

Perbanyakan *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.)] Shinn Secara *In Vitro* Menggunakan Kuncup Bunga sebagai Sumber Eksplan (*Micropropagation of Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.)] Shinn Using Flower Bud as Explant Source)

Herni Shintiavira dan Budi Winarto

Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln. Raya Ciherang, Segunung, Pacet, Cianjur, Jawa Barat, Indonesia 43253
E-mail: virgro@yahoo.co.id

Naskah diterima tanggal 21 November 2014 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 15 Desember 2015

ABSTRAK. *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.)] Shinn merupakan tanaman hias bernilai ekonomi tinggi. Pengembangan jenis tanaman ini terkendala oleh keterbatasan benih bermutu. Penyediaan benih bermutu melalui pemanfaatan kuncup bunga pada kultur *in vitro* lisianthus dilakukan dalam penelitian. Penelitian bertujuan mendapatkan teknologi perbanyakan lisianthus menggunakan kuncup bunga. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung pada Januari hingga Desember 2013. Penelitian ini menggunakan *E. grandiflorum* klon 05 NK-70 dengan sumber eksplan kelopak bunga, mahkota, kepala sari, ovarium, dan penyangga bunga. Penelitian terdiri atas empat percobaan, yaitu Percobaan 1, eksplan diinisiasi pada media Murashige & Skoog (MS), MS +0,2 mg/l benzylaminopurin (BAP) + 0,02 mg/l asam naftalen asetat (NAA), MS+0,5 mg/l BAP + 1,5 mg/l thidiazuron (TDZ) dan MS+0,25 mg/l BAP. Percobaan 2, tunas hasil inisiasi diperbanyak pada media MS dan MS + 0,2 mg/l BAP +0,02 mg/l NAA. Percobaan 3, pencegahan roset pada planlet dengan aplikasi media MS + 0,1–10 mg/l asam giberelin (GA_3). Percobaan 4, induksi perakaran menggunakan media MS + 0,1–0,5 mg/l asam asetat-3-indol (IAA) tanpa atau ditambah 1 g/l arang aktif. Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) 3–4 ulangan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penyangga bunga merupakan eksplan paling responsif dalam inisiasi tunas dan perbanyakan tunas pada media MS + 0,2 mg/l BAP + 0,02 mg/l NAA. Sementara media MS +7 mg/l GA_3 sesuai untuk mencegah roset dan media MS +0,5 mg/l IAA + 1 g/l arang aktif sesuai untuk pengakaran tunas. Planlet diaklimatisasi menggunakan campuran arang sekam dan *cocopeat* dengan tingkat keberhasilan mencapai 80–100%.

Kata kunci: *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.)] Shinn; Benih bermutu; Kuncup bunga; *In vitro*; Perbanyakan

ABSTRACT. *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.)] Shinn is an high economic value ornamental plant. However development of the plant was restricted by the limited of qualified plant propagating. Preparing the qualified plant propagation *in vitro* culture using flower buds was studied in this research. Objective of the research was to obtain technology of mass propagation of lisianthus explants of flower buds. The experiment was conducted at Tissue Culture Laboratory, Indonesian Ornamental Crops Research Institute from January to December 2013. *Eustoma grandiflorum* 05 NK-70 clone was used as donor plant in the study. Explant type tested in experiment were sepal, petal, anther, ovary, and receptacle. This experiment consisted of four activities. Activity 1, shoot initiation at Murashige & Skoog (MS) medium, MS +0.2 mg/l BAP+ 0.02 mg/l NAA, MS+0.5 mg/l BAP + 1.5 mg/l TDZ and MS+ 0.25 mg/l BAP. Activity 2, shoot propagation at medium of MS and MS + 0.2 mg/l BAP +0.02 mg/l NAA. Activity 3, application of GA_3 in concentration of 0.1–10.0 mg/l added in MS medium was carried out to prevent rosette problem. Activity 4, root initiation on MS medium augmented with 0.1–0.5 mg/l IAA with or without 1 g/l activated-charcoal. The experiments were arranged in a complete randomized design (CRD) with 3–4 replications. Results of the study indicated that flower receptacle is most responsif explant of flower bud fragment in shoots initiation and shoots propagation cultured on MS media containing 0.2 mg/l BAP + 0.02 mg/l NAA. MS medium augmented with 7.0 mg/l GA_3 was optimum medium for preventing rosette explant. MS medium containing 0.5 mg/l IAA and 1 g/l activated-charcoal was suitable rooting medium. Plantlets were easily acclimatized in burned-rice husk and *cocopeat* mixture medium with 80-100% survivability.

Keywords: *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.)] Shinn; Qualified-seeds; Flower bud; *In vitro*; Propagation

Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.)] Shinn merupakan salah satu anggota famili Gentianaceae yang bernilai ekonomi tinggi (Demas *et al.* 2009). Tanaman ini dapat digunakan sebagai bunga potong dan pot. Bentuk bunga mirip bunga mawar dengan variasi ukuran dan warna, serta memiliki masa simpan mencapai 6 minggu dengan pemberian thiosulfat kompleks dan sukrosa (Shimizu & Ichimura 2005, Yamada *et al.* 2008, Mousavi *et al.* 2012ab). *Lisianthus* banyak dibudidayakan di Pasir Sarongge, Cipanas-Cianjur dan Cihideung-Bandung, Jawa Barat, Batu-Malang, Jawa Timur, dan Baturiti-Tabanan, Bali.

Lisianthus dapat diperbanyak secara vegetatif maupun generatif. Secara vegetatif, tanaman ini diperbanyak dengan cara penyetekan. Namun, cara ini umumnya memerlukan banyak tenaga dan waktu dengan hasil yang terbatas, sedangkan secara generatif tanaman diperbanyak menggunakan biji (Mousavi *et al.* 2012ab, Rezaee *et al.* 2012). Cara tersebut juga jarang digunakan karena produksi biji dan daya kecambah biji yang rendah (Arpana *et al.* 2012, Rezaee *et al.* 2012, Mousavi *et al.* 2012b). Di Indonesia, benih biasanya diimpor langsung dari Jepang (Demas 2009, Meliala 2011). Sementara pemanfaatan ulang benih dari

tanaman produksi menyebabkan penurunan kualitas bunga yang dihasilkan.

Beberapa cara perbanyak tanaman lisianthus secara *in vitro* menggunakan variasi eksplan telah dilaporkan. Semeniuk & Griesbach (1987) menggunakan tunas pucuk dan nodus untuk menginisiasi banyak tunas pada medium Murashige dan Skoog (Murashige & Skoog 1962) ditambah 3 mg/l N6-benzyladenine (BA) dan 0,2 mg/l NAA. Tunas hasil inisiasi selanjutnya diperbanyak pada medium MS yang ditambah 3 mg/l BA dan diakarkan pada medium MS dengan 2 mg/l IAA. Pada penelitian lainnya, tunas pucuk ditanam pada medium MS yang ditambah 1 mg/l BA, 0,25–0,86 mg/l IAA dan asam butir-3-indol (IBA) juga berhasil digunakan untuk inisiasi tunas aksiler (Paek & Hahn 2000). Potongan daun yang ditanam pada medium MS yang mengandung 0,5–5,0 mg/l BA telah dilakukan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik (Nhut *et al.* 2006). Eksplan tunas pucuk dan media MS yang ditambah dengan 0,5–1,0 mg/l kinetin (Kin) digunakan oleh Esizad *et al.* (2012), tunas lateral dan media B5 (Gamborg *et al.* 1968) yang ditambah dengan 1mg/l GA₃ dan 1 mg/l BAP (Mousavi *et al.* 2012b) digunakan untuk inisiasi dan perbanyak tunas. Untuk pemanjangan tunas, penambahan 5 mg/l GA₃ pada media MS+1 mg/l BAP meningkatkan pemanjangan tunas pada lisianthus hasil kultur eksplan daun (Popa *et al.* 2006). Perbanyak *in vitro* tersebut umumnya menggunakan tunas pucuk, nodus/tunas lateral, dan daun sebagai eksplan, sementara di dalam penelitian ini digunakan kuncup bunga sebagai eksplan untuk perbanyak lisianthus.

Penelitian ini dilakukan bertujuan (1) mempelajari potensi daun kelopak (*sepal*), mahkota (*petal*), kepala sari (*anther*), ovarium (*ovary*), dan penyangga bunga (*receptacle*) dalam menghasilkan tunas adventif pada berbagai jenis media. Penelitian terbagi dalam tahapan inisiasi, proliferasi, pencegahan roset, pengakaran hingga aklimatisasi plantlet yang dihasilkan, serta (2) mendapatkan teknologi perbanyak massal lisianthus menggunakan kuncup bunga sebagai sumber eksplannya. Hipotesis yang diajukan ialah bahwa berbagai jenis eksplan kuncup bunga diduga dapat digunakan sebagai eksplan untuk perbanyak benih lisianthus secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari hingga Desember 2013 di Laboratorium Kultur Jaringan dan Kebun Percobaan Segunung, Balai Penelitian Tanaman Hias.

Bahan Penelitian dan Persiapan

Lisianthus klon 05 NK-70 digunakan sebagai tanaman donor. Tanaman donor ditanam dalam polibag (diameter 35 cm, 40 cm tinggi) yang berisi campuran sekam, tanah, dan pupuk kandang (1:1:1 v/v/v) dan ditempatkan dalam rumah plastik di Kebun Percobaan Segunung. Tanaman dipelihara melalui penyiraman (2 hari sekali), pemupukan menggunakan pupuk NPK (20:15:15; 2 g/l) yang dicairkan dan diaplikasikan dua kali seminggu. Aplikasi pestisida dilakukan untuk menekan potensi terjadinya kontaminasi eksplan oleh jamur dan bakteri. Eksplan berupa kuncup bunga umur ± 7 hari dipanen dari tanaman donor dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi Eksplan

Kuncup bunga direndam dalam larutan 10% natrium hipoklorit (NaOCl) selama 15 menit, kemudian dibilas dengan akuades tiga kali (masing-masing 3 menit). Setelah itu, kuncup bunga direndam dengan larutan 0,05% HgCl selama 5 menit, dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit dan ditiriskan dalam cawan petri. Kegiatan tersebut dilakukan di dalam *laminair air flow cabinet*. Bagian-bagian bunga seperti kelopak, petal, kepala sari, ovarium, dan penyangga bunga diisolasi satu per satu (Gambar 1) dan dikelompokkan sesuai jenis eksplannya. Eksplan yang telah diisolasi kemudian ditanam pada media perlakuan.

Media Kultur

Media dasar yang digunakan dalam penelitian ini ialah medium MS. Komponen medium hara makro dan mikro berasal dari Merk-Jerman, serta komponen vitamin dan hormone (TDZ, BAP, NAA, IAA, dan GA₃) berasal dari Sigma-Aldrich-Jerman. Bahan pematat menggunakan gelrite (2 g/l) dari Ducefa-Belanda untuk tahap inisiasi dan proliferasi. Pada tahap pengakaran menggunakan agar Swallow-Indonesia (7 g/l). Semua media ditambah dengan 30 g/l sukrosa. Setelah ditambah bahan pematat dan dimasak, media dituang dalam botol-botol kultur (15 ml untuk botol *chicken* dan 30 ml untuk botol jam). Keadaan pH media diatur hingga mencapai 5,8 dan disterilisasi dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi.

Inkubasi Kultur

Eksplan yang telah dikultur diinkubasi pada ruang gelap selama 4 minggu, kemudian dipindahkan ke ruang terang dengan 16 jam pencahayaan di bawah lampu fluoresen dengan intensitas cahaya $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ hingga regenerasi tunas adventif terbentuk. Tahap perbanyak tunas dan pengakaran dilakukan di bawah kondisi terang.



Gambar 1. Eksplan dari bagian kuncup bunga lisianthus (a), kelopak bunga (b), mahkota bunga (c), anther (d), ovarium (e), dan tangkai bunga (f) [*Explant from flower bud of lisianthus (a), sepal (b), petal (c), anther (d), ovary and, (e) receptacle (f)*]

Percobaan 1. Respons Variasi Jenis Eksplan pada Berbagai Jenis Media Terhadap Inisiasi Tunas Adventif

Eksplan yang diuji pada percobaan ini ialah daun kelopak (e1), mahkota bunga (e2), kepala sari (e3), ovarium (e4), dan penyangga bunga (e5). Media inisiasi yang diuji ialah MS-0 (m-1, sebagai kontrol), MS +0,2 mg/l BAP+0,02 mg/l NAA (m-2), MS+ 0,5 mg/l BAP (m-3), dan MS +1,5 mg/l TDZ + 0,25 mg/l BAP (m-4).

Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua kombinasi perlakuan dan tiga ulangan. Tiap unit perlakuan terdiri atas 15 eksplan yang dikultur dan diamati responsnya. Parameter yang diamati pada percobaan ini ialah (1) waktu inisiasi tunas adventif (hari), (2) persentase regenerasi (%), dan (3) jumlah tunas tiap eksplan. Waktu inisiasi tunas adalah lamanya hari yang diperlukan eksplan dari awal kultur hingga mulai membentuk calon tunas. Persentase regenerasi adalah jumlah eksplan yang mampu membentuk tunas sempurna dibagi dengan jumlah total eksplan yang ditanam kali 100%. Jumlah tunas adalah banyaknya tunas tiap eksplan yang tumbuh sempurna dengan empat daun. Seluruh data yang diamati dan dicatat mulai 4–12 minggu setelah inkubasi terang.

Percobaan 2. Perbanyakan Tunas Adventif

Perbanyakan tunas dilakukan dengan mengisolasi dan menanam tunas hasil inisiasi pada media terseleksi (media MS yang ditambah 0,2 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA) dan media MS-0 (sebagai kontrol). Subkultur tunas dilakukan secara periodik setiap 4 minggu sekali dan dilakukan hingga subkultur yang ke-3.

Percobaan disusun menggunakan RAL dengan dua perlakuan dan empat ulangan. Tiap perlakuan terdiri atas 36 eksplan. Parameter yang diamati (1) jumlah tunas, (2) panjang daun (cm), dan (3) lebar daun (cm).

Jumlah tunas adalah banyaknya tunas tiap eksplan yang tumbuh sempurna dengan empat daun. Panjang daun adalah rerata ukuran daun secara vertikal dari pangkal ke ujung daun. Lebar daun adalah rerata ukuran daun secara horisontal pada tengah-tengah daun dari kiri ke kanan. Semua parameter diukur dan dicatat 4 minggu setelah kultur.

Percobaan 3. Pencegahan Roset Tunas

Planlet dengan empat daun pada usia 4 minggu yang mengalami masalah roset diperbaiki pertumbuhannya melalui aplikasi GA_3 . Konsentrasi GA_3 yang diuji dalam percobaan ini ialah 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 7,0; dan 10,0 mg/l. Media dasar yang digunakan ialah media MS.

Percobaan disusun menggunakan RAL dengan empat ulangan. Tiap unit perlakuan terdiri atas 18 planlet yang dikultur. Parameter yang diamati dalam percobaan ini ialah (1) jumlah tunas aksiler yang terbentuk per planlet dan (2) tinggi tunas. Jumlah tunas aksiler adalah total tunas yang tumbuh dari titik tumbuh planlet yang mengalami roset. Tinggi tunas adalah ukuran panjang tunas yang tumbuh dari pangkal planlet yang mengalami roset sampai ujung tunas tersebut. Parameter diukur dan dicatat 4 minggu setelah kultur inisiasi.

Percobaan 4. Pengakaran Tunas

Pengakaran tunas dilakukan dengan menanam tunas yang sudah memiliki empat daun dengan tinggi 5 cm dan belum berakar pada media pengakaran. Media pengakaran yang diuji, yaitu (1) MS+0,1mg/l IAA, (2) MS+0,2mg/l IAA, (3) MS+0,3mg/l IAA, (4) MS+0,4mg/l IAA, (5) MS+0,5mg/l IAA, (6) MS+0,1mg/l IAA+ 1 mg/l arang aktif, (7) MS+0,2 mg/l IAA+ 1 g/l arang aktif, (8) MS+0,3 mg/l IAA+ 1g/l arang aktif, (9) MS+0,4 mg/l IAA+ 1 g/l arang aktif, dan (10) MS+0,5mg/l IAA+ 1 g/l arang aktif.

Penelitian menggunakan RAL dengan tiga ulangan. Tiap unit perlakuan terdiri atas 18 eksplan berupa tunas dengan empat daun. Parameter yang diamati ialah (1) jumlah akar dan (2) panjang akar. Jumlah akar adalah total akar primer yang tumbuh dari pangkal batang. Panjang akar adalah akar utama yang diukur dari pangkal akar hingga ujung akar. Semua parameter diukur 4 minggu setelah kultur.

Aklimatisasi Planlet

Planlet yang tumbuh sempurna, tidak mengalami roset dan berakar dengan baik digunakan pada tahap ini. Aklimatisasi dilakukan dengan cara mengeluarkan planlet dari botol dan membersihkan akar dari media yang menempel. Setelah bersih, akar dicelupkan dalam larutan 1% fungisida (50% benomil) selama 2–3 menit, kemudian dikeringanginkan selama 5 menit. Setelah dikeringanginkan, planlet ditanam dalam pot plastik yang berisi media arang sekam yang telah dibasahi. Satu pot ditanam 15 tanaman. Total planlet yang diaklimatisasi sebanyak 90 planlet. Planlet yang telah ditanam kemudian disungkup selama 4 minggu. Setelah pembukaan sungkup, tanaman dibiarkan tumbuh dan beradaptasi dengan baik dalam kondisi *ex vitro*. Satu bulan kemudian jumlah tanaman yang tetap tumbuh baik dihitung dan dicatat. Parameter yang diamati dalam percobaan ini ialah persentase keberhasilan aklimatisasi (%). Persentase keberhasilan aklimatisasi adalah jumlah tanaman yang hidup dan tumbuh dibagi jumlah tanaman yang ditanam dibagi 100%. Semua parameter diamati dan dicatat 2 bulan setelah aklimatisasi.

Analisis Data

Data yang terkumpul dianalisis menggunakan analisis varians (anova) dengan pengolah data SAS Release Windows 9.12. Jika terdapat pengaruh nyata dari perlakuan maka pengujian perbedaan nilai rerata lanjutan dilakukan menggunakan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 95% (Gaspersz 1991).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inisiasi Tunas Adventif

Hasil pengamatan secara periodik menunjukkan bahwa pada saat inkubasi gelap, 2 minggu pertama terjadi pembengkakan pada semua eksplan yang ditanam. Minggu ke 2–3 terjadi pembentukan kalus berwarna putih pada bagian eksplan yang dilukai oleh pisau kultur. Hingga minggu ke-6 terjadi peningkatan persentase pembentukan kalus, tetapi inisiasi tunas belum terjadi. Inisiasi tunas mulai terlihat pada minggu ke-9 hingga ke-14. Persentase regenerasi eksplan bervariasi antara 1–66,67% dengan jumlah tunas 0–5 tunas per eksplan (Tabel 1).

Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa eksplan penyangga bunga responsif dengan waktu inisiasi tunas tercepat sekitar 9,53 minggu dan persentase regenerasi tertinggi sekitar 66,67% dan dengan jumlah tunas 4,92 tunas per eksplan dibandingkan dengan eksplan lain. Media terbaik dalam menginisiasi eksplan ialah MS +0,2 mg/l BAP+0,02 mg/l NAA (m-2) yang mampu memberikan respons eksplan dengan waktu inisiasi sekitar 10,27 minggu dan persentase regenerasi 40% dengan jumlah tunas 4,19 tunas per eksplan.

Tiap bagian bunga menunjukkan respons yang bervariasi terhadap media inisiasi, tetapi eksplan yang memberikan hasil terbaik terhadap waktu inisiasi, persentase regenerasi dan jumlah tunas per eksplan ialah penyangga bunga. Penggunaan media tanpa hormon tidak dapat menstimulasi inisiasi tunas pada jenis eksplan dari kuncup bunga *lisianthus* pada 4 minggu setelah inkubasi terang, hal ini berarti tunas eksplan *lisianthus* tidak dapat diinduksi tanpa pemberian hormon. Menurut Kumar & Kanwar (2006) BAP meningkatkan pembelahan sel di dalam daerah meristematis ditambah pemberian NAA konsentrasi rendah meningkatkan regenerasi tunas (Khaleghi *et al.* 2008).

Perbanyak Tunas Adventif

Perbanyak tunas adventif menggunakan eksplan penyangga bunga tidak terjadi interaksi antara media dan tingkat subkultur. Hasil pengamatan diketahui bahwa inisiasi tunas terlihat mulai minggu ke-2. Pada minggu ke-4 variasi jumlah tunas yang dihasilkan per tunas yang disubkultur berkisar antara 0–9 tunas. Pada subkultur ke-1, jumlah tunas yang dihasilkan oleh penyangga bunga mencapai 2,9 tunas per eksplan, meningkat hingga 3,1 tunas pada subkultur ke-2 dan 5,8 tunas pada subkultur ke-3 (Tabel 2). Media juga menentukan perbanyak tunas adventif, pada media MS yang ditambah 0,2 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA, jumlah tunas mencapai 2,2 tunas pada subkultur ke-1, meningkat menjadi 3,9 tunas pada subkultur ke-2 dan 7,9 tunas pada subkultur ke-3 (Tabel 2).

Penggunaan media MS +0,2 mg/l BAP +0,02 mg/l NAA pada setiap kali subkultur menghasilkan tunas dengan jumlah yang meningkat tetapi ukurannya kecil. Hal ini dikarenakan BAP meningkatkan pembelahan sel di dalam daerah meristematis, pemberian NAA konsentrasi rendah meningkatkan regenerasi tunas tidak disertai dengan pembesaran organ (Khaleghi *et al.* 2008), sedangkan penggunaan media MS tanpa hormon memengaruhi pembesaran tanaman tetapi tidak meningkatkan pertumbuhan jumlah tunas. Pada penelitian *Ruscus hypophyllum*, subkultur tunas adventif dapat dilakukan hingga subkultur ke-5, setelah

itu kualitas tunas menurun pada subkultur berikutnya (Winarto & Setyawati 2014). Pada *cherry*, penurunan kecepatan penggandaan tunas sudah terjadi pada subkultur ke-2 (Vujovic *et al.* 2012) serta pada gerbera Victoria kualitas dan jumlah tunas menurun pada subkultur ke-5 (Vardja & Vardja 2001) dan subkultur ke-3 (Shylaja *et al.* 2014). Hasil-hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa subkultur tunas untuk tujuan perbanyakan hanya dapat dilakukan pada beberapa seri subkultur saja dan setelah itu tunas diakarkan untuk persiapan pada tahap aklimatisasi.

Pencegahan Roset Tunas

Pada percobaan pencegahan roset tunas terlihat bahwa aplikasi GA₃ berpengaruh sangat nyata terhadap pertumbuhan dan jumlah tunas yang dihasilkan. Inisiasi tunas pada semua perlakuan GA₃ merata terjadi pada hari ke 5–7. Pada minggu ke-4 perlakuan GA₃ pada konsentrasi 0,1–2 mg/l hanya menstimulasi tinggi tunas 0–1,4 cm dan jumlah tunas 0–5,6 tunas. Peningkatan pertumbuhan dan pertambahan jumlah tunas makin meningkat dengan meningkatnya aplikasi konsentrasi GA₃. Mulai pada perlakuan GA₃ 5–10 mg/l tinggi

Tabel 1. Pengaruh jenis eksplan dan media terhadap pertumbuhan lisianthus (*Effect of explant types and medium on growth of lisianthus*)

Jenis eksplan (<i>Explant type</i>)	Waktu inisiasi tunas (<i>Shoot initiation time</i>) Hari (<i>Days</i>)	Persentase regenerasi (<i>Percentage of shoot regeneration</i>), %	Jumlah tunas per eksplan (<i>Shoot per explants</i>)
Daun mahkota (<i>Sepal</i>)	11,67 b	48,33 a	2,10 b
Mahkota bunga (<i>Petal</i>)	12,50 c	11,67 b	1,10 bc
Kepala sari (<i>Anther</i>)	11,50 b	16,67 b	1,66 b
Ovarium (<i>Ovary</i>)	12,83 c	11,67 b	0,24 c
Penyangga bunga (<i>Receptacle</i>)	9,53 a	66,67 a	4,92 a
KK (<i>CV</i>), %	26,85	4,97	17,53
Jenis media (<i>Kind of media</i>)			
m-1	13,87 c	1,33 b	0,13 c
m-2	10,27 a	40,00 a	4,19 b
m-3	11,07 b	38,67 a	1,35 b
m-4	11,20 b	44,00 a	2,35 b
KK (<i>CV</i>), %	26,85	4,97	17,53

KK (*CV*): koefisien keragaman (*coefficient of variation*). MS-0 (m-1, sebagai kontrol), MS +0,2 mg/l BAP+0,02 mg/l NAA (m-2), (3) MS+ 0,5 mg/l BAP (m-3), MS +1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA (m-4). 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 column are not significantly difference based on Duncan Multiple Range Test (DMRT) p =0.05*)

Tabel 2. Rerata pertambahan dan pertumbuhan tunas tiap jenis eksplan dari satu tunas adventif yang ditanam tiap 1 periode subkultur 4 minggu sekali (*The average of addition and growth of shoots of each type of explant from an adventitious shoot per subculture periode*)

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Subkultur 1 (<i>1st subculture</i>)			Subkultur 2 (<i>2nd subculture</i>)			Subkultur 3 (<i>3rd subculture</i>)		
	JT	P	L	JT	P	L	JT	P	L
m1	1,7 b	0,90 a	0,41 a	1,3 b	1,65 a	0,90 a	1,4 b	2,14 a	0,95 a
m2	2,2 a	0,56 b	0,34 b	3,9 a	1,34 b	0,65 b	7,9 a	1,53 b	0,72 b
KK (<i>CV</i>), %	1,93	12,51	17,14	23,81	8,45	9,09	12,90	1,48	9,64
e ₁	2,0 b	0,95 a	0,43 a	2,9 ab	1,40 b	0,82 b	5,1 a	1,83 bc	0,93 b
e ₂	1,9 bc	0,80 b	0,42 a	2,5 ab	1,48 b	0,80 b	3,9 b	1,92 b	0,83 b
e ₃	1,3 d	0,52 c	0,22 b	2,3 ab	1,23 c	0,63 c	4,1 b	1,6 cd	0,57 b
e ₄	1,6 cd	0,42 c	0,23 b	2,1 b	1,12 c	0,57 c	4,3 b	1,45 d	0,56 c
e ₅	2,9 a	0,95 a	0,47 a	3,1 a	2,25 a	1,20 a	5,8 a	2,37 a	1,30 a
KK(<i>CV</i>), %	12,93	12,51	17,14	2,81	8,45	9,09	12,90	11,48	9,64

m1=MS-0, m2=MS+0,2 mg/l BAP+0,02 mg/l NAA. JT=Jumlah tunas (*number of shoots*), P= panjang daun (*leaf length*), L= lebar daun (*leaf width*), e₁= daun kelopak, e₂= mahkota bunga, e₃=kepala sari, e₄= ovarium, e₅ = penyangga bunga. KK (*CV*): Koefisien keragaman (*Coefficient of variation*), angka rerata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT taraf 5% (*Mean followed the same letter at the same column are not significantly difference based on Duncan Multiple Range Test, p=0.05*).

tanaman dan jumlah tunas meningkat secara nyata dengan konsentrasi optimal pada 7 mg/l. Pada perlakuan tersebut tinggi tunas mencapai 3,5 cm dengan jumlah tunas mencapai 8,0 tunas per explant yang disubkultur (Tabel 3). Sementara peningkatan konsentrasi GA₃ lebih dari 7 mg/l menurunkan pertumbuhan tunas.

Hasil percobaan ini mengindikasikan bahwa aplikasi GA₃ dapat menekan potensi terjadinya roset tunas. Potensi penekanan terhadap terjadinya roset tunas terlihat dari pertambahan panjang internodus dengan hasil terbaik pada aplikasi GA₃ konsentrasi 5–7 mg/l. Pada konsentrasi tersebut, pemberian GA₃ secara eksogen meningkatkan mitosis di daerah subapikal meristem dan menstimulasi pemanjangan sel-sel interkalar sehingga meningkatkan pemanjangan internodus (www.lifes.nchu.edu.tw 2013), serta meningkatkan jumlah meristem aksilar yang kemudian berkembang menjadi tunas-tunas aksilar (MacDonald & Little 2006).

Pengakaran Tunas

Pada percobaan pengakaran tunas, terlihat bahwa media berpengaruh nyata terhadap keberhasilan pengakaran tunas. Inisiasi akar mulai terlihat 7–10 hari setelah tanam. Akar muncul pada bagian pangkal batang. Pada perlakuan pemberian 0,1–0,5 mg/l IAA yang dikombinasikan dengan pemberian dan tanpa arang aktif menunjukkan pertumbuhan jumlah akar yang tidak berbeda nyata antarperlakuan berkisar antara 0,33–3,0 per tunas. Namun, pertumbuhan panjang akar menunjukkan perbedaan yang nyata antarperlakuan. Media MS+0,3–0,5 mg/l IAA+ 1 mg/l arang aktif berpengaruh terhadap pemanjangan akar (Tabel 4).

Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa media MS yang ditambah dengan 0,5 mg/l IAA dan 1 g/l arang aktif merupakan media yang lebih baik dibanding

media yang lain. Media tersebut menginduksi pembentukan akar hingga 2,0 akar per tunas dengan 3,7 cm panjang akar. Penggunaan arang aktif 1g/l mampu menstimulasi panjang akar dibandingkan tanpa menggunakan arang aktif. Sejalan dengan hasil penelitian Winarto (2013) bahwa penggunaan arang aktif 1% mengubah kemampuan medium menginduksi pembentukan akar pada *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre cv. Tropical. Pada penelitian lisianthus yang lain dilaporkan bahwa pengakaran tunas berhasil dilakukan menggunakan media B5 dengan 1,5 mg/l NAA (Mousavi *et al.* 2012b) dan media MS yang ditambah 0,5 mg/l Kin (Esizad *et al.* 2012), sedangkan tunas hasil perbanyakan dari kultur protoplast lisianthus berhasil diakarkan pada media MS+ 5,71 µM IAA (O’ Brien & Lindsay 1993).

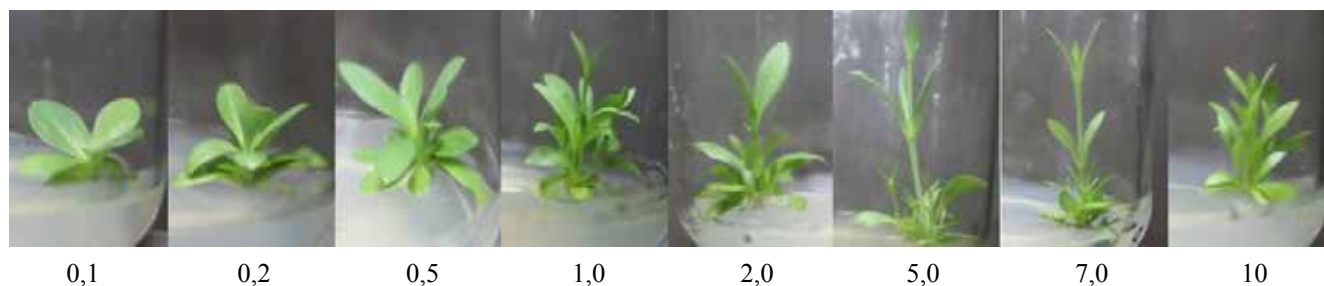
Aklimatisasi Planlet

Tahapan aklimatisasi planlet sebagai berikut: pengambilan planlet dari botol kultur secara hati-hati, perlakuan perendaman akar menggunakan larutan 1% fungisida dan penyungkupan tanaman selama 4 minggu diduga berpengaruh besar terhadap keberhasilan aklimatisasi planlet. Cara ini memungkinkan tanaman mudah beradaptasi dari kondisi *in vitro* ke kondisi *ex vitro*. Keberhasilan aklimatisasi antara 80–100% ditanam pada campuran arang sekam dan *cocopeat* (1:1 v/v). Pada penelitian yang dilakukan oleh Winarto *et al.* (2015) dengan media campuran arang sekam dan pupuk organik (1:1 v/v) keberhasilan aklimatisasi planlet mencapai 90%. Pada penelitian lain lisianthus dari eksplan *shoot tip* yang dipindahkan pada *peat* dan *perlite* (1:1 v/v) setelah *hardening* menunjukkan 100% hidup (Humanities & Social Sciences Collection 2012).

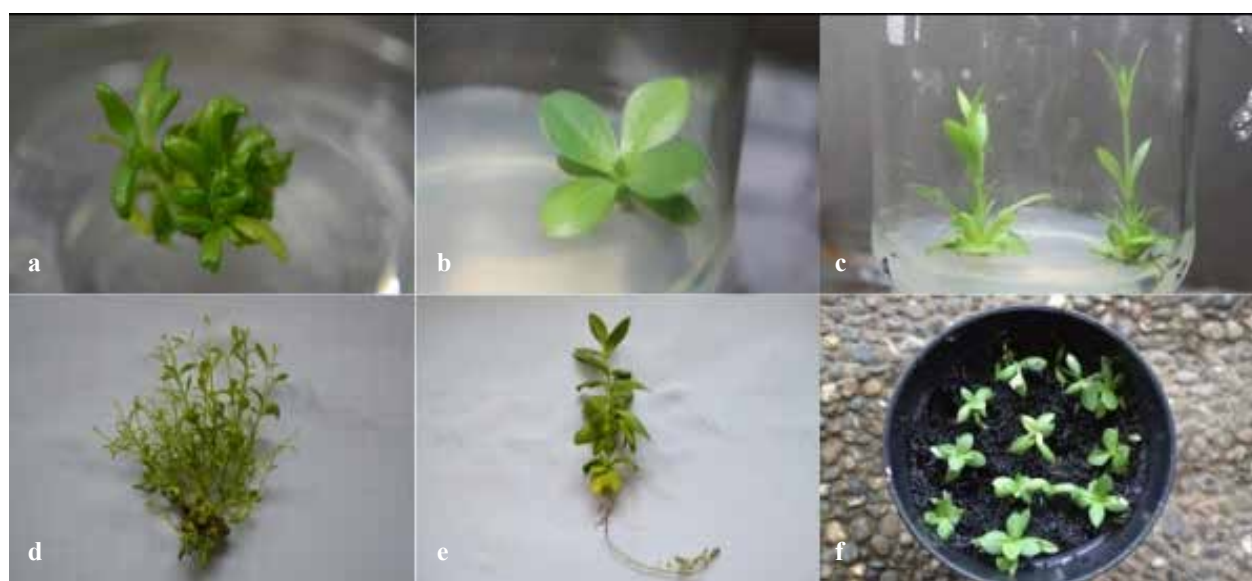
Tabel 3. Pengaruh aplikasi GA₃ terhadap tinggi dan jumlah tunas yang dihasilkan 4 minggu setelah kultur (Effect of GA₃ application on height and number of shoots produced 4 weeks after culture)

Perlakuan GA ₃ (GA ₃ treatment), mg/l	Tinggi tanaman (Plant height), cm	Jumlah tunas (Number of shoot)
0,1	0,0 d	0,0 c
0,2	0,3 d	1,3 c
0,5	0,5 d	1,0 c
1	0,8 cd	1,6 c
2	1,4 bc	5,6 b
5	1,8 b	8,0 a
7	3,5 a	8,0 a
10	1,8 b	2,3 c
KK (CV), %		17,29
		13,4

KK (CV): Koefisien keragaman (Coefficient of variation). Angka rerata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT taraf 5% (Mean followed the same letter at the same column are not significantly difference based on Duncan Multiple Range Test, p=0.05)



Gambar 2. Pertumbuhan planlet lisianthus akibat perlakuan GA_3 (mg/l) [*Growth response lisianthus planlet of GA_3 treatment (mg/l)*]



Gambar 3. Pertumbuhan tunas awal (a), tanaman individu mengalami roset (b), tanaman individu normal (c), pertumbuhan tanaman menggerombol (d), tanaman individu berakar (e), dan aklimatisasi (f) [*Early growth of shoot (a), rosette individu plantlet (b), normal individu plantlet (c), growth of cluster plantlet (d), rooted individu plantlet (e), and acclimatization (f)*]

Tabel 4. Pengaruh media terhadap keberhasilan pengakaran tunas 4 minggu setelah kultur (*Effect of media on the success of shoot rooting 4 weeks after culture*)

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Jumlah akar (<i>Number of roots</i>)	Panjang akar (<i>Root length</i>), cm
MS+0,1mg/l IAA	0,33	0,07 c
MS+0,2mg/l IAA	0,33	0,07 c
MS+0,3mg/l IAA	1,33	0,70 bc
MS+0,4mg/l IAA	1,67	0,07 c
MS+0,5mg/l IAA	3,00	0,70 c
MS+0,1mg/l IAA+ 1 g/l arang aktif	1,67	1,60 abc
MS+0,2mg/l IAA+ 1 g/l arang aktif	1,33	1,60 abc
MS+0,3mg/l IAA+ 1 g/l arang aktif	1,33	2,70 ab
MS+0,4mg/l IAA+ 1 g/l arang aktif	2,00	2,50 ab
MS+0,5mg/l IAA+ 1 g/l arang aktif	2,00	3,70 a
KK (<i>CV</i>), %	25,67	18,37

KK (*CV*): Koefisien keragaman (*Coefficient of variation*). Data telah ditransformasi menggunakan angka rerata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT taraf 5% (*Data transformed used, mean followed the same letter at the same column are not significantly difference based on Duncan Multiple Range Test, $p=0.05$*)

KESIMPULAN DAN SARAN

Teknologi perbanyakan masal lisianthus secara *in vitro* dapat dikembangkan menggunakan kuncup bunga sebagai sumber eksplan. Eksplan penyangga bunga merupakan eksplan paling responsif dalam inisiasi tunas dan perbanyakan tunas hasil inisiasi pada media MS + 0,2 mg/l BAP + 0,02 mg/l NAA dengan waktu inisiasi tunas 9–10 minggu, persentasi regenerasi mencapai 40–66,67% dengan jumlah tunas 4–5 tunas per eksplan. Pada tahap berikutnya untuk mencegah roset, media MS yang ditambah 7 mg/l GA₃ mampu meningkatkan panjang tunas hingga 3,5 cm dan pertumbuhan tunas aksilar delapan tunas per planlet. Pada tahap pengakaran, media MS yang mengandung 0,5 mg/l IAA dan 1 g/l arang aktif optimal meningkatkan jumlah akar dan panjang akar mencapai 3,7 cm. Planlet tersebut mampu diaklimatisasi menggunakan campuran arang sekam dan *cocopeat* (1:1 v/v) dengan tingkat keberhasilan mencapai 80–100%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Arpana, M, Singh, MK, Raja, R, Kumar, S, Prasad, R & Ahuja, PS 2012, 'Effect of *in vivo* and *in vitro* seed germination and performance of lisianthus seedlings', *Indian J. Hort.*, vol. 69, no. 1, pp. 136-9.
2. Demas, A 2009, 'Budidaya lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) di Bali Rose, PT. Mid Duta Internasional, Mayungan, Bali', Skripsi, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
3. Esizad, SG, Kaviani, B, Tarang, A & Zanjani, SB 2012, 'Micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), an ornamental plant', *POJ*, vol. 5, no. 3, pp. 314-9.
4. Gamborg, OL, Miller, RA & Ojima, K 1968, 'Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells', *Exp. Cell Res.*, vol. 50, pp. 151-8.
5. Gaspersz, V 1991, *Teknik analisis dalam penelitian percobaan*, Tarsito, Bandung, 623 hlm.
6. Humanities & Social Sciences Collection 2012, 'Micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)', *An Ornamental Plan, Plant Omics*, vol. 5, no. 3, pp. 314-9.
7. Khaleghi, A, Khalighi, A, Sahraro, A, Karimi, A, Rasoulnia, A, Ghafoori, IN & Atei, R 2008, 'In vitro propagation of *Alstromeria* cv. Fuego', *American-Eurasian. J. Agric. & Environ. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 492-7.
8. Kumar, S & Kanwar, JK 2006, 'Regeneration ability of petiole, leaf, and petal explants in gerbera cut flower culture in vitro', *Folia Horticulturae*, vol. 18, no. 2, pp. 57-64.
9. MacDonald, JE & Little, CHA 2006, 'Foliar application of GA₃ during terminal long-shoot bud development stimulates shoot apical meristem activity in *Pinus sylvestris* seedlings', *Tree Physiol*, vol. 10, pp. 1271-6.
10. Meliala, LA 2011, 'Pengelolaan usaha bunga potong Lisianthus di PT. Saung Mirwan, Megamendung, Bogor, Jawa Barat', Skripsi, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
11. Mousavi, ES, Behbahani, M, Hadavi, E & Miri, SM 2012a, 'Callus induction and plant regeneration in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)', *Trakia J. Sci.*, vol. 10, no 1, pp 22-5.
12. Mousavi, ES, Behbahani, M, Hadavi, E, Miri, SM & Karimi, N 2012b, 'Plant regeneration in *Eustoma grandiflorum* from axillaries buds (Gentianaceae)', *Trakia J. Sci.*, vol. 10, no 2, pp. 75-8.
13. 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.
14. Nhut, DT, Tuan, NS, Ngoc, HM, Uyen, PN, Don, NT, Mai, NT & Teixeira Da Silva, JA 2006, 'Somatic embryogenesis induction from *in vitro* leaf culture of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.)', *Prop. Orn. Plants*, vol. 6, no.3, pp. 121-7.
15. O'Brien, IEW & Lindsay, GC 1993, 'Protoplast to plants of *Gentianaceae*. Regeneration of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) is affected by calcium ion preconditioning, osmoality and pH of the culture media', *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 33, no. 1, pp. 31-7.
16. Paek, KY & Hahn, EJ 2000, 'Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.]', *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, vol. 36, pp. 118-24.
17. Popa, G, Cornea, CP & Brezeanu, A 2006, 'Influence of different agrobacterium rhizogenes strain on hairy roots induction in *Eustoma grandiflorum*', *Roumanian Biotechnological Letters*, vol. 11, no 1, pp. 2587-92.
18. Rezaee, F, Ghanati, F & Boroujeni, LY 2012, 'Micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) from different explants to flowering onset', *Iranian J. Plant Physiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 583 - 7.
19. Semeniuk, P & Griesbach, RJ 1987, 'In vitro propagation of prairie gentian', *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, vol. 8, pp. 249-53.
20. Shimizu, H & Ichimura, K 2005, 'Effect of silver thiosulfate complex (STS), sucrose and their combination on the quality and vase life of cut *Eustoma* flowers', *Japan. Soc. Hort. Sci.*, vol. 47, pp. 381-5.
21. Shylaja, MR, Sashna, P, Chinjusha, V & Nazeem, PA 2014, 'An efficient micropropagation protocol for *Gerbera jamesonii* Bolus from flower buds', *Int. J. Plant, An. Environ. Sci.*, vol. 4, no. 3, pp. 641-3.
22. Vardja, R & Vardja, T 2001, 'Effect of cytokinin type and concentration and the number of subcultures on the multiplication rate of some decorative plants', *Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol.*, vol. 50, no. 1, pp. 22–32.
23. Vujović, T, Ružić, DJ & Cerović, R 2012, 'In vitro shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks', *Hort. Sci. (Prague)*, vol. 39, no. 3, pp. 101-7.
24. Winarto, B 2013, 'Studi penyiapan akar berkualitas untuk uji kromosom dan penggandaan kromosom planlet hasil kultur anter anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden ex Andre) cv Tropical', *J. Hort.*, vol. 23, no. 3, pp. 203-17.
25. Winarto, B & Setyawati, AS 2014, 'Young shoot nodes derived organogenesis *in vitro* in mass propagation of *Ruscus hypophyllum* L. South Western', *J. Hort. Biol. Environ.*, vol. 5, no.2, pp. 63-82.
26. Winarto, B, Rachmawati, F, Setyawati, AS & Da Silva, JAT 2015, 'Leaf-derived organogenesis *in vitro* for mass propagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn)', *Emirates Journal of Food and Agriculture.*, vol. 27, pp. 1-7.
27. www.lifes.nchu.edu.tw, 'Gibberellins : Regulators of plant Height', viewed 23 Desember 2013.
28. Yamada, A, Tanigawa, T, Suyama, T, Matsuno, T & Kunitake, T 2008, 'Night break treatment using different light sources promotes or delays growth and flowering of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn', *J.Jap. Soc. Hort. Sci.*, vol. 77, no. 1, pp. 69-74.