukaan permukaan dengan pisau kultur (van Altvorst *et al.* 1994). Messeguer *et al.* (1993) menggunakan media MS yang mengandung 0,1 mg/l BA dan 0,1 mg/l NAA, 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA untuk mendapatkan tunas adventif dalam jumlah banyak dari eksplan daun. Dari penelitian-penelitian tersebut dilaporkan bahwa frekuensi regenerasi tunas dapat mencapai 67% dengan 1-12 tunas yang dihasilkan per eksplan. Media yang tepat untuk induksi pembentukan tunas adventif seringkali digunakan untuk media perbanyakan.

Tunas yang dihasilkan secara *in vitro* diinduksi pengakarannya menggunakan media bebas hormon (Earle & Langhans 1975), media $\frac{1}{2}$ MS (Frey & Janick 1991), dan media MS dengan variasi konsentrasi auksin, seperti 1 mg/l NAA dan 2 mg/l IBA (Jain *et al.* 2001), 0,1 mg/l IAA (Roest & Bokelmann 1981), dan 1,0 mg/l BA dan 1,0 mg/l NAA (Messeguer *et al.* 1993). Pembentukan tunas pada media yang tidak mengandung hormon jelas terlihat dan dapat diamati dalam waktu 2 minggu (Earle & Langhans 1975).

Plantlet sehat dengan perakaran yang baik selanjutnya diaklimatisasi ke lingkungan *ex vitro*. Aklimatisasi dapat dilakukan pada berbagai media. Earle & Langhans (1975) melakukan aklimatisasi plantlet pada media Jiffy-Mix, Roest & Bokelmann (1981) menggunakan campuran bahan tanah, van Altvorst *et al.* (1992) menggunakan campuran tanah+humus dan humus-perlite-pasir, Majada *et al.* (1997) menggunakan campuran pasir-perlite dan humus dan Jain *et al.* (2001) menggunakan campuran bahan organik. Terhadap proses tersebut dilaporkan bahwa setiap kultivar memerlukan jenis media aklimatisasi yang berbeda.

Meskipun terdapat beberapa laporan mengenai studi pembentukan tunas adventif, pengakaran dan aklimatisasinya, tetapi informasi

lengkap mengenai perbanyakan anyelir secara *in vitro* melalui induksi pembentukan tunas secara adventif, yang diawali dari kultur aseptik, perbanyakan, pengakaran dan aklimatisasinya belum banyak dilaporkan. Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah perbanyakan anyelir secara *in vitro* melalui induksi tunas adventif secara lengkap akan berhasil dilakukan secara baik dengan memodifikasi media tumbuh dan penggunaan bahan eksplan yang tepat. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan sistem perbanyakan secara *in vitro* melalui induksi pembentukan tunas adventif yang dimulai dari seleksi eksplan dan konsentrasi BA dan NAA, yang diikuti oleh perbanyakan tunas, induksi pembentukan akar dan aklimatisasinya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumahkaca IPPT, Fakultas Pertanian, Universiti Putra Malaysia dari bulan Mei 2000 hingga Februari 2001 yang meliputi empat kegiatan.

Seleksi eksplan dan konsentrasi dari BA dan NAA

Dianthus caryophyllus L. cv. Maldives ditanam dalam polibag (q 20 cm) yang berisi campuran arang sekam dan humus (1:1 v/v) dan ditempatkan di dalam rumahkaca. Tanaman dipertahankan dalam fase vegetatif dan digunakan sebagai sumber eksplan. Eksplan dipanen dari tanaman stok, disterilisasi dengan larutan sabun 5% selama 10 menit, dibilas dengan air mengalir selama 30 menit. Selanjutnya disterilisasi dengan alkohol 70% selama 5 menit, larutan sodium hipoklorit 1% (20% chlorox) selama 10 menit dan larutan sodium hipoklorit 2% (40% chlorox) selama 5 menit, setelah itu dibilas dengan air destilasi 4-5 kali.

Setelah disterilisasi, daun pertama, dan kedua yang telah memanjang diambil dengan hati-hati dari batang. Daun kemudian dipotong secara memanjang menjadi dua bagian, diambil bagian pangkalnya $\pm 0,5$ cm, dilukai dengan pisau kultur dan ditanam dalam media dengan posisi terbalik (van Altvorst *et al.* 1994; Perez-Tornero *et al.*

2000). Setelah daun dipisahkan dari batang, internodus yang muda dipotong dengan panjang 0,3-0,5 mm dan ditanam dengan posisi bagian bawah batang menempel di atas permukaan media (Nakano *et al.* 1994). Semua kultur dipelihara pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ di bawah penyinaran lampu fluoresens 16 jam ($13\text{-}25 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Pada percobaan ini digunakan botol kultur erlenmeyer 100 ml.

Pada percobaan ini diuji dua faktor perlakuan, yaitu tiga jenis eksplan dan lima konsentrasi hormon BA dan NAA pada media MS. Jenis eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda yang pertama dan kedua, serta internodus batang yang muda, sedangkan konsentrasi BA dan NAA (KBN) yang digunakan dalam media dasar MS adalah (1) 2,0 mg/l BA dan 0,9 mg/l NAA (KBN-1), (2) 0,9 mg/l BA dan 0,3 mg/l NAA (van Altvorst *et al.* 1992; KBN-2), (3) 3,0 mg/l BA dan 0,9 mg/l NAA (van Altvorst *et al.* 1995; KBN-3), (4) 0,1 mg/l BA dan 0,1 mg/l NAA (KBN-4), dan (5) 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA (Messeguer *et al.* 1993; KBN-5).

Percobaan disusun sesuai dengan tata letak rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan. Setiap unit perlakuan pada masing-masing ulangan terdiri atas 12 eksplan. Pengamatan dilakukan terhadap persentase regenerasi tunas (PRT, %) dan jumlah tunas per eksplan (JTE) yang dicatat 6 minggu setelah kultur inisiasi.

Penggandaan tunas

Konsentrasi BA dan NAA yang digunakan dalam penggandaan tunas adalah (1) 1,0 mg/l BA dan 0,05 mg/l NAA (konsentrasi yang terseleksi dari percobaan induksi tunas aksiler, MT-1) dan (2) 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA (konsentrasi yang terseleksi dari percobaan induksi pembentukan tunas adventif, MT-2). Total jumlah tunas yang dihasilkan (JTT) sebagai data utama, tinggi tunas (TT, cm) sebagai data pendukung diamati dan dicatat 6 minggu setelah inkubasi, serta 40 nodus dikultur dan disubkultur 6 minggu setelah inkubasi.

Pengakaran

Tunas sehat dengan 2-3 pasang daun (2-2.5 cm) dipotong dan ditanam dalam media

pengakaran. Media induksi akar yang digunakan dalam percobaan ini adalah (1) media MS yang mengandung 1 mg/l NAA (Jain *et al.* 2001; RM-1), (2) media MS yang mengandung 2 mg/l IBA (Jain *et al.* 2001; RM-2), (3) media $\frac{1}{2}$ MS (Frey & Janick 1991; RM-3), (4) media MS dengan 2 mg/l IAA (Modified Roest & Bokelmann 1981; RM-4), dan (5) media MS yang ditambah dengan 1,0 mg/l BA and 0,01 mg/l NAA (RM-5 sebagai kontrol).

Percobaan disusun sesuai rancangan acak lengkap dengan empat ulangan. Setiap unit perlakuan pada masing-masing ulangan berisi 12 tunas. Peubah yang diamati adalah persentase pembentukan akar (PPR %), jumlah akar per tunas (JAT), dan panjang akar (PA cm). Peubah diukur dan dicatat 1 bulan setelah kultur inisiasi.

Aklimatisasi

Tunas berakar yang diperoleh setelah inkubasi selama 20 hari pada media $\frac{1}{2}$ MS diambil secara hati-hati dari botol, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan agar yang melekat pada akar, kemudian direndam dalam larutan Benlate 1% (50% daconil) selama 1 menit. Selanjutnya plantlet ditanam dalam pot plastik untuk semai benih (ukuran 30x60 cm dengan 72 lubang) yang diisi media aklimatisasi yang berbeda, yaitu (1) Jiffy-7 (MA-1), (2) humus (MA-2), (3) humus+pasir (1:1, v/v) (MA-3), (4) humus+tanah (1:1, v/v) (MA-4), (5) humus+arang sekam (1:1, v/v) (MA-5), dan (6) arang sekam (MA-6). Pot plastik selanjutnya ditutup dengan plastik transparan selama 7 hari pertama aklimatisasi. Plantlet diaklimatisasi di ruang inkubasi selama 1 bulan dan dipindahkan ke polibag (q 15 cm) yang berisi media uji yang sama dan dipindahkan ke rumah kaca.

Percobaan ini disusun menurut rancangan acak lengkap dengan empat ulangan. Setiap unit perlakuan pada masing-masing ulangan berisi 12 plantlet. Peubah yang diamati adalah (1) persentase tanaman hidup (PTH %), (2) tinggi tanaman (TT cm), dan (3) jumlah daun per tanaman (JDT) diamati 1 bulan sesudah inkubasi di ruang inkubasi dan $1\frac{1}{2}$ bulan sesudah inkubasi di rumah kaca.

Analisis statistik

Data kuantitatif yang dikumpulkan selama percobaan dianalisis dengan analisis varian

(ANOVA) menggunakan program SAS Window 6.12. Jika terdapat perbedaan nyata antar-perlakuan, dilakukan uji lanjut menggunakan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi eksplan dan konsentrasi BA dan NAA

Tunas adventif jelas terlihat setelah 2 minggu kultur inisiasi. Tunas adventif tumbuh dan bertambah banyak, kadangkala disertai dengan pembentukan akar adventif. Setelah 6 minggu periode inkubasi, eksplan menghasilkan tunas adventif yang jumlahnya berbeda pada tiap eksplan. Eksplan daun muda yang pertama menghasilkan jumlah tunas yang paling banyak yaitu delapan tunas per eksplan, dan jumlah tunas tersebut lebih tinggi dibanding jumlah tunas yang dihasilkan dari sumber eksplan yang lain.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pembentukan tunas adventif dipengaruhi oleh

interaksi eksplan dengan konsentrasi BA dan NAA yang diuji coba dalam percobaan ini. Tabel 1 menunjukkan bahwa daun paling muda pertama yang ditanam dalam media KBN-5 menghasilkan regenerasi tunas adventif tertinggi (37,5%), diikuti oleh eksplan yang ditanam dalam media KBN-4. Kombinasi tersebut juga menghasilkan jumlah tunas per eksplan paling banyak (5,9 tunas) (Tabel 2). Internodus batang muda menghasilkan jumlah tunas paling banyak pada media KBN-3. Hasil ini juga memberikan bukti bahwa eksplan yang lebih muda menunjukkan kemampuan regenerasi lebih tinggi dibanding eksplan lainnya ditunjukkan oleh Gambar 1.

Hasil penelitian ini juga mendukung penelitian-penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa eksplan lebih muda memiliki kemampuan regenerasi untuk membentuk tunas adventif lebih banyak (van Altvorst *et al.* 1994; 1995). Eksplan dalam kondisi ini akan lebih mudah diregenerasi membentuk tunas (van Altvorst *et al.* 1992) dikarenakan kompetensinya yang tinggi untuk membelah dan membentuk

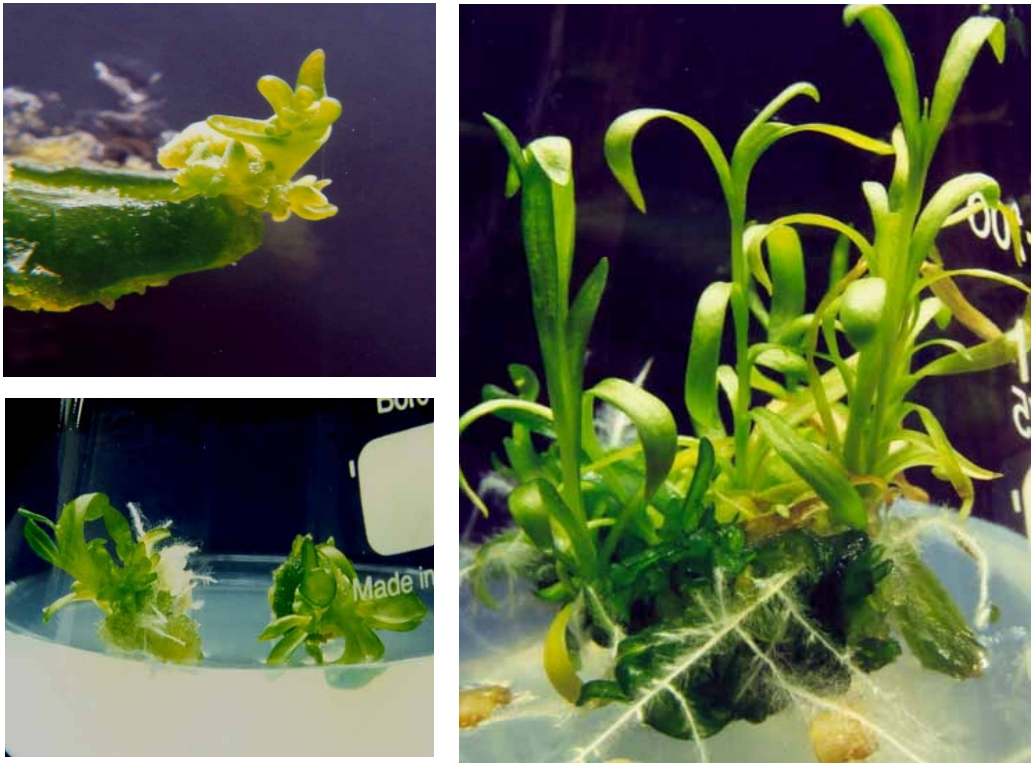
Tabel 1. Pengaruh eksplan dan konsentrasi BA-NAA yang berbeda terhadap persentase regenerasi tunas adventif (*Effect of explants and different concentrations of BA and NAA on adventitious shoot regeneration*)

Konsentrasi BA dan NAA (BA and NAA concentraion)	Persentase regenerasi tunas adventif (Percentage of adventitious shoot regeneration)		
	Daun pertama (1 st leaf)	Daun kedua (2 nd leaf)	Internodus (Internode)
KBN-1	16,68 b	10,43 ab	12,50 a
KBN-2	8,30 b	8,33 ab	8,30 a
KBN-3	16,60 b	4,18 b	6,23 a
KBN-4	35,40 a	16,68 ab	8,33 a
KBN-5	37,53 a	20,85 a	6,23 a
KV (CV), %	6,23	7,61	3,95

KBN-1: MS + 2,0 mg/l BA dan 0,9 mg/l NAA, KBN-2: MS + 0,9 mg/l BA dan 0,3 mg/l NAA, KBN-3: MS + 3,0 mg/l BA dan 0,9 mg/l NAA, KBN-4: MS + 0,1 mg/l BA dan 0,1 mg/l NAA, dan KBN-5: MS + 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA.

Tabel 2. Pengaruh eksplan dan konsentrasi BA-NAA yang berbeda terhadap jumlah tunas per eksplan (*Effect of different explants and concentrations of BA and NAA on number of shoot produced per explant*)

Eksplan (Explants)	Jumlah tunas per eksplan (Number of shoots per explant)				
	KBN-1	KBN-2	KBN-3	KBN-4	KBN-5
Daun pertama (1 st leaf)	2,3 a	2,0 a	2,8 b	3,5 a	5,9 a
Daun kedua (2 nd leaf)	1,6 b	2,6 a	0,4 b	3,1 b	4,9 b
Internodus (Internode)	1,6 b	3,8 a	4,5 a	2,5 b	1,3 b
KV (CV), %	8,63	9,44	12,89	8,39	12,95



Gambar 1. Tunas adventif yang dihasilkan pada eksplan daun muda pertama pada media MS mengandung 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA (*Adventitious shoots produced from the first young fully developed leaf explant on MS media containing 0,1 mg/l BA and 0,01 mg/l NAA*).

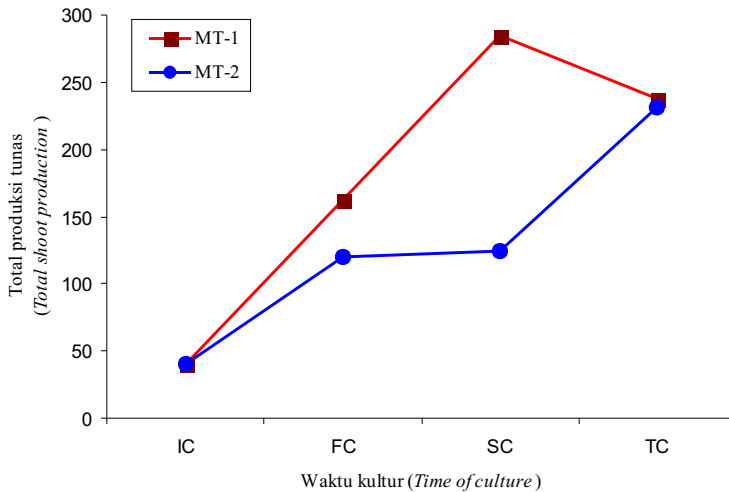
meristem (Cachita-Cosma 1991). Sementara itu, internodus muda walaupun memiliki kemampuan regenerasi tinggi tetapi tunas yang dihasilkan umumnya adalah tunas hiperhidrisitas seperti yang juga dilaporkan oleh Nakano *et al.* (1994) dan van Altvorst *et al.* (1995). Kondisi ini disebabkan oleh pengaruh konsentrasi hormon endogenusnya lebih tinggi (Dantas de Oliveira *et al.* 1998), menyebabkan ketidakseimbangan nisbah sitokinin dengan auksin yang ada di dalam eksplan dan di media.

Daun muda pertama yang regeneratif dari kultivar maldives memiliki kemampuan optimal membentuk tunas adventif pada media MS mengandung konsentrasi BA 0,1 mg/l dan NAA 0,01 mg/l (Messeguer *et al.* 1993). Sedangkan media MS yang mengandung 0,9 mg/l BA dan 0,3 mg/l NAA (van Altvorst *et al.* 1992; 1994) dan 4,0-13,3 M BA dan 1,4-4,8 M NAA (van Altvorst *et al.* 1995) yang sesuai untuk induksi pembentukan tunas pada beberapa klon CPRO

dan beberapa kultivar anyelir tidak sesuai untuk kultivar maldives. Hal ini memberikan bukti bahwa konsentrasi hormon yang sama tidak dapat digunakan untuk semua jenis kultivar. Hasil percobaan ini juga mendukung hasil penelitian Kallak *et al.* (1996).

Penggandaan tunas

Konsentrasi BA dan NAA terseleksi (MT) digunakan dalam penggandaan tunas berpengaruh terhadap produksi tunas kultivar maldives. Eksplan nodus yang dihasilkan dari tunas adventif menghasilkan banyak tunas pada MT-1 dibanding MT-2 (Grafik 1). Pada MT-1 (1,0 mg/l BA dan 0,05 mg/l NAA), setiap nodus menghasilkan 4,1 tunas dari hasil kultur pertama, kemudian meningkat menjadi 7,1 dari hasil kultur kedua, dan menurun 6,0 pada hasil kultur ketiga. Tunas yang dihasilkan memiliki daun hijau dan lebih lebar dengan internodus yang lebih pendek (tinggi tanaman $1,28 \pm 1,34$ cm).



Grafik 1. Pengaruh konsentrasi BA dan NAA terseleksi terhadap total produksi tunas (*Effect of selected BA and NAA levels on total shoot production*). MT-1, media MS mengandung 1,0 mg/l BA dan 0,05 mg/l NAA, MT-2, media MS ditambah 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA. IC-kultur awal (*initial culture*), FC-hasil kultur pertama (*first culture result*), SC-hasil kultur kedua (*second culture result*), TC-hasil kultur ketiga (*third culture result*).

Pada MT-2 (0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA), setiap eksplan nodus menghasilkan 3,0 tunas pada kultur pertama, meningkat menjadi 3,1 pada kultur kedua, dan meningkat menjadi 5,8 pada kultur ketiga. Meskipun pada MT-2 produksi tunas terus meningkat, tetapi kualitas tunas terbaik diperoleh dari tahap kultur kedua. Pada tahap tersebut, tunas mempunyai internodus lebih panjang (tinggi tanaman 2,20 1,52 cm) dengan daun lebih hijau dan sehat. Pengaruh konsentrasi BA dan NAA untuk meningkatkan produksi tunas aksiler pada kultivar anyelir yang berbeda juga dilaporkan oleh Miller *et al.* (1991) dan van Altvorst *et al.* (1995). Selanjutnya berdasarkan hasil tersebut di atas dapat diambil kesimpulan bahwa MT-1 merupakan media yang tepat digunakan untuk perbanyak tunas anyelir dibanding MT-2.

Pengakaran

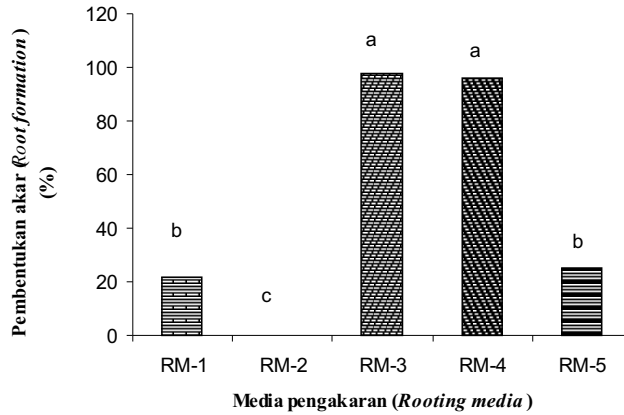
Terbentuknya akar pertama kali dapat diamati 5-7 hari setelah kultur tunas, khususnya yang ditanam pada media $\frac{1}{2}$ MS. Setelah 14 hari masa inkubasi perkembangan panjang dan peningkatan jumlah akar dapat diamati. Pada waktu yang sama pembentukan kalus pada

pangkal batang tunas juga teramati. Kalus terus tumbuh dan bertambah besar selama periode inkubasi. Perkembangan kalus tercepat ditemukan pada tunas yang ditanam dalam media MS mengandung 2 mg/l IBA (RM-2).

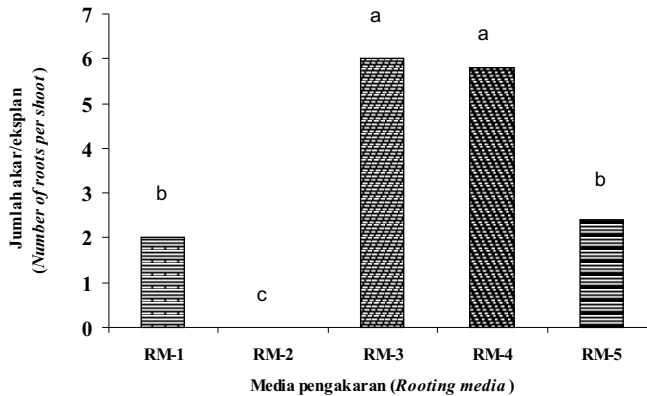
Grafik 2 dan Grafik 3 memperlihatkan bahwa media $\frac{1}{2}$ MS (RM-3) mampu mendukung pembentukan akar yang baik, yaitu pada persentase pembentukan akar dan jumlah akar per tunas yang tidak berbeda nyata dengan yang terjadi pada media MS mengandung 2 mg/l IAA (RM-4). Pada media tersebut, tunas yang ditanam mempunyai persentase pembentukan akar tertinggi (98%), jumlah akar per tunas terbanyak (6,0), dan akar terpanjang (1,64).

Pada media $\frac{1}{2}$ MS, tunas membentuk akar tanpa membentuk kalus pada pangkal batang tunas terlebih dahulu. Sedangkan pada media pengakaran lain pembentukan akar selalu didahului dengan pembentukan kalus dan perkembangan kalus tercepat ditemukan pada RM-2 yang mengandung 2 mg/l IBA. Akibat pertumbuhan kalus yang cepat tersebut tidak ada pembentukan akar yang teramati.

Data di atas menunjukkan bahwa media $\frac{1}{2}$ MS (RM-3) yang direkomendasikan oleh Frey &



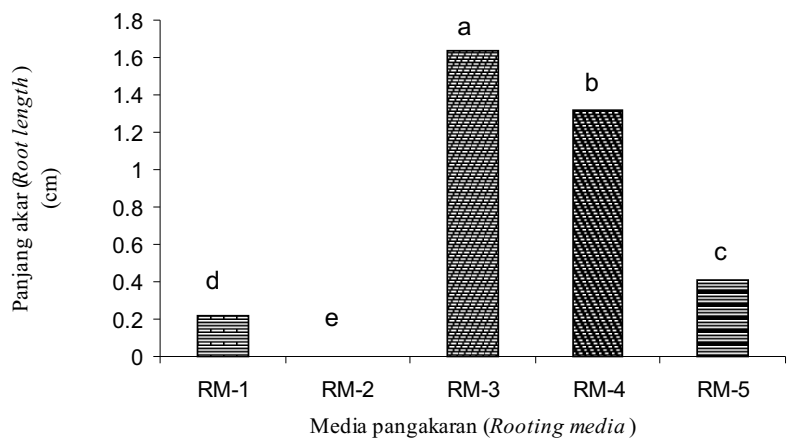
Grafik 2. Pengaruh media pengakaran terhadap persentase pembentukan akar (*Effect of rooting media on percentage of root formation*). RM-1, media MS mengandung 1 mg/l NAA, RM-2, media MS mengandung 2 mg/l IBA, RM-3, media $\frac{1}{2}$ MS, RM-4, media MS dengan 2 mg/l IAA dan RM-5, media MS ditambah dengan 1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA.



Grafik 3. Pengaruh media pengakaran terhadap jumlah akar per eksplan (*Effect of rooting media on number of roots produced per shoot*).

Janick (1991) merupakan media yang paling sesuai untuk pengakaran tunas hasil kultur jaringan kultivar maldives. Kemampuan media $\frac{1}{2}$ MS dalam menginduksi pengakaran dirangsang oleh nisbah C/N yang tinggi akibat dipertahankannya konsentrasi sukrosa pada level 3%. Menurut Veierskov (1988) nisbah C/N yang tinggi dalam media pengakaran akan mempercepat pembentukan akar. Sedangkan senyawa NAA (1 mg/l) dan IBA (2 mg/l) yang disarankan oleh Jain *et al.* (2001) ternyata merupakan media paling tidak sesuai untuk

induksi pengakaran pada kultivar maldives. Perlakuan tersebut diduga justru menimbulkan hambatan bagi proses transportasi basipetal IAA dari pucuk (Visser *et al.* 1995) dan menyebabkan akumulasi auksin yang berlebihan pada pangkal batang, akibatnya pertumbuhan kalus berlangsung cepat. Kehadiran NAA dan IBA mereduksi secara drastis kemampuan tunas dalam membentuk akar dan menginduksi pembentukan kalus yang cepat pada pangkal batang tunas (Rout *et al.* 2000). Sementara IAA merupakan auksin nonsintetik yang



Grafik 4. Pengaruh media pengakaran terhadap panjang akar (*Effect of rooting media on root length*)

Tabel 3. Pengaruh media aklimatisasi terhadap pertumbuhan dan kemampuan adaptasi kultivar maldives setelah 1 bulan inkubasi di ruang inkubasi (*Effect of acclimatization media on growth and survivability of cv. maldives plantlets after 1 month incubation in incubation room*).

Media (Media)	PTH (Plant survival rate) %	KKD (Chlorophyll content) mg	TT (Height of plant) cm	JDT (Number of leaves per plant)
Jiffy-7	45,0 b	0,19 c	6,0 c	13,9 c
Humus (Peat)	91,7 a	0,23 ab	8,5 ab	17,1 b
Humus + pasir (Peat + sand)	95,8 a	0,23 ab	9,6 a	18,2 ab
Humus + tanah (Peat + soil)	95,8 a	0,24 a	9,4 ab	18,5 ab
Humus + arang sekam (Peat + paddy charcoal)	97,9 a	0,23 ab	8,9 ab	19,8 a
Arang sekam (Paddy charcoal)	97,9 a	0,22 b	8,4 b	16,6 b
Koef. Var (CV, %)	11,91	5,54	8,53	8,03

PTH = Persentase tanaman hidup (*Plant survival rate*), KKD = Konsentrasi klorofil daun (*Leaf chlorophyll content*), TT = Tinggi tanaman (*Height of shoot*), JDT = Jumlah daun per tanaman (*Number of leaves per plant*).

kemampuannya membentuk akar lebih bergantung pada waktu inkubasi dibanding dengan konsentrasinya (van der Kreiken *et al.* 1993) dan selain itu konsentrasi IAA 2 mg/l yang ditambahkan ke dalam media kemungkinan masih agak tinggi untuk merangsang pembentukan akar pada anejer yang baik. Hal tersebut terbukti dengan adanya pembentukan kalus dipangkal batang tunas yang dikultur.

Aklimatisasi

Dalam proses aklimatisasi, penutupan plantlet oleh plastik transparan pada 7 hari pertama berpengaruh terhadap keberhasilan aklimatisasi. Perlakuan ini menyebabkan plantlet tetap segar dan mampu beradaptasi lebih baik (Preece & Sutter 1991). Setelah plastik dibuka plantlet mengalami kelayuan ringan dan pulih setelah 2-3 hari kemudian. Seminggu kemudian

Tabel 4. Pengaruh media aklimatisasi terhadap pertumbuhan dan persentase tananam hidup kultivar maldives setelah 1,5 bulann inkubasi dirumah kaca. (*Effect of acclimatization media on growth and survival of cultivar maldives plantlets after one and a half month incubation in a screen house*)

Media (Media)	PTH (Plant survival rate) %	KKD (Chlorophyll content) mg	TT (Height of plant) cm	JDT (Number of leaves per plant)
Jiffy-7	86,6 b	0,29 ab	8,2 c	23,1 c
Humus (Peat)	95,8 ab	0,29 ab	15,7 ab	34,6 ab
Humus + pasir (Peat + sand)	95,4 ab	0,28 b	14,8 b	35,6 a
Humus + tanah (Peat + soil)	95,8 ab	0,30 a	15,4 ab	33,5 ab
Humus + arang sekam (Peat + paddy charcoal)	100 a	0,30 a	16,7 a	36,4 a
Arang sekam (Paddy charcoal)	100 a	0,30 a	13,9 b	29,8 b
KV (CV), %	6,45	4,02	7,79	9,78

plantlet tumbuh normal dan menghasilkan satu hingga sembilan daun baru setelah 1 bulan aklimatisasi di ruang inkubasi.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa media aklimatisasi berpengaruh terhadap pertumbuhan plantlet dan keberhasilan aklimatisasi. Pada kondisi ruang inkubasi (Tabel 3), semua media aklimatisasi, kecuali jiffy 7, memberikan persentase tanaman hidup tinggi (92-98%), kandungan klorofil dan tinggi tanaman tertinggi, dan jumlah daun per tanaman terbanyak. Persentase tanaman hidup tertinggi (98%) ditemukan pada plantlet yang ditanam pada media campuran arang sekam+humus dan arang sekam saja. Sedangkan kandungan klorofil terbanyak (0,24 mg/mg) ditemukan pada plantlet yang ditanam di media campuran antara humus dan tanah. Tinggi tanaman tertinggi (9,6 cm) pada media campuran humus dan pasir, sedangkan jumlah daun terbanyak (19,8) pada humus+arang sekam.

Persentase keberhasilan aklimatisasi dan pertumbuhan plantlet yang ditanam dalam media jiffy 7 adalah terendah, tanaman tidak normal tumbuh, umumnya memiliki daun dan batang kecil, mudah layu dan mati. Pada tanaman yang layu, jika dicabut, akarnya berwarna coklat, busuk, dan kemungkinan terkontaminasi oleh mikroorganisme perusak.

Percobaan rumahkaca (Tabel 4), menunjukkan hasil hampir sama pada semua

media aklimatisasi, kecuali jiffy 7, mampu menstimulasi pertumbuhan tanaman yang baik dan meningkatkan persentase tanaman hidup. Persentase tanaman hidup tertinggi (100%) ditemukan pada tanaman yang ditanam di media campuran humus dan arang sekam. Pada media tersebut tanaman juga memiliki kandungan klorofil daun tertinggi (0,30 mg/mg), tinggi tanaman tertinggi (16,7 cm) dan jumlah daun per eksplan terbanyak (36,4). Tanaman umumnya tumbuh bagus dan memiliki daun berlapis lilin, lebih panjang dan tebal, serta batang lebih besar. Hal ini memberikan bukti bahwa humus dan kombinasinya dengan media lain diduga memiliki peran penting dalam meningkatkan kondisi fisik dan kimia media seperti yang dilaporkan dalam Anonymous (1995) dan Shahidul Islam *et al.* (2002). Kondisi media yang baik itu ditandai dengan kemampuan memegang dan menahan air yang baik, aerasi cukup untuk pengakaran karena porositas tinggi, bebas bahan beracun, kapasitas pertukaran ion tinggi dengan kelembaban 5-6% (Shahidul Islam *et al.* 2002). Kesesuaian media tinggi, terlihat pada plantlet yang ditanam dalam campuran humus+arang sekam dan arang sekam sehingga tanaman berhasil diaklimatisasi dan tumbuh lebih baik dibanding perlakuan lain.

Pada media jiffy 7, umumnya pertumbuhan plantlet terhambat. Tanaman memiliki kandungan klorofil yang rendah, pertumbuhan



Gambar 2. Plantlet abnormal yang ditemukan selama penelitian (*Abnormal plantlets obtained during experiment*). A-tanaman roset dan pendek (*stunted plant*), B-tanaman kerdil (*dwarfed plant*)

tinggi tanaman yang terhambat dan jumlah daun sedikit. Tanaman sulit beradaptasi, daun dan batangnya kecil dengan internodus yang pendek. Rendahnya persentase tanaman hidup dan pertumbuhan yang terhambat terlihat dari tingginya kematian plantlet selama proses aklimatisasi. Kondisi ini kemungkinan dipengaruhi oleh bahan toksik, rendahnya aerasi media, dan mikroorganisme kontaminan (Poole *et al.* 1981). Pada kondisi tersebut, akar tidak mudah mengabsorpsi air dan hara tanaman dengan cukup. Karena aktivitasnya, akar akan menghasilkan CO₂, selanjutnya jika terakumulasi bahan ini akan bersifat racun bagi tanaman.

Persentase tanaman tumbuh abnormal (kerdil dan pendek) dalam penelitian ini adalah $6,3 \pm 2,02\%$ (Gambar 2). Ketidaknormalan pertumbuhan tanaman tersebut kemungkinan besar bukan bersifat genetik karena setelah beberapa minggu masa inkubasi di rumah kaca dari tanaman tersebut tumbuh tunas-tunas normal. Variasi somaklonal seperti itu dapat terjadi akibat pengaruh hormon yang digunakan selama periode kultur jaringan, kultivar, lama waktu dalam kondisi *in vitro*, kecepatan pembelahan, pengaruh seleksi, dan kondisi kultur (Shoemaker *et al.* 1991; Skirvin *et al.* 1994). Menurut Evans & Sharp (1983) persentase variasi somaklonal pada umumnya

berkisar antara 15-20%. Sedangkan pada percobaan ini rata-rata variasi somaklonal terjadi hanya 6%. Pada pertumbuhan dan pengamatan selanjutnya diketahui bahwa tanaman berbunga 4,5 hingga 5,0 bulan sesudah aklimatisasi.

KESIMPULAN

Sistem perbanyakan secara *in vitro* melalui induksi pembentukan tunas adventif telah berhasil dikembangkan untuk *D. caryophyllus* L. cv. maldives. Daun muda yang pertama dan media MS yang mengandung 0,1 mg/l BA dan 0,01 mg/l NAA merupakan eksplan dan konsentrasi BA-NAA yang sesuai untuk induksi pembentukan tunas adventif pada kultivar maldives. Konsentrasi BA dan NAA tersebut juga sesuai untuk menyiapkan tunas yang akan diakarkan. Tunas mudah diakarkan pada media $\frac{1}{2}$ MS. Media aklimatisasi plantlet terbaik adalah campuran media humus dan arang sekam (1:1, v/v). Pada media aklimatisasi 100% tanaman hidup, plantlet vigor, dan sehat. Ketidaknormalan plantlet rata-rata terjadi sebesar 6%. Dengan menggunakan semua perlakuan pada penelitian ini tanaman sudah berbunga pada umur 4,5 hingga 5,0 bulan sesudah aklimatisasi.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu acuan untuk perbanyakan masal anyelir melalui induksi tunas adventif.

PUSTAKA

- Anonymous. 1995. *Humus: Chemical and physical analysis*. Kosas Pilar (M) Sdn. Bhd. Kuala Lumpur. 3p.
- Cachita-Cosma, D. 1991. The effect of the nature and origin of explants on micropropagation. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17. High-Tech and Micropropagation I*, Ed. Bajaj, Y.P.S. pp 142-167. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Debergh, P.C. and T. ZimmerMan. 1991. *Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. 484p.
- Earle, E.D. and R.W. Langhans. 1975. Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid media. *Hortsci.* 10(6):608-610.
- Evans, N.E. and W.R. Sharp. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Sci.* 221:949-951.
- Frey, L. and J. Janick. 1991. Organogenesis in carnation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(6):1108-1112.
- Jain, A., A. Kantia and S.S. Kothari. 2001. De Novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. *Sci. Hort.* 87:319-326.
- Kallak, H., I. Hilpus and K. Virumae. 1996. Influence of genotype and growth regulators on morphogenetic processes in carnation shoot apex cultures. *Sci. Hort.* 65:181-189.
- Majada, J.P., M.A. Fal and R. Sanchez-Tames. 1997. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 33:62-69.
- Messeguer, J., M.C. Arconada and E. Mele. 1993. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 54:153-163.
- Miller, R.M., V. Kaul, J.F. Hutchinson and D. Richards. 1991. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Sci. Hort.* 54:153-163.
- Nakano, M., and M. Mii. 1992. Protoplast culture and plant regeneration of several species in the genus *Dianthus*. *Plant Cell Rep.* 11:225-228.
- Perez-Tornero, O., J. Egea, A. Vanoostende and L. Burgos. 2000. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. *Plant Sci.* 158:61-70.
- Poole, R.T., C.A. Conover and J.N. Joiner. 1981. Soils and potting mixtures. In: *Foliage plant production*. (Ed.) Joiner, J.N. pp.179-202. Englewood Cliffs, N.J: Printice-Hall, Inc.
- Roest, S. and G.S. Bokelmann. 1981. Vegetative Propagation of Carnation In-vitro Through Multiple Shoot Development. *Sci. Hort.* 14:357-366.
- Rout, G.R., S. Samantaray and P. Das. 2000. In vitro rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker. *Plant Growth Regul.* 30:215-219.
- Shahidul Islam, M.D.S., S. Khan, T. Ito, T. Maruo and Y. Shinohara. 2002. Characterization of the physico-chemical properties of environmentally friendly organic substrates in relation to rockwool. *J. Hort. Sci. Biotech.* 77(2):143-148
- Shoemaker, R.C., K.A. Amberger, R.G. Palmer, L. Oglesby and J.P. Ranch. 1991. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean (*Glycine max* L. Mer. R.). In *Vitro Cell Dev. Biol.* 27:84-88.
- Skirvin, R.M., K.D. McPheeters and M. Norton. 1994. Sources and Frequency of Somaclonal Variation. *Hortsci.* 29(11):1232-1237.
- van Altvorst, A.C., H.J.J. Koehorst, T. Bruinsma, J. Jansen, J.B.M. Custers, J. de Jong and J.J.M. Dons. 1992. Adventitious shoot formation from in vitro leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Sci. Hort.* 51:223-235.
- _____, and J.J.M Dons. 1994. IRMrovement of adventitious shoot formation from carnation leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 37:87-90.
- _____, S. Yancheva and H.J.M Dons. 1995. Cells within the nodal region of carnation shoot exhibit a high potential for adventitious shoot formation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 40:151-157.
- Van der Kreiken, W.M., H. Breteler, M.H.M. Visser and D. Mavridou. The role of the conversion of IBA to IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system. *Plant Cell Rep.* 12:203-206.
- Veierskov, B. 1988. Relation between carbohydrates and Adventitious root Formation. In: *Adventitious root formation in cuttings*. Eds. Davis, T.D., Haissig, B.E., and Sankhla, N. pp 70-78, Portland, Oregon: Dioscordes Press.
- Visser, E.W.J., C.J. Heijink, K.J.G.M. van Hout, L.A.C.I. Voesenek, G.W.M. Barendse and C.W.P.M. Blom. 1995. Regulatory role of auxin in adventitious root formation in two species of *Rumex*, differing in their sensitivity to waterlogging. *Physiol. Plant.* 93:116-122.