

**REGENERASI KRISAN (*Chrysanthemum morifolium*) cv.PUSPITA
NUSANTARA *IN VITRO* MELALUI PERBANYAKAN TUNAS
AKSILAR, ORGANOGENESIS, DAN AKLIMATISASI PLANTLET**

Tesis

Oleh

DESI MAULIDA



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER AGRONOMI
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRAK

Regenerasi Krisan (*Chrysanthemum morifolium*) cv. Puspita Nusantara In vitro Melalui Perbanyak Tunas Aksilar, Organogenesis, dan Aklimatisasi Plantlet

Oleh

Desi Maulida

Krisan merupakan tanaman hias penting dalam perdagangan tanaman hias dunia. Selain sebagai tanaman hias, bunga krisan dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Permintaan akan bunga krisan yang terus meningkat perlu diantisipasi dengan teknik budidaya dan program pemuliaan tanaman yang baik guna memenuhi permintaan pasar domestik dan internasional. Regenerasi tanaman *in vitro* atau teknik kultur jaringan dapat digunakan untuk memproduksi propagul *true-to-type* dalam jumlah besar dalam waktu relatif singkat tanpa dipengaruhi oleh musim, sehingga dapat dilakukan sepanjang tahun. Di samping itu, teknik kultur jaringan juga dapat digunakan sebagai teknik yang efisien untuk pemuliaan tanaman melalui induksi keragaman somaklonal. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari studi regenerasi *in vitro* krisan cv. Puspita Nusantara melalui perbanyak tunas aksilar, organogenesis dari eksplan daun, dan aklimatisasi plantlet. Dalam serangkaian studi di atas, dilakukan tiga percobaan yaitu (I) regenerasi *in vitro* tanaman krisan dengan perbanyak tunas aksilar dari eksplan batang satu buku; (II) organogenesis dari eksplan daun; serta (III) aklimatisasi plantlet. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari bulan Agustus 2015 sampai dengan April 2016.

Percobaan I dan III, menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) tiga ulangan, masing-masing dengan perlakuan faktor tunggal. Pada Percobaan II, data akan diolah menggunakan Standar Error (SE). Percobaan I bertujuan untuk mempelajari pengaruh arang aktif (AC) (2 g/l), benziladenin (BA 0,5, 1, dan 2 mg/l) atau kinetin (0,5, 1, dan 2 mg/l) terhadap pertumbuhan dan perbanyak tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro*. Setiap unit percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang masing-masing berisi 4 eksplan potongan batang satu buku. Tinggi tunas, jumlah tunas per eksplan, jumlah daun, jumlah buku, jumlah akar primer dan bobot segar tanaman per eksplan diamati setelah 6 minggu pengulturan eksplan. Percobaan IIa bertujuan untuk mempelajari pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap induksi kalus pada eksplan potongan daun krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro*, dilanjutkan dengan percobaan IIb, yaitu

pengaruh perlakuan yang sama (seperti pada percobaan IIa) terhadap induksi tunas apabila eksplan berkalus ditransfer ke media induksi tunas (MS + 0,1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA). Pada percobaan IIa konsentrasi 2,4-D yang dicobakan adalah 0, 0,25, 0,5, 1, 2 dan 3 mg/l. Setiap unit percobaan terdiri dari 5 botol kultur yang masing-masing berisi satu eksplan potongan daun. Persentase eksplan berkalus dan intensitas kalus yang terbentuk, yang diukur dengan cara skoring yang dilengkapi dengan penampilan visual eksplan berkalus diamati setelah 4 minggu pengulturan eksplan. Pada percobaan IIb, persentase eksplan yang membentuk tunas adventif dan jumlah tunas adventif per eksplan diamati setelah delapan minggu pengulturan eksplan berkalus. Percobaan III bertujuan untuk mempelajari pengaruh campuran media aklimatisasi (kompos+pasir malang, kompos+arang sekam, arang sekam) terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan plantlet selama aklimatisasi. Setiap unit percobaan terdiri dari 10 plantlet berukuran seragam. Persentase dari plantlet yang hidup jumlah daun, tinggi tanaman, jumlah akar, panjang akar dan bobot segar plantlet diamati setelah delapan minggu plantlet dalam kondisi *ex vitro*.

Hasil percobaan I menunjukkan bahwa setelah eksplan satu buku ditanam selama enam minggu pada media perlakuan, respons yang teramati berbeda-beda. Penambahan 2 gr/l arang aktif ke dalam media MS (MSA) meningkatkan tinggi tunas, jumlah daun, dan jumlah akar tunas krisan. Penambahan BA pada konsentrasi 0,5, 1, dan 2 mg/l ke dalam media MS menghasilkan tunas yang lebih pendek dan jumlah akar yang lebih sedikit, namun jumlah daun, buku dan tunasnya lebih banyak daripada kontrol. Penambahan 0,5 mg/l BA menghasilkan bobot segar tunas yang tidak berbeda dengan kontrol, namun penambahan 1 mg/l BA meningkatkan bobot segar tunas, sedangkan penambahan 2 mg/l BA menghasilkan bobot segar tunas yang lebih kecil. Penambahan 0,5 mg/l BA ke dalam media MS meningkatkan jumlah daun, buku dan tunas. Peningkatan konsentrasi BA dari 0,5 menjadi 1 mg/l menambah nilai rata-rata jumlah daun, buku dan tunas, namun perlakuan 2 mg/l BA menghasilkan jumlah tunas yang lebih sedikit daripada yang dihasilkan oleh perlakuan 0,5 dan 1 mg/l BA. Penambahan kinetin (0,5, 1,0, 2,0 mg/l) ke dalam media MS menghasilkan jumlah tunas yang tidak berbeda, namun lebih pendek, dengan jumlah daun, jumlah akar, jumlah buku dan bobot segar yang lebih kecil daripada kontrol maupun MSA.

Hasil percobaan IIa menunjukkan bahwa baik di media tanpa 2,4-D maupun dengan penambahan 0,25 – 3 mg/l 2,4-D, semua (100%) eksplan daun membentuk kalus, namun intensitas kalus meningkat dengan penambahan 2,4-D mulai dari 0,25 mg/l. Peningkatan konsentrasi 2,4-D dari 0,25 hingga 3 mg/l secara konsisten meningkatkan intensitas kalus yang terbentuk. Pada perlakuan kontrol dan 1,25 dan 0,5 mg 2,4-D, semua eksplan daun membentuk akar, namun persentasenya menurun (80-95%) pada perlakuan 1-3 mg/l 2,4-D. Penambahan 2,4-D maupun peningkatan konsentrasi 2,4-D dari 0,25 menjadi 1, 2 atau 3 mg/l cenderung menurunkan jumlah akar yang terbentuk.

Hasil percobaan IIb menunjukkan bahwa setelah ditransfer ke media induksi tunas selama 2 bulan, eksplan berkalus yang berasal dari semua perlakuan dapat

membentuk tunas adventif dengan persentase yang beragam. Persentase eksplan bertunas tertinggi (63%) didapatkan pada perlakuan kontrol, 0,25 dan 0,5 mg/l 2,4-D, sedangkan perlakuan 1, 2 dan 3 mg/l 2,4-D menghasilkan persentase eksplan bertunas yang lebih kecil, yaitu berturut-turut 50%, 38% dan 38%. Walaupun demikian, dibandingkan dengan kontrol yang menghasilkan 5,4 tunas/eksplan, rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan lebih banyak pada perlakuan dengan penambahan 2,4-D, yaitu 6-9,8 tunas/eksplan. Jumlah tunas adventif terbanyak (9,8 tunas/eksplan) didapat pada perlakuan 0,5 mg/l 2,4-D.

Hasil percobaan III menunjukkan bahwa pada umur 2 bulan sejak planlet dikeluarkan dari botol, penggunaan campuran media aklimatisasi yang berbeda yaitu kompos+pasir malang, kompos+arang sekam, maupun arang sekam menghasilkan keberhasilan aklimatisasi yang relatif tinggi yaitu 73-87%. Media arang sekam menghasilkan persentase keberhasilan aklimatisasi tertinggi (87%) dengan rata-rata tinggi tanaman dan bobot segar tanaman yang lebih besar daripada kompos+pasir malang, kompos+arang sekam, namun media kompos+pasir malang menghasilkan akar lebih banyak dan lebih panjang daripada dua campuran media lainnya.

Kata Kunci : krisan, *in vitro*, tunas aksilar, tunas adventif, organogenesis, aklimatisasi, BA, kinetin, 2,4-D, dan TDZ.

ABSTRACT

***In Vitro* Regeneration Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cv. Puspita Nusantara through Axillary Branching, Indirect Organogenesis, and Plantlet Acclimatization**

By

Desi Maulida

Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) is one of the most popular ornamental plants used as cut flowers and pot flowers in many parts of the world, including Indonesia. It is also known as an important medicinal plant. Demand for this flower is continuously increasing, so that it needs to be anticipated with efficient plant propagation and plant breeding programs to meet both domestic and international market. Plant regeneration *in vitro* or tissue culture techniques can be used to produce a large number of true-to-type propagules in a relatively short time without being influenced by the seasons, thus can be done through out the year. Tissue culture technique can also be used to support plant breeding programs since it can induce the incidence of somaclonal variations among the regenerants. This research aimed to investigate *in vitro* plant regeneration through axillary branching, indirect organogenesis from leaf explants, and plantlet acclimatization in chrysanthemum cv. Puspita Nusantara. Three experiments were conducted at The Plant Science Laboratory of Faculty of Agriculture, The University of Lampung from August 2015 to April 2016, namely (I) Effects of activated charcoal, cytokinin types (benzyladenine-BA or kinetin) and concentrations on shoot regeneration through axillary branching; (II) Effects of 2,4-D concentrations on callus formation and organogenesis from leaf explants; and (III) Effects of potting media on plantlet acclimatization and growth. All experiments were conducted in completely randomized design with three replicates. Each experimental unit in experiment I consisted of 3 culture vessels, each of which contained 4 nodal explants, while those in experiment II consisted of 5 culture vessels each of which contained 1 leaf segment as explant. In experiment III, each experimental unit consisted of 10 uniform plantlets,

In experiment I, one-node explants taken from *in vitro*-derived shoots were cultured on MS (Murashige and Skoog, 1962) devoid growth regulator as control, and MS with addition of 2 g/l activated charcoal (AC) or 0,5, 1 and 2 mg/l BA or 0,5, 1 and 2 mg/l kinetin as treatments. Shoot lengths, number of leaves, number of roots, number of nodes, number of shoots and shoot fresh weight per explant were recorded at 6 weeks of culture. In experiment IIa, leaf segments (1 x 1) cm² with main veins in the middle were cultured on MS media containing various

concentrations of 2,4-D (0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 3 mg/l). Percentage of explants-forming callus, scoring of the callus intensity, percentage of explants-forming roots and average number of roots per explant were recorded at 4 weeks of culture. Subsequently, the explant-forming callus from the previous 2,4-D concentrations were subcultured to shoot-inducing medium (MS + TDZ + BA) and incubated in the culture room (experiment IIb). The percentage of explants-forming adventitious shoots and number of shoots per explant were recorded after 2 months of culture. In experiment III, rooted shoots of the same size were planted in Ø 5 cm plastic pots containing one of three media mixtures (compost:sand, 1:1 v/v; compost:rice husk-charcoal, 1:1, v/v or rice husk-charcoal alone), then were placed in a bench of a shaded green house for acclimatization. The plantlet survival and growth as shown by percentage of the living plantlets, plant heights, number leaves, number of roots, length of roots and plant fresh weights were recorded at eight weeks in *ex vitro* condition. Data from Experiment I and III were subjected to analysis of variance (ANOVA) and if there was any significant difference among treatments, the difference between treatment means were separated using least significant difference (LSD) at $\alpha = 5\%$. In experiment II, the mean values of each parameter and standard error of the means (SE) were calculated from the observed data.

Results of experiment I showed that after 6 weeks of culture, nodal explants showed different responses. Addition of AC in the MS medium increased shoot lengths, number of leaves, and number of roots. Addition of 0.5, 1 and 2 mg/l BA in to MS produced shorter shoots and less number of roots. However, the number of leaves, nodes and shoots per explant were higher than those of the control treatment. Addition of 0.5 mg/l BA did not affect shoot fresh weight. However, addition 1 mg/l BA increased shoot fresh weight significantly, whereas addition of 2 mg/l BA decreased shoot fresh weight. Addition of BA at 0.5 mg/l BA increased number of leaves, nodes and shoots, and increasing BA to 1 mg/l resulted in further increase in number of leaves, nodes and shoots to be the highest values. However, addition of 2 mg/l BA produced less number of leaves, nodes and shoots compared to those at 0.5 dan 1 mg/l BA. Addition of kinetin at all levels (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) did not affect number of shoots. Even worse, these treatments resulted in shorter shoots with decreased number of leaves, roots, nodes and less fresh weight than those in the control treatment.

Results of experiment IIa showed that all of the treatments assigned could induce 100% callus formation from leaf explants, including the control treatment devoid 2,4-D. Callus intensity increased with the increase of 2,4-D concentrations added to the media, starting from 0.25 mg/l. Increasing 2,4-D concentration from 0.25 – 3 mg/l consistently increased the callus intensity, so that the highest callus intensity was obtained at 2,4-D 3 mg/l. On the contrary to callus formation, addition and increasing concentration of 2,4-D from 0.25 to 1, 2 or 3 mg/l tend to decrease root formation from explants. Results of experiment IIb showed that after being transferred to shoot-inducing medium, explant-forming callus from various treatments of 2,4-D were induced to form shoots at various frequency, i.e., control, 0.25 dan 0.5 mg/l 2,4-D produced 63% explant forming adventitious shoots, where as treatments with 1, 2 dan 3 mg/l 2,4-D produced 50%, 38% and

30% explants forming shoots, respectively. However, when compared to control which produced 5,4 shoots per explant, treatments with 2,4-D produced 6-9,8 shoots per explant, with the highest number of shoots (9,8) obtained at 0,5 mg/l 2,4-D.

Results of experiment III showed that at 2 months after being acclimatized in *ex vitro* condition, different potting media tested resulted in 73-87% plantlet survival, the highest being the rice-husk charcoal (87%), followed by compost: rice husk-charcoal, 1:1, v/v (77%) and compost:sand, 1:1 v/v (73%). The rice-husk charcoal medium also produced the highest plant height and fresh weight. However, medium compost:sand, 1:1 v/v produced more and longer roots compared with other media.

Key Words : chrysanthemum, *in vitro*, axillary branching, organogenesis, acclimatization, BA, kinetin, 2,4-D, and TDZ, adventitious shoots.

**REGENERASI KRISAN (*Chrysanthemum morifolium*) cv.PUSPITA
NUSANTARA *IN VITRO* MELALUI PERBANYAKAN TUNAS
AKSILAR, ORGANOGENESIS, DAN AKLIMATISASI PLANTLET**

Oleh

DESI MAULIDA

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS

Pada

Program Studi Pascasarjana Magister Agronomi
Fakultas Pertanian Universitas Lampung



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER AGRONOMI
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

Judul Tesis

**: REGENERASI KRISAN (*Chrysanthemum morifolium*) cv. PUSPITA NUSANTARA
IN VITRO MELALUI PERBANYAKAN
TUNAS AKSILAR, ORGANOGENESIS,
DAN AKLIMATISASI PLANTLET**

Nama Mahasiswa

: Desi Maulida

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1424011002

Program Studi

: Magister Agronomi

Jurusan

: Agroteknologi


Fakultas

: Pertanian




MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.
NIP 19610803 198603 2 002


Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.
NIP 19610402 198603 1 003

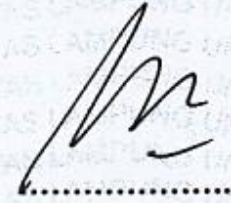
2. Ketua Program Studi Magister Agronomi


Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.
NIP 19610803 198603 2 002

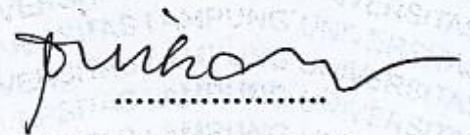
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

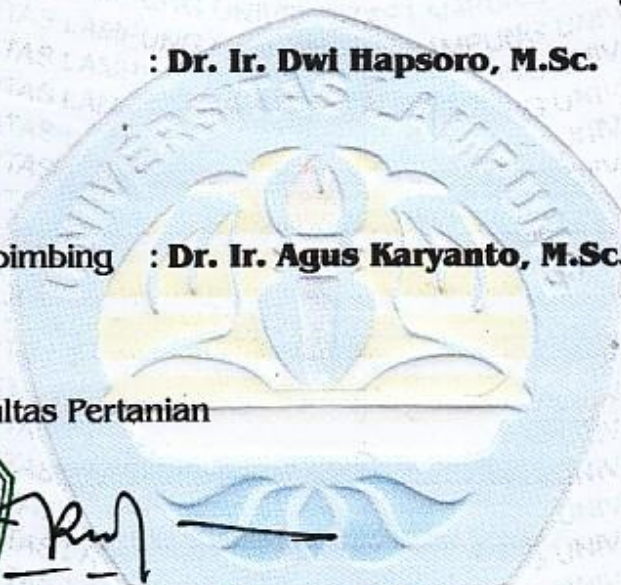
Ketua : Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.



Anggota : Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.



**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Ir. Agus Karyanto, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP 19611020 198603 1 002



3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. Sudjarwo, M.S.
NIP 19530528 198103 1 002



Tanggal Lulus Ujian Tesis : 28 Juni 2016

LEMBAR PERNYATAAN

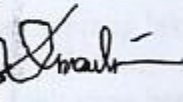
Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Tesis dengan judul "REGENERASI KRISAN (*Chrysanthemum morifolium*) cv. PUSPITA NUSANTARA *IN VITRO* MELALUI PERBANYAKAN TUNAS AKSILAR, ORGANOGENESIS, DAN AKLIMATISASI PLANTLET" adalah karya saya sendiri dan saya tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Pembimbing penulisan tesis ini berhak mempublikasikan sebagian atau seluruh isi tesis ini pada jurnal ilmiah dengan mencantumkan nama saya sebagai salah satu penulisnya.
3. Hak intelektual karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Unila.

Apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya, dan saya bersedia dan sanggup dituntut sesuai dengan hukum yang berlaku.



Bandar Lampung, 28 Juni 2016
Pembuat Pernyataan,


Desi Maulida
NPM 1424011002

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Bandar Lampung, pada tanggal 18 Desember 1982. Penulis merupakan anak keenam dari enam bersaudara dari bapak Tetra Isnaini (Almarhum) dan ibu Masitoh.

Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 1 Sukajawa pada tahun 1994, pada tahun 1997 Penulis menyelesaikan pendidikan di SLTPN 1 Bandar Lampung, dan menyelesaikan pendidikan di SMUN 12 Bandar Lampung pada tahun 2000, pada tahun 2003 Penulis menyelesaikan pendidikan di Politeknik Negeri Lampung, Jurusan Budidaya Tanaman Pangan, Program Studi Hortikultura. Selanjutnya pada tahun 2006 Penulis diterima di Universitas Lampung, Fakultas Pertanian, Jurusan Budidaya Pertanian, Program Studi Hortikultura melalui alih program dari Politeknik Negeri Lampung. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di Pascasarjana Universitas Lampung pada Program Studi Magister Agronomi pada tahun 2014.

Sejak tahun 2005 penulis bekerja pada Politeknik Negeri Lampung hingga sekarang. Penulis telah menikah pada tahun 2008 dengan seorang laki-laki yang bernama Dwi Puji Hartono dan telah dikaruniai tiga orang anak yang bernama M. Adyaraka Fardhan Hartono, Fathan M. Hafidz Hartono, dan Kayla Shidqia Azzahra Hartono.

MOTO

“Barang siapa menginginkan kebahagiaan di dunia dan di akhirat
maka haruslah memiliki banyak ilmu”

(HR. Ibnu Asakir)

“Pendidikan merupakan perlengkapan paling baik untuk hari tua”

(Aristoteles)

PERSEMBAHAN

Tesis ini kupersembahkan kepada orang-orang yang kucintai dan kusayangi :

1. Amih Masitoh dan Almarhum Apih Tetra Isnaini, Mak Tatiah, dan Bapak Sutoyo.
2. Teristimewa suamiku Dwi Puji Hartono, S.Pi.,M.Si.
3. Ketiga belah hatiku M. Adyaraka Fardhan Hartono, Fathan M. Hafidz Hartono, dan Kayla Shidqia Azzahra Hartono.
4. Kakak kakakku Fajarita Riesmawati, Diah safitri, Ratih Maysaroh, Rahmat Ramadhan, dan M. Ichwan.

SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian, dan penyusunan tesis ini. Penulis banyak mendapatkan bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, untuk itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc., selaku pembimbing pertama dan Ketua Program Studi Magister Agronomi yang telah memberikan ide penelitian, gagasan, bimbingan, bantuan, perhatian, saran, dan masukan serta motivasinya, sehingga penulis dapat melakukan penelitian dan menyelesaikan penulisan tesis ini.
2. Bapak Dr.Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc., selaku pembimbing kedua dan pembimbing akademik, yang telah memberikan bimbingan, masukan, saran, motivasi, dan bantuannya selama penelitian dan penyelesaian penulisan tesis ini.
3. Bapak Dr. Ir. Agus Karyanto, M.Sc., selaku pembahas dan penguji atas saran, arahan, bantuan, dan motivasi untuk penulisan tesis ini.
4. Ibu Dr. Ir. Tumiar K. Manik, M.Sc., selaku Sekretaris Program Studi Magister Agronomi atas bimbingan, arahan, dan motivasinya dalam menyelesaikan pendidikan.
5. Keluarga Penulis Ibu Masitoh, Alm Tetra Isnaini, suami Dwi Puji Hartono, S.Pi.,M.Si., dan anak anak M. Adyaraka Fardhan Hartono, Fathan Muhammad

Hafidz Hartono dan Kayla Shidqia Azzahra Hartono atas doa dan dukungan yang diberikan kepada Penulis.

6. Hayane A. Warganegara, S.P., M.Si., Wiwik, Resti, Yenni, Yanti, Rezlinda, Ria, Syanda, Vanny, dan Rifky, Mba Leni, Mba Endang, dan Mba Nur, sebagai anggota keluarga besar Laboratorium Kultur Jaringan yang telah memberi bantuan dan semangat juang.
7. Sahabat seperjuangan Budi Sulystiawan, atas persahabatan, bantuan, dan kerjasamanya dalam melaksanakan penelitian dan penulisan tesis. Jamalludin, Henni Elvandari, Gregious Edo Prakoso, Nyang Vania Putri, Kresna Usodri, Eko Abadi Saputra, Ovy Elvandari, Novi, Dini, David Chandra, Lucky, Pak Kusmanto, dan teman-teman Magister Agronomi atas bantuan tenaga dan dukungan moril selama penelitian ini.
8. Dosen dan PLP Hortikultura serta anggota keluarga besar Laboratorium Kultur Jaringan Polinela, atas segala saran, kerjasama, dan bantuan yang diberikan kepada Penulis.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penulisan tesis ini.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi yang membacanya, Amin.

Bandar Lampung, Juni 2016
Penulis

Desi Maulida

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang dan Masalah	1
1.2 Tujuan Penelitian	7
1.3 Kerangka Pemikiran	8
1.4 Hipotesis	13
II. TINJAUAN PUSTAKA	14
2.1 Krisan	14
2.2 Kultur Jaringan	16
2.3 Zat Pengatur Tumbuh	19
2.3.1 BA (<i>Benzyladenin</i>)	19
2.3.2 TDZ (<i>Thidiazuron</i>)	20
2.3.3 2,4-D (<i>2,4-Diklorofenoksiasetat</i>)	21
2.4 Aklimatisasi	22
III. BAHAN DAN METODE	26
3.1 Percobaan I : Pengaruh arang aktif, benziladenin (BA) atau kinetin terhadap pertumbuhan dan perbanyakan tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara in vitro.....	26
3.1.1 <i>Bahan Tanaman</i>	26
3.1.2 <i>Disain Percobaan, Pengamatan, dan Analisis Data</i>	27
3.1.3 <i>Pelaksanaan Percobaan</i>	28
3.1.3.1 <u>Persiapan Alat</u>	28
3.1.3.2 <u>Pembuatan Media Kultur</u>	28
3.1.3.3 <u>Penanaman Eksplan dan Kondisi Ruang Kultur</u>	29

3.2 Percobaan II : Induksi kalus dan organogenesis <i>in vitro</i>	29
3.2.1 <i>Bahan Tanaman</i>	30
3.2.2 <i>Disain Percobaan, Pengamatan, dan Analisis Data</i>	30
3.2.3 <i>Pelaksanaan Percobaan</i>	32
3.2.3.1 <u>Pembuatan Media Kultur</u>	32
3.2.3.2 <u>Penanaman Eksplan dan Kondisi Ruang Kultur</u>	33
3.3 Percobaan III : Pengaruh Campuran Media Tanam Terhadap Keberhasilan Aklimatisasi dan Pertumbuhan Plantlet Krisan cv. Puspita Nusantara.	34
3.3.1 <i>Bahan Tanaman</i>	34
3.3.2 <i>Disain Percobaan, Pengamatan, dan Analisis Data</i>	34
3.3.3 <i>Pelaksanaan Percobaan</i>	35
3.3.3.1 <u>Pencampuran Media Aklimatisasi</u>	35
3.3.3.2 <u>Cara Aklimatisasi Plantlet</u>	35
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Hasil Penelitian	37
4.1.1 <i>Percobaan I : Pengaruh arang aktif, benziladenin (BA) atau kinetin terhadap pertumbuhan dan perbanyakan tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara in vitro.</i>	37
4.1.1.1 <u>Perkembangan umum kultur</u>	37
4.1.1.2 <u>Tinggi tunas</u>	39
4.1.1.3 <u>Jumlah daun</u>	40
4.1.1.4 <u>Jumlah akar</u>	41
4.1.1.5 <u>Jumlah buku</u>	42
4.1.1.6 <u>Jumlah tunas</u>	43
4.1.1.7 <u>Bobot segar</u>	44
4.1.1.8 <u>Subkultur tunas krisan hasil perlakuan BA dan kinetin ke dalam media MS tanpa ZPT</u>	45
4.1.2 <i>Percobaan II : Induksi kalus dan organogenesis in vitro.</i>	46
4.1.2.1 <u>Perkembangan umum eksplan</u>	46
4.1.2.2 <u>Pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap induksi kalus pada eksplan potongan daun krisan cv. Puspita Nusantara in vitro.</u>	48
4.1.2.3 <u>Pengaruh pemberian sitokinin TDZ + BA terhadap induksi tunas adventif dari eksplan berkalus akibat induksi kalus dengan berbagai konsentrasi 2,4-D</u>	51

4.1.3 <i>Percobaan III : Pengaruh campuran media tanam terhadap keberhasilan aklimatisasi dan pertumbuhan plantlet krisan cv. Puspita Nusantara</i>	53
4.1.3.1 <u>Persentase plantlet hidup</u>	53
4.1.3.2 <u>Tinggi tanaman</u>	54
4.1.3.3 <u>Jumlah daun</u>	55
4.1.3.4 <u>Jumlah akar</u>	56
4.1.3.5 <u>Panjang akar</u>	57
4.1.3.6 <u>Bobot segar</u>	58
4.2 Pembahasan.....	60
V. KESIMPULAN DAN SARAN	70
5.1 Kesimpulan	70
5.1 Saran	72
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN	78

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Rekapitulasi hasil pengamatan pengaruh arang aktif, benziladenin (BA) atau kinetin terhadap pertumbuhan dan perbanyak tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara <i>in vitro</i> pada 6 minggu pengulturan.	39
2. Respons 2,4-D terhadap induksi kalus dan akar pada eksplan potongan daun krisan cv Puspita Nusantara pada umur 4 minggu setelah tanam (\pm Standard Error/SE).	48
3. Rata-rata jumlah eksplan membentuk tunas dan jumlah tunas per eksplan dari eksplan yang responsif yang diamati pada 2 bulan setelah tanam di media 0,1 mg/l TDZ+0,5 mg/l BA (\pm Standard Error/SE).	51
4. Rekapitulasi analisis ragam dan hasil uji BNT pengaruh berbagai pengamatan media aklimatisasi terhadap keberhasilan aklimatisasi dan pertumbuhan planlet krisan cv. Puspita Nusantara setelah dua bulan.	53
5. Rata-rata tinggi tunas krisan cv. Puspita Nusantara 6 minggu setelah tanam.	78
6. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata tinggi tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin.	78
7. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata tinggi tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	78
8. Rata-rata jumlah daun tunas krisan cv. Puspita Nusantara 6 minggu setelah tanam	79
9. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata jumlah daun tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin.	79
10. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata jumlah daun tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	79

11. Rata-rata jumlah akar tunas krisan cv. Puspita Nusantara 6 minggu setelah tanam.	80
12. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata jumlah akar tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin.	80
13. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata jumlah akar tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	80
14. Rata-rata jumlah buku tunas krisan cv. Puspita Nusantara 6 minggu setelah tanam.	81
15. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata jumlah buku tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin.	81
16. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata jumlah buku tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	81
17. Rata-rata jumlah tunas krisan cv. Puspita Nusantara 6 minggu setelah tanam.	82
18. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata jumlah tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin.	82
19. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata jumlah tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin. menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	82
20. Rata-rata bobot segar tunas krisan cv. Puspita Nusantara 6 minggu setelah tanam.	83
21. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata bobot segar tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin.	83
22. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata bobot segar tunas krisan cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	83

23. Pengamatan eksplan daun krisan cv. Puspita Nusantara pada 4 MST.....	84
24. Data pengamatan eksplan berkalus yang ditanam pada media 0,5 mg/l BA + 0,1 mg/l TDZ selama 2 bulan.....	89
25. Rata-rata persentase hidup krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.	92
26. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata persentase hidup krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.	92
27. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata persentase hidup krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	92
28. Rata-rata tinggi tanaman krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.	93
29. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata tinggi tanaman krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.	93
30. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata tinggi tanaman krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	93
31. Rata-rata jumlah daun krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.	94
32. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata jumlah daun krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.	94
33. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata jumlah daun krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.	94

34. Rata-rata jumlah akar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.95
35. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata jumlah akar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.95
36. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata jumlah akar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.95
37. Rata-rata panjang akar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.96
38. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata panjang akar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.96
39. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata panjang akar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.96
40. Rata-rata bobot segar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.97
41. Hasil Analisis ragam dengan statistix 8 pada rata-rata bobot segar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.97
42. Hasil pemisahan nilai tengah rata-rata bobot segar krisan cv. Puspita Nusantara sebagai respons plantlet yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal menggunakan uji BNT 5% dengan statistix 8.97

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tunas krisan cv. Puspita Nusantara aseptik dalam kultur <i>in vitro</i>	26
2. Potongan batang satu buku tanpa daun sebagai eksplan.	27
3. Potongan daun krisan sebagai eksplan.	30
4. Skema perlakuan pada percobaan II. ...	31
5. Penentuan skor pembentukan kalus krisan. (0) tidak ada, (1) sedikit, (2) sedang, (3) banyak, (4) sangat banyak.	32
6. Penanaman induksi kalus : (a) bahan tanam yang digunakan, (2) mengeluarkan eksplan, (c) membuang akar dan batang, (d) memotong daun krisan, (e) ukuran eksplan 1 cm x 1 cm, (f) menanam eksplan ke media, (g) mengikat botol dengan karet, (h) eksplan disimpan dalam ruang gelap.	33
7. Aklimatisasi : (a) <i>hardening off</i> , (b) perendaman dithane pada media, (c) mengeluarkan plantlet, (d) pengelompokan plantlet, (e) penanaman, (f) plantlet yang sudah ditanam, (g) penyungkupan plantlet.	36
8. Penampilan kultur krisan cv. Puspita Nusantara di media (a) MS0, (b) MSA, (c) MS + BA 0,5 mg/l dan (d) MS + kinetin 0,5 mg/l pada umur 6 minggu	38
9. Rata-rata tinggi tunas cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin umur 6 minggu pengulturan.	40
10. Rata-rata jumlah daun cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin umur 6 minggu pengulturan.	41
11. Rata-rata jumlah akar cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan <i>in vitro</i> pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin umur 6 minggu pengulturan.	42

12. Rata-rata jumlah buku cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan *in vitro* pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin umur 6 minggu pengulturan.43
13. Rata-rata jumlah tunas cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan *in vitro* pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin umur 6 minggu pengulturan.44
14. Rata-rata bobot segar cv. Puspita Nusantara yang dikulturkan *in vitro* pada berbagai media yang mengandung arang aktif, benziladenin, atau kinetin umur 6 minggu pengulturan.45
15. Penampakan visual tunas tunas krisan hasil perlakuan BA dan Kinetin yang disubkultur selama 4 minggu pada media MS tanpa ZPT (a) MS+ 0,5 mg/l BA, (b) MS + 1 mg/l BA, (c) MS + 2 mg/l BA, (d) MS + 0,5 mg/l Kinetin, (e) MS + 1 mg/l kinetin, (f) MS + 2 mg/l kinetin.46
16. Eksplan dari percobaan 1 yang dipindahkan 0 MST (a) dan eksplan yang memiliki ukuran 2 kali semula 4 MST.47
17. Jaringan kompak berwarna hijau bakal mata tunas dan tunas.47
18. Eksplan yang membentuk tunas.48
19. Penampilan eksplan berkalus seelah 6 minggu di media induksi kalus yang menunjukkan intensitas kalus yang berbeda-beda. Eksplan diperlakukan dengan 2,4-D pada konsentrasi : a1. 0 mg/l; a2. 0 mg/l; b. 0,25 mg/l; c. 0,5 mg/l; d. 1 mg/l; e. 2 mg/l; dan f1. 3 mg/l; f2. 3 mg/l.50
20. Representasi penampilan visual tunas-tunas adventif yang terbentuk pada eksplan berkalus di media induksi tunas selama 2 bulan. Eksplan berkalus berasal dari perlakuan 2,4-D : a. 0,5 mg/l; b. 1mg/l; c. 2 mg/l; d. 0,5 mg/l; e. 3 mg/l; f. 0 mg/l.52
21. Rata-rata persentase plantlet hidup krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro* yang ditanam pada media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.54
22. Rata-rata tinggi tanaman krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro* yang ditanam di media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.55
23. Rata-rata jumlah daun krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro* yang ditanam di media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.56

24. Rata-rata jumlah akar krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro* yang ditanam di media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.57
25. Rata-rata panjang akar krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro* yang ditanam di media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.58
26. Rata-rata bobot segar krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro* yang ditanam di media aklimatisasi yang berbeda selama 2 bulan di lingkungan eksternal.58
27. Penampilan plantlet krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro*, (a) umur 0 bulan di lingkungan eksternal, (b) umur 2 bulan di lingkungan eksternal. (M1) kompos+pasir malang, (M2) arang sekam + kompos, (M3) arang sekam.59
28. Plantlet krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro* (a) umur 0 bulan di lingkungan eksternal, (b) umur 2 bulan di lingkungan eksternal. (M1) kompos+pasir malang, (M2) arang sekam + kompos, (M3) arang sekam. 59

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang dan Masalah

Krisan (*Chrysanthemum morifolium*) yang juga dikenal dengan seruni merupakan jenis tanaman hias yang paling populer dibandingkan dengan tanaman hias lainnya seperti bunga mawar, anggrek, dan anyelir (BPS, 2014). Krisan dapat digunakan sebagai bunga potong dan tanaman pot. Krisan merupakan komoditas penting dalam perdagangan tanaman hias dunia. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS, 2014), produksi tanaman krisan di Indonesia terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun untuk memenuhi permintaan konsumen yang juga semakin meningkat. Pada tahun 2013, produksi krisan sebesar 387.208.754 tangkai dan meningkat hingga mencapai 427.248.059 tangkai (meningkat 10,43 %) pada tahun 2014. Daerah sentra produsen krisan di Indonesia antara lain Cipanas, Cisarua, Sukabumi, Lembang (Jabar), Batu, Nangkojajar (Jatim), Bandung (Jateng), dan Brastagi (Sumut).

Selain sebagai tanaman hias, bunga krisan dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Menurut Zhang *et al.* (2009), bunga krisan memiliki fungsi untuk menghilangkan kelemahan otot pada jantung dan mengurangi detak jantung yang terlalu cepat. Selain itu, bunga krisan juga sudah lama digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti demam, sakit kepala, batuk dan gangguan penglihatan.

Permintaan akan bunga krisan yang terus meningkat perlu diantisipasi dengan teknik budidaya dan program pemuliaan tanaman yang baik guna memenuhi permintaan pasar domestik dan internasional. Perbanyakan krisan secara konvensional umumnya dilakukan secara vegetatif dengan setek batang dan setek pucuk. Namun cara ini berpotensi untuk terbawanya inokulum penyakit dan kurang dapat memenuhi permintaan bibit dalam jumlah besar dalam waktu relatif singkat. Program pemuliaan tanaman umumnya dilakukan dengan hibridisasi. Salah satu kendala dalam program pemuliaan krisan secara konvensional ini adalah sempitnya keragaman genetik pada klon-klon yang digunakan sebagai tetua persilangan.

Regenerasi tanaman *in vitro* atau teknik kultur jaringan dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengatasi kedua permasalahan tersebut, karena melalui pola regenerasi *in vitro* tertentu, teknik ini dapat digunakan untuk memproduksi propagul *true-to-type* dalam jumlah besar dalam waktu relatif singkat tanpa dipengaruhi oleh musim dan dapat dilakukan sepanjang tahun (Hussain *et al.*, 2012), namun juga dapat digunakan sebagai teknik yang efisien untuk pemuliaan tanaman melalui produksi keragaman somaklonal (Yusnita, 2015).

Setidaknya ada tiga pola regenerasi dalam kultur jaringan tanaman yaitu perbanyakan tunas aksilar, organogenesis, dan embriogenesis (Yusnita, 2015). Perbanyakan tunas aksilar *in vitro* adalah metode yang paling sering digunakan untuk menghasilkan bibit *true-to-type*, dan metode ini lebih menjamin kestabilan genetik pada tanaman regeneran yang dihasilkan (Kane, 2000).

Perbanyakan tunas aksilar adalah perbanyakan propagul dari eksplan yang mempunyai mata tunas aksilar, dengan cara menumbuh kembangkannya dalam kultur *in vitro*. Umumnya cara ini memerlukan sitokinin untuk merangsang pecah dan tumbuhnya mata tunas aksilar. Selanjutnya melalui beberapa subkultur atau pemindahan propagul ke media baru, eksplan dipacu untuk menghasilkan propagul klon dalam jumlah besar. Tunas yang sudah tumbuh memanjang dapat dipotong-potong untuk diperbanyak atau diakarkan menghasilkan plantlet untuk diaklimatisasi menjadi bibit siap tanam (Yusnita, 2015). Thuringiensis *et. al.* (2012), melaporkan bahwa media MS dengan BA 0,1 mg/l + GA 0,5 mg/l merupakan formulasi terbaik untuk mendorong pecah dan tumbuhnya tunas aksilar krisan. Karim *et al.* (2003), menyatakan bahwa kombinasi 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA menghasilkan tunas terpanjang yaitu 4,5 cm. Menurut Wankhede *et al.* (2000), respon terbaik dalam pembentukan tunas chrysanthemum adalah dengan menggunakan media MS dengan 1,0 mg/l BAP + 2,0 mg/l IAA.

Organogenesis dapat terjadi secara langsung dari potongan eksplan atau secara tidak langsung melalui terbentuknya kalus. Organogenesis tidak langsung berpotensi untuk menghasilkan keragaman pada tanaman regeneran yang dihasilkan karena terjadinya somaklonal varietas (Taji *et al.*, 2002). Oleh karena itu, metode ini dapat digunakan untuk membantu pemuliaan tanaman. Dalam organogenesis tidak langsung umumnya eksplan mula-mula dikulturkan di media induksi kalus (*callogenesis*), lalu diikuti dengan pemindahan ke media yang menginduksi tunas.

Induksi kalus pada eksplan umumnya membutuhkan ZPT dari golongan auksin atau auksin dengan sitokinin. Seperti yang dilaporkan oleh Mani dan Senthii (2011), induksi kalus pada eksplan daun krisan yang terbaik didapatkan pada media MS + 1,5 mg/l 2,4-D. Waseem *et al.* (2008), melaporkan bahwa untuk menginduksi kalus terbaik dari eksplan *Chrysanthemum morifolium* L didapat pada media MS + 2 mg/l 2,4-D. Keresa *et al.* (2012) mendapatkan bahwa induksi kalus pada daun krisan cv. Palisade White didapatkan pada media MS 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA. Tampaknya regenerasi kalus dari eksplan krisan tergantung pada daya regenerasi tiap varietas.

Untuk meningkatkan keberhasilan inisiasi tunas adventif baik secara langsung dari eksplan maupun secara tidak langsung dengan pembentukan kalus terlebih dahulu perlu adanya sitokinin di media kultur. Menurut Hartmann *et al.* (2011), sitokinin diperlukan untuk menginduksi tunas dari eksplan, namun konsentrasi efektif dari suatu jenis sitokinin tergantung pada genotipe tanaman. BA dan TDZ merupakan sitokinin yang banyak digunakan untuk merangsang perbanyakan tunas adventif atau tunas aksilar *in vitro* pada berbagai tanaman, misalnya menurut Ilahi *et al.* (2012), setelah terbentuknya kalus dari eksplan potongan daun krisan dan disubkultur pada media 0,5 mg/l BA menunjukkan jumlah tunas yang terbanyak. Menurut Sujatha *et al.* (2013), pemberian TDZ lebih efisien dan menghasilkan lebih banyak tunas adventif pada eksplan tunas *Luffa cylindrical* dibandingkan BAP dan kinetin.

Kebutuhan akan jenis dan konsentrasi auksin dan atau sitokinin sebagai stimuli dalam regenerasi organ (tunas/akar) bersifat *species-specific* tergantung genotipe

tanaman yang dikulturkan (Yusnita, 2015). Oleh karena itu, konsentrasi dan jenis ZPT yang tepat untuk perbanyak tunas *in vitro* pada genotipe tertentu perlu diteliti.

Tahap yang tak kalah pentingnya adalah tahap aklimatisasi yang merupakan tahap terakhir dari teknik perbanyak tanaman *in vitro*. Keberhasilan aklimatisasi selain dipengaruhi oleh mudah atau tidaknya tanaman berakar, juga dipengaruhi oleh kemampuan tanaman untuk beradaptasi terhadap kondisi lingkungan, dan media tumbuh di rumah kaca. Media tumbuh dan teknik penanaman merupakan faktor penting dalam proses aklimatisasi. Menurut Hartmann *et al.* (2011), media aklimatisasi umumnya tidak menggunakan tanah mineral, tetapi kombinasi antara bahan organik dan pasir atau vermikulit, tergantung ketersediaan dan harganya.

Penggunaan media tanam secara kombinasi diharapkan dapat memberikan lingkungan perakaran yang aerasi, kemampuan memegang air dan unsur unsur hara lebih baik bagi plantlet krisan yang diaklimatisasi. Salah satu alternatif sebagai media aklimatisasi yang harganya relatif murah dan ketersediaannya banyak di Indonesia adalah campuran antara pasir malang dan arang sekam atau pasir malang dengan kompos atau arang sekam saja. Kedua campuran media tersebut dapat menghasilkan sifat fisik dan kimia media yang berbeda sehingga mungkin akan menghasilkan respons pertumbuhan akar yang berbeda (Yusnita, 2011).

Penelitian ini merupakan serangkaian percobaan yang bertujuan menjawab beberapa permasalahan pada regenerasi *in vitro* krisan cv. Puspita Nusantara

melalui perbanyakan tunas aksilar, organogenesis tidak langsung serta aklimatisasi plantlet.

Adapun pertanyaan yang hendak dijawab pada masing-masing percobaan adalah sebagai berikut:

- I. Perbanyakan tunas aksilar cv. Puspita Nusantara
 - a. Apakah pemberian arang aktif dan media MS0 mempengaruhi pertumbuhan tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara?
 - b. Apakah pertumbuhan dan perbanyakan tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara dipengaruhi oleh keberadaan sitokinin dalam media?
 - c. Apakah BA atau kinetin yang lebih baik dalam menginduksi perbanyakan tunas, dan berapa konsentrasi yang terbaik?
- II. Organogenesis tidak langsung cv. Puspita Nusantara dari eksplan potongan daun
 - a. Apakah induksi kalus dari eksplan potongan daun pada media MS dengan air kelapa dipengaruhi oleh 2,4 D yang ditambahkan ke dalam media?
 - b. Berapa konsentrasi 2,4-D yang paling efektif dalam menginduksi kalus pada eksplan potongan daun?
 - c. Jika kalus yang diinduksi dalam berbagai media induksi kalus dipindahkan ke media MS + sitokinin, apakah dapat merangsang pembentukan tunas adventif?

III. Keberhasilan aklimatisasi dan pertumbuhan plantlet krisan cv. Puspita Nusantara

- a. Media apa yang paling mempengaruhi keberhasilan aklimatisasi krisan, apakah media kompos + arang sekam, media kompos + pasir malang atau media sekam tanpa campuran pasir malang dan kompos?
- b. Media apa yang terbaik untuk pertumbuhan plantlet krisan secara *ex vitro*?

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari tiga percobaan yaitu regenerasi *in vitro*

I. Perbanyak tunas krisan cv. Puspita Nusantara

- a. Mengetahui pengaruh pemberian arang aktif ke dalam media MS0 terhadap pertumbuhan dan perbanyak tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara.
- b. Mempelajari pengaruh keberadaan sitokinin dalam media dalam pertumbuhan dan perbanyak tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara.
- c. Mengetahui apakah BA atau kinetin yang lebih baik dalam menginduksi perbanyak tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara.

II. Organogenesis tidak langsung cv. Puspita Nusantara dari eksplan potongan daun

- a. Mengetahui pengaruh pemberian 2,4 D pada media MS dengan air kelapa terhadap pembentukan kalus.
- b. Mengetahui konsentrasi 2,4-D yang paling efektif dalam menginduksi kalus pada eksplan potongan daun.

- c. Mengetahui apakah terjadi pembentukan tunas, jika kalus yang diinduksi dalam berbagai media induksi kalus dipindahkan ke media BA + TDZ.

III. Keberhasilan aklimatisasi dan pertumbuhan planlet krisan cv. Puspita

Nusantara

- a. Mengetahui media apa yang paling mempengaruhi persentase keberhasilan aklimatisasi krisan, apakah media kompos + arang sekam, media kompos + pasir malang atau media sekam tanpa campuran pasir malang dan kompos.
- b. Mengetahui media apa yang terbaik untuk pertumbuhan krisan secara *ex vitro*.

1.3 Kerangka Pemikiran

Krisan merupakan tanaman hias yang dimanfaatkan juga sebagai tanaman obat sehingga permintaan akan jumlah tanaman krisan mengalami peningkatan.

Perbanyakan krisan secara konvensional umumnya dilakukan secara vegetatif dengan setek batang/pucuk, tetapi dengan cara ini dapat berpotensi masuknya inokulum dan tidak tersedianya bibit krisan dalam jumlah besar dan seragam.

Selain itu, krisan bukanlah tanaman asli Indonesia maka keberhasilan pembentukan biji untuk mendapat varietas unggul sulit tercapai. Hal ini menunjukkan perlu adanya upaya pengembangan penelitian tentang budidaya krisan. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan dalam perbanyakan tanaman krisan adalah melalui teknik kultur jaringan.

Pola regenerasi dalam perbanyakan *in vitro* yang sering dilakukan adalah perbanyakan tunas aksilar, organogenesis, dan embriogenesis. Perbanyakan tunas aksilar dilakukan untuk merangsang terbentuknya tunas-tunas aksilar karena dapat memproduksi tanaman yang *true-to-type* dibandingkan dengan metode yang lainnya. Yusnita (2003) menjelaskan bahwa metode percabangan tunas samping memiliki kelebihan dari organogenesis dan embriogenesis. Hal tersebut karena metode ini lebih sederhana, perbanyakan berlangsung cukup cepat, tanaman yang dihasilkan lebih baik karena mengalami rejuvenasi, dan peluang aberasi genetiknya kecil. Untuk menumbuh kembangkan mata tunas aksilar *in vitro*, maka eksplan krisan membutuhkan media tanam yang dikombinasikan dengan ZPT.

Sitokinin merupakan ZPT yang sering digunakan untuk merangsang pecah dan tumbuhnya mata tunas aksilar. Menurut Djumat (2012), respon terbaik pada jumlah tunas yang berasal dari tunas aksilar *Anthocephalus macrophyllus* adalah dengan menggunakan media MS + 1 mg/l BAP. Sismanto (2010), melaporkan bahwa eksplan potongan batang berbuku *Anthurium* Gelombang Cinta dapat membentuk percabangan tunas aksilar dengan jumlah terbanyak pada media MS + 1,5 mg/l BA.

Organogenesis merupakan proses yang menginduksi pembentukan sel, jaringan atau kalus menjadi tunas dan tanaman sempurna. Pada pola regenerasi ini tunas adventif terbentuk dari eksplan yang sebelumnya bukan mata tunas, misalnya dari eksplan ujung akar atau potongan daun. Proses pembentukan tunas adventif dapat

terjadi secara langsung dari permukaan eksplan, atau secara tidak langsung melalui terbentuknya kalus (Yusnita, 2015).

Pembentukan kalus yang diinisiasi *in vitro* dilakukan dengan pengaplikasian hormon seperti auksin. Aplikasi eksogen auksin dan sitokinin dapat menginduksi dan memproliferasi kalus pada berbagai spesies tanaman. Zat pengatur pertumbuhan dari golongan auksin yang biasa digunakan untuk menginduksi kalus adalah 2,4-D. Menurut Yusnita (2011), *Sansevieria trifasciata* 'Lorentii' induksi kalus pada eksplan potongan daun pada media MS + 2,4-D 0,25 mg/l. Rahayu *et al* (2002), menyatakan bahwa pemberian 2,4-D pada konsentrasi 0,5 mg/l dan kinetin 0,5 mg/l pada tanaman *Acalypha indica* mampu merangsang pembelahan sel daun dan melakukan proses dediferensiasi untuk membentuk kalus lebih cepat. Hapsoro *et al.* (2011) melaporkan bahwa pada eksplan *leaf roll*/potongan daun tebu (*Saccharum officinarum* L) induksi kalus terbaik didapatkan pada media MS + 2,4-D 3 mg/l.

Untuk mendorong pertumbuhan dan perkembangan tunas adventif setelah eksplan ditanam pada media auksin, maka perlu adanya penambahan ZPT sitokinin pada media tanam. Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang mampu mengontrol pembelahan sel, inisiasi meristem tunas, diferensiasi daun dan akar, biogenesis kloroplas, toleransi stress, dan menghambat senesens (Sheen, 2008). Sitokinin bersifat memacu pembelahan sel sehingga sering digunakan sebagai zat perangsang tumbuh tunas. Oleh karena itu, untuk mempercepat pertumbuhan tunas adventif seringkali diperlukan sitokinin.

Sitokinin yang sering digunakan untuk mempercepat pertumbuhan tunas adalah BAP/BA (*6-benzyl amino purine/6-benzyl adenine*), Thidiazuron (*N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-gl-urea*). Pemberian BA dan TDZ diharapkan mampu meningkatkan keberhasilan pertumbuhan eksplan krisan yang ditunjukkan oleh meningkatnya jumlah tunas dan panjang tunas yang terbentuk. Sherkar *et al.* (2014), melaporkan bahwa setelah 60 hari kalus disubkultur pada perlakuan BA didapatkan persentase regenerasi tunas yang tertinggi pada perlakuan 3 mg/l BAP dibandingkan dengan tanpa BA, akan tetapi persentase tunas yang beregenerasi lebih tinggi pada perlakuan TDZ dibandingkan dengan pada perlakuan BA. Astuti (2007) menyatakan bahwa *Sansevieria trifasciata* cv. Lorentii menghasilkan jumlah mata tunas terbanyak pada konsentrasi 0,1 μ M TDZ (setara dengan 0,02 mg/l TDZ) sedangkan pada *Sansevieria trifasciata* cv. Golden hahnii jumlah mata tunas terbanyak diperoleh pada konsentrasi 1 μ M TDZ (setara dengan 0,2 mg/l TDZ).

Tahap akhir dari perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan adalah aklimatisasi planlet. Aklimatisasi yaitu melatih tanaman yang sebelumnya ditumbuhkan di dalam botol kultur dengan suplai media yang lengkap untuk dapat hidup secara mandiri dan berfotosintesis pada kondisi eksternal. Aklimatisasi dilakukan dengan mengkondisikan planlet di media tanam dengan kelembapan tinggi dan intensitas cahaya rendah (Yusnita, 2003).

Planlet yang dapat diaklimatisasi adalah planlet yang telah lengkap organ pentingnya seperti daun akar dan batang, sehingga dalam kondisi lingkungan luar planlet dapat melanjutkan perumbuhannya dengan baik. Aklimatisasi

memerlukan media yang tepat untuk pertumbuhan planlet, yaitu yang memiliki sifat-sifat kemampuan memegang dan menahan air yang baik, aerasi cukup untuk pengakaran karena porositas tinggi, bebas bahan beracun, kapasitas pertukaran ion tinggi dengan kelembapan 5-6% (Islam *et al.*, 2002)

Aklimatisasi diperlukan karena tanaman hasil kultur jaringan umumnya memiliki lapisan lilin tipis dan belum berkembang dengan baik, sel-sel dalam palisade belum berkembang maksimal, jaringan pembuluh dari akar ke pucuk kurang berkembang, dan stomata sering kali tidak berfungsi, yaitu tidak dapat menutup pada saat penguapan tinggi, oleh sebab itu aklimatisasi akan membantu tanaman beradaptasi terhadap perubahan kondisi lingkungan seperti suhu, kelembapan, dan intensitas cahaya. Di samping itu, media tumbuh juga memiliki peranan yang cukup penting, khususnya bila tunas yang diaklimatisasi belum membentuk sistem perakaran yang baik (Muhit, 2007).

Tanaman juga memerlukan akar untuk menyerap hara agar dapat tumbuh dengan baik sehingga dalam tahap aklimatisasi ini diperlukan suatu media yang dapat mempermudah pertumbuhan akar dan dapat menyediakan hara yang cukup bagi tanaman (planlet) yang diaklimatisasi tersebut. Media tanam diartikan sebagai wadah atau tempat tinggal tanaman. Sebagai tempat tinggal yang baik, media tanam harus dapat mendukung pertumbuhan dan kehidupan tanaman. Idealnya media tanam harus memenuhi persyaratan antara lain dapat dijadikan sebagai tempat berpijak, dapat mengikat air dan unsur hara, dapat mengontrol drainase dan aerasi, mempertahankan kelembapan, tidak mudah lapuk dan mudah ditembus oleh akar (Hartmann *et al.*, 2011).

1.5 Hipotesis

Berdasarkan kerangka pemikiran yang telah dikemukakan, dapat disusun hipotesis sebagai berikut:

Percobaan 1 :

1. Pemberian arang aktif pada media MS0 dapat meningkatkan kualitas tunas krisan karena pengakaran yang lebih baik tanaman yang lebih vigor.
2. Pemberian sitokinin (BA dan kinetin) pada media dapat meningkatkan pertumbuhan dan perbanyak tunas aksilar.
3. Perbanyak tunas dalam media + BA lebih baik daripada di media + kinetin
4. Peningkatan konsentrasi BA dapat meningkatkan penggandaan tunas pada krisan.
5. Peningkatan konsentrasi kinetin dapat meningkatkan penggandaan krisan pada tunas.

Percobaan 2:

1. Pemberian 2,4-D dapat merangsang pembentukan kalus pada eksplan potongan daun krisan.
2. Penambahan TDZ ke dalam media yang mengandung BA dapat merangsang pembentukan tunas adventif krisan.
3. Perbedaan intensitas pembentukan kalus berpengaruh terhadap perbedaan pembentukan tunas adventif apabila eksplan berkalus dipindahkan ke media induksi tunas (MS + BA + TDZ).

Percobaan 3:

1. Keberhasilan aklimatisasi dan pertumbuhan plantlet krisan dipengaruhi oleh campuran media tanam.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Krisan

Bunga Krisan atau dikenal juga dengan sebutan bunga seruni, merupakan tanaman hias yang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi dan potensial untuk dikembangkan secara komersial. Di Indonesia, krisan dibudidayakan di dataran medium dan dataran tinggi. Bunga krisan merupakan salah satu tanaman hias yang banyak dibudidayakan sebagai bunga pot dan bunga potong. Krisan kuning berasal dari dataran Cina dikenal dengan *Chrysanthemum indicum* (kuning), *Chrysanthemum morifolium* (ungu dan pink) dan *Chrysanthemum daisy* (bulat pompom). Pada abad ke-4, Jepang mulai membudidayakan krisan dan pada tahun 1997 bunga krisan dijadikan sebagai simbol kekaisaran Jepang dengan sebutan *Queen of The East* (Rukmana dan Mulyana, 1997).

Krisan masih kerabat dekat dengan bunga Aster dan daisy yang termasuk dalam famili *Asteraceae*. Krisan merupakan bunga asli dari daerah Asia Timur, seperti Korea, Jepang dan Cina Utara, tetapi saat ini lebih banyak di budidaya di daerah Eropa dan Amerika. Menurut Rukmana dan Mulyana (1997), terdapat 1000 varietas krisan yang tumbuh di dunia. Beberapa varietas krisan yang dikenal antara lain adalah *C. daisy*, *C. indicum*, *C. coccineum*, *C. frutescens*, *C. maximum*, *C. hornorum* dan *C. parthenium*. Varietas krisan yang banyak ditanam

di Indonesia umumnya diintroduksi dari luar negeri terutama dari Belanda, Amerika Serikat dan Jepang.

Bunga krisan sangat populer dimasyarakat karena banyaknya jenis, bentuk dan warna bunga. Selain bentuk mahkota dan jumlah bunga dalam tangkai, warna, bunga juga menjadi pilihan konsumen. Pada umumnya konsumen lebih menyukai warna merah, putih dan kuning, sebagai warna dasar krisan namun sekarang terdapat berbagai macam warna yang merupakan hasil persilangan diantara warna dasar tadi (Rukmana dan Mulyana, 1997). Selain sebagai tanaman hias, bunga krisan juga sudah lama digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti demam, sakit kepala, batuk dan gangguan penglihatan secara tradisional (Zhang *et al*, 2009).

Tanaman krisan merupakan tanaman semusim (anual) yang pembungaannya berkisar 9-12 hari tergantung varietas dan lingkungan tempat menanamnya. Tanaman krisan dapat dipertahankan hingga beberapa tahun bila dikehendaki, tetapi bunga yang dihasilkan biasanya jauh menurun kualitasnya (Hasim dan Reza, 1995). Menurut Rukmana dan Mulyana perakarannya serabut yang keluar dari batang utama. Akar menyebar ke segala arah pada radius dan kedalaman 50-70 cm atau lebih. Batang tanaman krisan tumbuh agak tegak dengan percabangan yang agak jarang, berstruktur lunak, dan berwarna hijau, tetapi bila dibiarkan akan tumbuh terus, batang berubah menjadi keras (berkayu) dan berwarna hijau kecoklatan, serta berdiameter satu bonggol bunga terdapat bunga cakram yang berbentuk tabung dan bunga tepi yang berbentuk pita. Bunga tabung dapat berkembang dengan warna

yang sama atau berbeda dengan bunga pita. Pada bunga pita terdapat bunga betina (pistil), sedangkan bunga tabung terdiri atas bunga jantan dan bunga betina (biseksual) dan biasanya fertil.

2.2 Kultur Jaringan

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik menumbuh kembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi aseptik secara in vitro. Teknik ini dicirikan oleh kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan dengan kandungan nutrisi lengkap dan ZPT (zat pengatur tumbuh), serta kondisi ruang kultur yang suhu dan pencahayaannya terkontrol (Yusnita, 2003).

Pelaksanaan kultur jaringan ini berdasarkan teori sel seperti yang telah dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann, yaitu bahwa sel mempunyai kemampuan autonom, bahkan mempunyai kemampuan totipotensi. Totipotensi yaitu kemampuan setiap sel, dari mana saja sel tersebut diambil, bila diletakkan dalam lingkungan yang sesuai akan dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (Yusnita, 2003).

Windiastika (2013) menyebutkan keunggulan dari teknik kultur jaringan antara lain mampu menghasilkan bibit tanaman dalam jumlah lebih banyak dalam waktu yang relatif singkat, tidak tergantung pada iklim dan cuaca, menghasilkan tanaman yang sehat dan bebas cendawan maupun virus, mempertahankan sifat fisiologis dan morfologis tanaman induk dan memungkinkan dilakukannya manipulasi genetik.

Dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan dapat melalui 2 jalur yaitu organogenesis dan embryogenesis somatic. Jalur embriogenesis somatik dimasa yang akan datang lebih mendapat perhatian karena bibit dapat berasal dari satu sel somatic sehingga bibit yang akan dihasilkan dapat lebih banyak dibandingkan melalui jalur organogenesis. Disamping itu sifat perakarannya sama dengan bibit asal biji (Lestari, 2011).

Kultur jaringan terdiri dari beberapa tahapan menurut Yusnita 2003 :

1. Tahap 0, pemilihan dan penyiapan tanaman induk sebagai sumber eksplan.
2. Tahap I, culture establishment (sterilisasi eksplan, penanaman eksplan di media kultur, dan inisiasi tunas).
3. Tahap II, multiplication (seperti perbanyakan propagul, tunas aksilar, atau embrio).
4. Tahap III, root formation (pemanjangan akar dan pengakaran)
5. Tahap IV, acclimatization (memindahkan plantlet ke lingkungan eksternal).

Eksplan adalah bagian kecil dari tanaman yang ditanam dan diperbanyak dengan teknik kultur jaringan. Eksplan yang digunakan dalam teknik kultur jaringan harus memiliki kondisi fisiologi yang tepat dan bebas penyakit. Selain itu jenis tanaman, bagian tanaman, morfologi permukaan, lingkungan tumbuh, umur, kondisi tanaman, ukuran eksplan serta musim pengambilan merupakan beberapa faktor keberhasilan dalam tahapan kultur jaringan. Hartmann *et al.* (2011) dalam Yusnita (2003), menyebutkan bahwa bagian tanaman yang sering digunakan dalam teknik kultur jaringan tanaman adalah kalus, sel, protoplas, pucuk, bunga, daun, akar, umbi, biji atau bagian-bagian biji seperti aksis embrio atau kotiledon.

Yusnita (2003) menjelaskan hal-hal yang harus diperhatikan pada saat pemilihan sumber ekplan adalah sebagai berikut:

1. Susunan genotipe sumber eksplan, eksplan diambil dari pilihan dengan satu atau beberapa karakter unggul,
2. Umur ontogenik, semakin juvenil sumber ekplan maka daya regenerasinya semakin tinggi dan sebaliknya,
3. Ukuran ekplan, semakin kecil ukuran eksplan maka semakin rendah peluang terjadinya kontaminasi dan sebaliknya.

Yusnita (2003) menyebutkan bahwa pada dasarnya secara fisik media kultur terbagi menjadi dua bentuk yaitu berbentuk padat dan cair. Media yang berbentuk padat menggunakan pematat berupa agar-agar atau gelrite. Komponen media kultur yang lengkap terdiri dari air destilata (akuades) yaitu air yang bebas ion sebagai pelarut atau solven, hara-hara makro dan mikro, gula (umumnya sukrosa) sebagai sumber energi, vitamin, asam amino dan bahan organik lain, zat pengatur tumbuh (benzilamino purin, thiadizuron, kinetin) suplemen berupa bahan-bahan alami jika diperlukan.

Komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan. Komposisi tersebut antara lain Knudson C, Heller, Nitsch and Nitsch, Gamborg dkk. B5, Linsmaier dan Skoog (LS), Murashige and Skoog (MS) serta Woody plant medium (Yusnita, 2003).

2.3 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh (ZPT) didefinisikan sebagai senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah kecil yang disintesis pada bagian tertentu tanaman dan pada umumnya diangkut ke bagian lain tanaman dimana zat tersebut menimbulkan tanggapan secara biokimia, fisiologis dan morfologis (Wattimena, 1988). Dua golongan ZPT yang penting dalam kultur jaringan yaitu auksin dan sitokinin. ZPT ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel dan organ. Interaksi dan perimbangan antara ZPT yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur (Gunawan, 1995).

Armini *et al.* (1991) menambahkan bahwa untuk pertumbuhan dan perkembangan kultur *in vitro* diperlukan komposisi dan atau konsentrasi ZPT yang berbeda untuk satu varietas dengan varietas lain dari suatu tanaman. Penentuan taraf konsentrasi juga disesuaikan dengan tipe organ atau eksplan, metode kultur jaringan dan tingkat kultur jaringan (pembuatan kalus, induksi tunas, induksi akar, dan lain-lain).

2.3.1 BA (*Benzyladenin*)

Sitokinin mempengaruhi berbagai proses fisiologi di dalam tanaman. Aktivitas utama sitokinin adalah sitokinesis atau pembelahan sel. Aktivitas ini yang menjadi kriteria utama untuk menggolongkan suatu zat pengatur tumbuh ke dalam sitokinin (Wattimena 1988).

Salah satu jenis hormon dari kelompok sitokinin yang paling banyak digunakan adalah BA. Hal ini karena BA dinilai lebih stabil, tidak mahal dan lebih efektif dibandingkan kinetin. Penggunaan BA dengan konsentrasi tinggi dan waktu yang lama seringkali menyebabkan regenerasi sulit berakar dan dapat menyebabkan penampakan pucuk abnormal. Hal ini jelas terlihat pada kultur pucuk *Asparagus officinalis* (Wattimena 1988). Sherkar, *et al.* (2014) melaporkan bahwa setelah 60 hari kalus disubkultur pada perlakuan BA didapatkan persentase regenerasi tunas yang tertinggi pada perlakuan 3 mg/liter BA dibandingkan dengan tanpa BA,

Aktivitas sitokinin tergantung juga dari aktivitas fitohormon yang lainnya, terutama auksin baik dalam efek menghambat maupun efek yang mendorong pembelahan sel (Wattimena, 1988). Sitokinin dan auksin memiliki peran yang sangat penting dalam hal menginduksi tunas adventif. Nisbah keduanya akan menentukan apakah suatu kalus akan membentuk tunas adventif, akar, atau tunas adventif dan akar (Armini *et al.*, 1991). Menurut Murashige dan Skoog (1957) dalam Hapsoro dan Yusnita (2016), nisbah auksin sitokinin yang tinggi akan mendorong morfogenesis akar, sebaliknya nisbah sitokinin-auksin yang tinggi akan mendorong pembentukan tunas.

2.3.2 TDZ (*Thidiazuron*)

TDZ merupakan jenis sitokinin yang biasa digunakan dalam kultur jaringan. TDZ merupakan sitokinin dari golongan *derivate phenyl-urea* yang mempunyai aktivitas sitokinin yang lebih tinggi daripada sitokinin jenis adenine, seperti BA, kinetin pada konsentrasi yang lebih rendah (Mok *et al.*, 2000).

Thidiazuron juga masuk dalam kelompok ZPT sitokinin sintetik sama seperti BA. Huetteman dan Preece 1993 dalam Sherkar 2014, melaporkan bahwa TDZ dianggap salah satu sitokinin yang paling aktif untuk induksi tunas dalam kultur jaringan tanaman. Laporan lain menyebutkan bahwa TDZ menginduksi tunas regenerasi lebih baik daripada sitokinin lainnya (Thomas *et al.*, 2003; Sherkar *et al.*, 2014).

2.3.3 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetat)

Zat pengatur tumbuh (ZPT) pada tanaman merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan mengubah proses fisiologis tanaman. ZPT yang sering digunakan yaitu golongan auksin dan sitokinin (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Auksin merupakan salah satu hormon tumbuh yang tidak terlepas dari proses pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman.

2,4-Diklorofenoksiasetat merupakan golongan auksin yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik. Hormon ini mempunyai sifat lebih stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel atau saat pemanasan pada proses sterilisasi, lebih tersedia, lebih murah dan paling efektif dalam memacu pembentukan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Auksin 2,4-D lebih efektif dibandingkan dengan auksin yang lain untuk meningkatkan perkembangan dan proliferasi kultur embriogenik. 2,4-D mendorong pertumbuhan embrio somatik dari embriogenesis. 2,4-D pada

konsentrasi rendah akan menginduksi terbentuknya kalus, namun pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan timbulnya mutasi karena 2,4-D bersifat herbisida dan akan menyebabkan perubahan jaringan tanaman (Goldsworty dan Mina, 1991).

Pemakaian 2,4-D biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu yang singkat, antara 2-4 minggu karena merupakan auksin kuat, artinya auksin ini tidak dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Konsentrasi hormon yang diberikan bervariasi tergantung jenis tanaman, misalnya konsentrasi 2,4-D yang biasa digunakan pada tanaman monokotil adalah 2,0-10 mg/L dan konsentrasi 2,4-D pada tanaman dikotil yang menunjukkan pertumbuhan kalus adalah 0,001-2,0 mg/L (George, 1993).

2.4 Aklimatisasi

Aklimatisasi merupakan adaptasi tanaman hasil pembiakan yang semula kondisinya terkendali kemudian berubah pada kondisi lapangan yang kondisinya tidak terkendali lagi. Proses ini mempersiapkan plantlet ditumbuhkan pada habitat aslinya. Tahap aklimatisasi mutlak dilakukan pada tanaman hasil perbanyakan secara *in vitro* karena plantlet akan mengalami perubahan fisiologis yang disebabkan oleh faktor lingkungan. Pada pembiakan *in vitro* semua faktor lingkungan terkontrol, sedangkan di lapangan faktor lingkungan sulit dikontrol (Yusnita, 2003).

Kondisi lingkungan untuk pertumbuhan *ex vitro* sangat berbeda dibandingkan dengan pertumbuhan secara *in vitro*. Aklimatisasi tanaman merupakan tahapan terakhir dari perbanyak tanaman *in vitro* dan sekaligus tahapan yang sangat penting dalam menentukan ketahanan dan kestabilan plantlet di lingkungan terbuka, dengan kata lain, persentase ketahanan tanaman ditentukan oleh penguatan tanaman yaitu tetap berfotosintesis secara maksimal meskipun mengalami transpirasi yang berlebih. Kondisi selama kultur *in vitro* menyebabkan abnormalitas morfologi, anatomi dan fisiologi plantlet yang terbentuk. Hal ini menyebabkan plantlet mengalami transpirasi yang berlebih karena fungsi stomata belum bekerja sempurna sehingga plantlet membutuhkan periodik aklimatisasi untuk memulihkan dari abnormalitas secara bertahap (Hapsoro dan Yusnita, 2016).

Tanaman juga memerlukan akar untuk menyerap hara agar dapat tumbuh dengan baik sehingga dalam tahap aklimatisasi ini diperlukan suatu media yang dapat mempermudah pertumbuhan akar dan dapat menyediakan hara yang cukup bagi tanaman (*planlet*) yang diaklimatisasi tersebut. Media yang remah akan memudahkan pertumbuhan akar dan melancarkan aliran air, mudah mengikat air dan hara, tidak mengandung toksin atau racun, kandungan unsur haranya tinggi, tahan lapuk dalam waktu yang cukup lama.

Djarmiko *et al.* (1985) menjelaskan bahwa arang adalah suatu bahan padat yang berpori-pori dan merupakan hasil pembakaran dari bahan yang mengandung unsur C. Sebagian besar dari pori-porinya masih tertutup dengan hidrokarbon, ter dan senyawa organik lain dan komponennya terdiri dari fixed carbon, abu, air,

nitrogen, dan sulfur. Arang sekam memiliki peranan penting sebagai media tanam pengganti tanah. Arang sekam bersifat porous, ringan, tidak kotor dan cukup dapat menahan air. Secara morfologis arang memiliki pori yang efektif untuk mengikat dan menyimpan hara tanah.

Aplikasi arang sekam terutama pada lahan miskin hara dapat membangun dan meningkatkan kesuburan tanah, karena dapat meningkatkan beberapa fungsi antara lain: sirkulasi udara dan air tanah, pH tanah, merangsang pembentukan spora endo dan ektomikoriza, dan menyerap kelebihan CO₂ tanah. Sehingga dapat meningkatkan produktifitas lahan dan hutan tanaman (Pari 2002).

Kompos akan meningkatkan kesuburan tanah, merangsang perakaran yang sehat. Kompos memperbaiki struktur tanah dengan meningkatkan kandungan bahan organik tanah dan akan meningkatkan kemampuan tanah untuk mempertahankan kandungan air tanah. Aktivitas mikroba tanah yang bermanfaat bagi tanaman akan meningkat dengan penambahan kompos. Aktivitas mikroba ini membantu tanaman untuk menyerap unsur hara dari tanah dan menghasilkan senyawa yang dapat merangsang pertumbuhan tanaman. Aktivitas mikroba tanah juga diketahui dapat membantu tanaman menghadapi serangan penyakit. lewat proses alamiah. Namun proses tersebut berlangsung lama sekali padahal kebutuhan akan tanah yang subur sudah mendesak. Oleh karenanya proses tersebut perlu dipercepat dengan bantuan manusia. Dengan cara yang baik, proses mempercepat pembuatan kompos berlangsung wajar sehingga bisa diperoleh kompos yang berkualitas baik (Murbandono, 2000).

Untuk mendukung keberhasilan plantlet krisan maka digunakan media tanam yang memiliki porositas tinggi dan mampu menyerap air. Salah satu jenis media tanam yang sesuai dengan kriteria tersebut adalah pasir malang. Dengan media yang ideal, aerasi dan drainase yang baik diduga dapat meningkatkan persentase pertumbuhan akar plantlet krisan. Pemilihan media tanam yang tepat dalam penyetekan sirih merah adalah menggunakan pasir malang dan arang sekam yang dicampur dengan perbandingan 1:1 (Rachmawati, 2000)

III. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini terdiri dari tiga percobaan yang mencakup regenerasi *in vitro* tanaman krisan cv. Puspita Nusantara melalui perbanyakan tunas aksilar dan organogenesis dari eksplan daun, serta aklimatisasi planlet. Ketiga percobaan tersebut dilakukan di Laboratorium Ilmu Tanaman dan Rumah Kaca Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari September 2015 hingga April 2016.

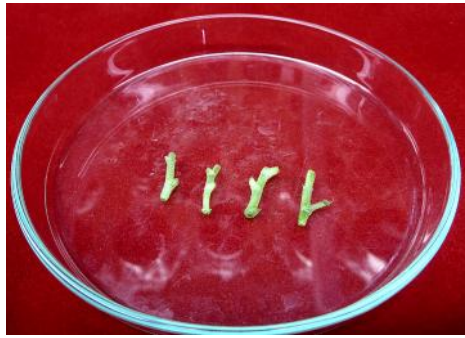
3.1 Percobaan I : Pengaruh arang aktif, *benziladenin* (BA) atau *kinetin* terhadap pertumbuhan dan perbanyakan tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro*.

3.1.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah tunas krisan cv. Puspita Nusantara aseptik dalam kultur *in vitro* yang didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Hias, Cianjur, Jawa Barat (Gambar 1). Eksplan yang digunakan adalah potongan batang satu buku tanpa daun berukuran 1,5 cm (Gambar 2).



Gambar 1. Tunas krisan cv. Puspita Nusantara aseptik dalam kultur *in vitro*



Gambar 2. Potongan batang satu buku tanpa daun sebagai eksplan

3.1.2 Disain Percobaan, Pengamatan dan Analisis Data

Percobaan ini disusun dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Perlakuan adalah faktor tunggal yang terdiri dari :

1. MS0
2. MS0 + 2 g/l arang aktif (MSA)
3. MS + 0,5 mg/l BA
4. MS + 1 mg/l BA
5. MS + 2 mg/l BA
6. MS + 0,5 mg/l kinetin
7. MS + 1 mg/l kinetin
8. MS + 2 mg/l kinetin

Setiap satuan percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang masing-masing berisi 4 eksplan potongan batang satu buku tanpa daun. Pengamatan dilakukan pada umur 6 minggu setelah penanaman eksplan. Variabel yang diamati adalah tinggi tunas, jumlah tunas per eksplan, jumlah daun, jumlah buku, jumlah akar primer dan bobot segar tanaman per eksplan. Data dari setiap variabel pengamatan dianalisis

ragamnya dan jika terdapat perbedaan nyata antar-perlakuan, maka pemisahan nilai tengah dilakukan dengan uji BNT pada taraf 0,05.

3.1.3 Pelaksanaan Percobaan

Pelaksanaan percobaan meliputi persiapan alat, pembuatan media kultur, penanaman eksplan dan kondisi ruang kultur.

3.1.3.1 Persiapan Alat

Alat yang akan digunakan dalam pembuatan media adalah gelas ukur, *beaker glass*, pinset, *magnetic stirrer*, autoklaf, pipet, pH meter, timbangan analitik, botol kultur, plastik, karet gelang, kertas label, kamera, dan alat tulis.

Sedangkan alat yang akan digunakan dalam penanaman adalah pinset, skapel, petridis, LAFC, lampu bunsen. Sebelum digunakan untuk penanaman. pinset, scapel, dan petridis disterilisasi dengan autoclaf selama 1 jam dengan suhu 121°C.

3.1.3.2 Pembuatan Media Kultur

Media pembentukan tunas *dengan axillary branching* adalah media yang berisi garam-garam makro dan mikro MS dengan 150 dan 30 g/l sukrosa, 0,1 piridoksin-HCL 0,5 mg/l, thiamin-HCL 0,5 mg/l, myoinositol 100 mg/l, asam nikotinat 0,5 mg/l, glisin 2 mg/l, asam askorbat 150 mg/l, asam sitrat 50 mg/l dan ditambahkan konsentrasi BA (0,5, 1, 2 mg/l), Kinetin (0,5, 1, 2 mg/l), atau arang aktif 2 gr/l. Selanjutnya pH-media diatur menjadi 5,8 jika pH kurang dari 5,8 maka diberi penambahan KOH 1 N sedangkan jika pH lebih dari 5,8 maka diberi HCL 1 N, setelah pH menjadi 5,8 ditambahkan 8 g/l bubuk agar-agar kemudian media

dimasak hingga mendidih lalu media dimasukkan ke dalam botol-botol kultur 250 ml, sebanyak 30 ml per botol. Botol yang berisi media ditutup dengan plastik bening kemudian diikat dengan karet dan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 kg/cm².

3.1.3.3 Penanaman Eksplan dan Kondisi Ruang Kultur

Penanaman eksplan steril dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC) dengan kondisi aseptik. Penanaman eksplan dilakukan dengan cara krisan *in vitro* dimasukkan ke dalam LAF kemudian eksplan dikeluarkan dan daun dan akar dipotong, selanjutnya batang satu buku tanpa daun dipotong berukuran 1,5 cm untuk digunakan sebagai eksplan kemudian ditanam ke media perlakuan. Satu botol berisi 4 buku. Kemudian kultur diinkubasi pada ruang kultur dengan penerangan lampu *fluoresens* 1.000-2000 lux dengan perioridas penyinaran pada suhu 24°C.

3.2 Percobaan II : Induksi kalus dan organogenesis *in vitro*

Percobaan kedua ini dilakukan untuk mengetahui :

- a. Pengaruh berbagai konsentrasi 2,4 D terhadap induksi kalus pada eksplan potongan daun krisan cv. Puspita Nusantara *in vitro*.
- b. Pengaruh pemberian sitokinin TDZ + BA terhadap induksi tunas adventif dari eksplan berkalus akibat induksi kalus dengan berbagai konsentrasi 2,4-D.

3.2.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam Percobaan IIa adalah potongan daun krisan cv. Puspita Nusantara berukuran 1 cm x 1 cm dengan tulang daun utama di bagian tengahnya (Gambar 3). Potongan daun tersebut diisolasi dari kultur tunas aseptik krisan dalam kultur *in vitro* yang didapatkan dari Balithi. Sedangkan bahan tanaman pada percobaan IIb adalah eksplan daun krisan yang telah berkalus yang didapatkan dari percobaan IIa.

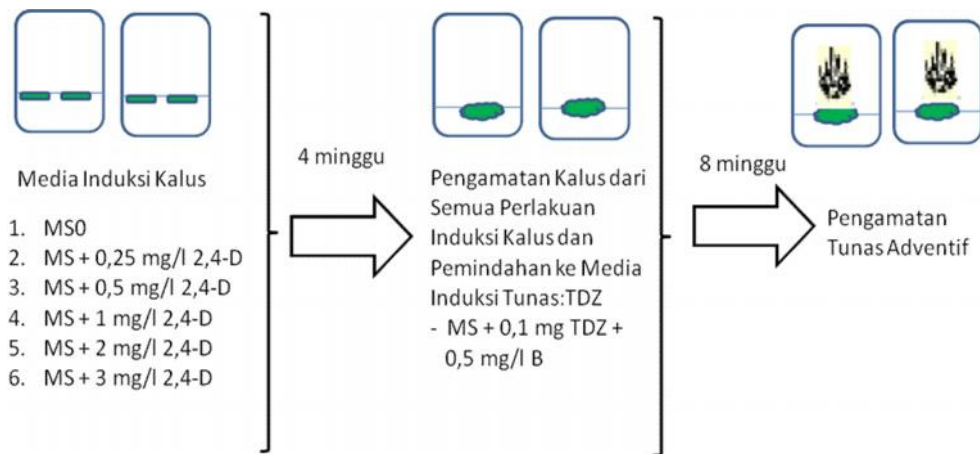


Gambar 3. Potongan daun krisan sebagai eksplan

3.2.2 Disain Percobaan, Pengamatan dan Analisis Data

Perlakuan pada percobaan IIa adalah berbagai konsentrasi 2,4 D dalam media MS untuk induksi kalus, yaitu : 0, 0,25, 0,5, 1, 2 dan 3 mg/l, sedangkan pada percobaan IIb, eksplan berkalus yang sudah dikulturkan pada media induksi kalus dengan berbagai konsentrasi 2,4-D tersebut dipindahkan ke media penginduksi tunas (MS + 0,1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l BA). Setiap satuan percobaan terdiri dari 5 botol kultur (IIa) dan 2 botol kultur (IIb), yang masing-masing berisi satu eksplan potongan daun.

Pengamatan terhadap kalus dilakukan umur 4 minggu, sedangkan pengamatan terhadap tunas dilakukan pada umur 8 minggu setelah pemindahan eksplan berkalus ke media induksi tunas. Skema perlakuan pada percobaan II adalah sebagaimana pada Gambar 4 berikut:



Gambar 4. Skema perlakuan pada percobaan II

Variabel yang diamati pada percobaan IIa adalah persentase eksplan berakar, jumlah akar per eksplan, persentase eksplan berkalus dan banyaknya kalus yang terbentuk, yang diukur dengan cara skoring yang dilengkapi dengan penampilan visual eksplan berkalus. Skoring banyaknya kalus yang terbentuk adalah : 0: tidak terbentuk kalus sama sekali; 0: tidak terbentuk kalus, 1: kalus yang terbentuk sedikit; 3: kalus yang terbentuk sedang; 4: kalus yang terbentuk banyak; 5: kalus yang terbentuk sangat banyak. Penentuan skor pembentukan kalus krisan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Penentuan skor pembentukan kalus krisan. (0) tidak ada, (1) sedikit, (2) sedang, (3) banyak, (4) sangat banyak

Variabel yang diamati pada percobaan Iib adalah persentase eksplan yang membentuk tunas adventif dan jumlah tunas adventif per eksplan.

Pada penelitian ini, data akan diolah menggunakan Standar Error (SE) dengan program EXTAT.

3.2.3 *Pelaksanaan Percobaan*

3.2.3.1 Pembuatan Media Kultur

Pembuatan media dalam percobaan Iia adalah media yang berisi garam-garam makro dan mikro MS dan 30 g/l sukrosa, 0,1 piridoksin-HCL 0,5 mg/l, thiamin-HCL 0,5 mg/l, myoinositol 100 mg/l, asam nikotinat 0,5 mg/l, glisin 2 mg/l, asam nikotinat 0,5 mg/l, glisin 2 mg/l, asam askorbat 150 mg/l, asam sitrat 50 mg/l dan air kelapa 150 ml/l serta ditambahkan konsentrasi 2,4 D (0,25, 0,5, 1,5, 2, dan 3 mg/l). Prosedur pembuatan media kultur sama dengan percobaan 1. Sedangkan media yang akan dibuat untuk percobaan Iib adalah media MS seperti percobaan

Ila yang ditambahkan konsentrasi BA 0,5 mg/l + TDZ 0,1 mg/l. Prosedur pembuatan media kultur sama dengan percobaan 1.

3.2.3.2 Penanaman Eksplan dan Kondisi Ruang Kultur

Penanaman percobaan Ila dilakukan dengan cara krisan *in vitro* dimasukkan ke dalam LAF, kemudian daun dipotong dengan ukuran 1 cm x 1 cm dengan tulang daun utama di bagian tengahnya, selanjutnya potongan daun tersebut ditanam ke media perlakuan. Setiap botol berisi 1 eksplan. Botol yang telah berisi eksplan ditutup rapat menggunakan plastik dan diikat dengan karet gelang. Botol-botol kultur tersebut kemudian diletakkan pada rak kultur dalam ruang gelap selama 4 minggu dengan suhu ruang 25°C. Penanaman induksi kalus dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Penanaman induksi kalus : (a) bahan tanam yang digunakan, (2) mengeluarkan eksplan, (c) membuang akar dan batang, (d) memotong daun krisan, (e) ukuran eksplan 1 cm x 1 cm, (f) menanam eksplan ke media, (g) mengikat botol dengan karet, (h) eksplan disimpan dalam ruang gelap

Untuk penanaman pada percobaan IIb dilakukan dengan cara, kalus yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi 2,4-D (0, 0,25,0,5,1,2,3 mg/l) ditanam pada media perlakuan BA dengan TDZ. Setiap botol berisi satu kalus. Botol yang telah berisi eksplan ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet. Kemudian kultur diinkubasi pada ruang kultur dengan penerangan lampu *fluoresens* 1.000-2000 lux dengan perioridas penyinaran pada suhu 24°C. Setiap 4 minggu sekali, eksplan akan disubkultur dengan media yang sama sampai kalus berumur 8 minggu.

3.3 Percobaan III: Pengaruh campuran media tanam terhadap keberhasilan aklimatisasi dan pertumbuhan planlet krisan cv. Puspita Nusantara

3.3.1 Bahan Tanaman

Bahan tanam yang digunakan dalam percobaan ini adalah *plantlet* yang ditumbuhkan dari media MS0 dan media MS + arang aktif 2 gr/l pada percobaan I.

3.3.2 Disain Percobaan, Pengamatan dan Analisis Data

Percobaan III ini dilaksanakan dengan Rancangan Teracak Lengkap dengan 3 ulangan. Perlakuan adalah faktor tunggal yang terdiri dari berbagai kombinasi media tanam aklimatisasi planlet yaitu: M1 (pasir malang + kompos dengan perbandingan 1:1), M2 (arang sekam dan kompos dengan perbandingan 1:1), dan M3 (arang sekam tanpa campuran media). Setiap satuan percobaan terdiri dari sepuluh pot yang masing-masing berisi satu planlet. Variabel yang diamati yaitu persen tanaman hidup, jumlah daun, tinggi tanaman, jumlah dan panjang akar.

Data yang diperoleh dianalisis ragam dan apabila hasil uji F nyata maka dilakukan uji lanjut dengan uji BNT 5%

3.3.4. Pelaksanaan Percobaan

3.3.4.1 Pencampuran Media Aklimatisasi

Penyiapan media tanam dilakukan dengan merendam komponen media tanam (arang sekam dan pasir malang) menggunakan fungisida Dithane M 45 selama \pm 24 jam, kemudian dibilas dengan air bersih. Selanjutnya kompos dicampur dengan pasir malang dengan perbandingan 1 : 1, kemudian campuran kompos dengan arang sekam dengan perbandingan 1 : 1 dan arang sekam tanpa campuran kompos dan pasir malang. Setelah kedua bahan media tanam bercampur secara merata kemudian dimasukkan dalam pot yang berdiameter 5 cm. Pot diisi dengan media tanam hingga 2 cm dari bibir pot, setelah itu pot ditempelkan label yang telah diberi keterangan jenis media dan tanggal aklimatisasi.

3.3.4.2 Cara Aklimatisasi Planlet

Plantlet krisan dalam botol yang sudah siap diaklimatisasi dikeluarkan dari ruang kultur kemudian diletakkan di ruang penguatan (hardening) selama 7 hari.

Aklimatisasi dilakukan dengan cara botol kultur diisi dengan sedikit air untuk mempermudah mengeluarkan *plantlet* dari botol kultur, kemudian secara perlahan *plantlet* diambil dengan menggunakan pinset dan akar dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan agar-agar media yang masih menempel pada akar.

Kemudian *plantlet* diseragamkan ukurannya dengan 3 kategori yaitu besar, sedang, dan kecil. Setelah itu akar *plantlet* krisan direndam dalam larutan

fungisida Dithane M 45 dengan konsentrasi 2 g/l selama 5 menit, lalu ditiriskan di atas nampan yang dialasi dengan kertas. *Plantlet* ditanam pada pot yang berukuran ± 5 cm, setiap pot berisi satu *plantlet* krisan. Satu perlakuan terdiri dari 3 ulangan yang terdiri dari 10 pot *plantlet* yang di dalam satu ulangan terdapat 3 ukuran *plantlet* yaitu besar, sedang, dan kecil.

Pot ditutup dengan plastik transparan dan disimpan di tempat teduh, namun secara bertahap plastik penutup dibuka. Tanaman disiram dua hari sekali dengan menggunakan *hand sprayer*. Sungkup plastik dibuka setelah 2 minggu setelah tanam. Tanaman disemprot dengan menggunakan pupuk daun growmore 2 gr/l setiap 2 kali dalam 1 minggu. Pada umur ± 2 bulan dalam pot, tanaman dipindahkan ke pot ukuran 30 cm (*replanting*). Proses aklimatisasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Aklimatisasi : (a) *hardening off*, (b) perendaman dithane pada media, (c) mengeluarkan plantlet, (d) pengelompokan plantlet, (e) penanaman, (f) plantlet yang sudah ditanam, (g) penyungkupan plantlet.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

Percobaan 1: Perbanyakan tunas aksilar krisan cv. Puspita Nusantara In Vitro

1. Penambahan 2 gr/l arang aktif ke dalam media MS meningkatkan tinggi tunas, jumlah daun, dan jumlah akar tunas krisan cv. Puspita Nusantara.
2. Penambahan BA konsentrasi 0,5, 1, dan 2 mg/l ke dalam media MS menghasilkan tunas yang lebih pendek dan jumlah akar yang lebih sedikit, namun jumlah buku dan jumlah tunas lebih banyak. Penambahan BA 0,5 mg/l menghasilkan bobot segar tunas yang tidak berbeda dengan kontrol, namun penambahan 1 mg/l meningkatkan bobot segar, sedangkan penambahan 2 mg/l BA menghasilkan bobot segar tunas yang lebih kecil.
3. Penambahan BA ke dalam media MS meningkatkan jumlah tunas. Peningkatan konsentrasi BA dari 0,5 mg/l menjadi 1 menambah jumlah tunas, namun penambahan 2 mg/l BA ke media MS menghasilkan jumlah tunas yang lebih sedikit. Penambahan kinetin (0,5, 1,0, 2,0 mg/l) ke dalam media MS hanya menghasilkan tunas tunggal yang sama dengan MS0 dan MSA.

Percobaan II: Studi organogenesis dari eksplan potongan daun

1. Penambahan 2,4-D atau tanpa 2,4-D dengan konsentrasi 0,25 – 3 mg/l efektif untuk merangsang proliferasi kalus. Intensitas kalus meningkat dengan penambahan 2,4-D dan peningkatan konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan ke dalam media.
2. Peningkatan konsentrasi 2,4-D ke dalam media MS menghasilkan jumlah akar semakin sedikit namun intensitas kalus meningkat. Konsentrasi 2,4-D yang menghasilkan intensitas kalus dengan intensitas tertinggi 3 mg/l 2,4-D.
3. Eksplan berkalus dari berbagai konsentrasi 2,4-D yang disubkultur ke media induksi tunas (0,1 mg/l TDZ+0,5 mg/l BA) membentuk tunas dengan persentase berbeda yang berkisar antara 38-63%. Persentase eksplan yang membentuk tunas paling tinggi (63%) didapatkan pada kontrol, perlakuan 0,25, dan 0,5 mg/l 2,4-D sedangkan perlakuan 2,4-D yang lebih tinggi (1,2,3 mg/l 2,4-D) menghasilkan persentase eksplan betunas 38%. Rata-rata jumlah tunas per eksplan terbanyak (9,8 tunas/eksplan) didapat pada perlakuan 0,5 mg/l 2,4-D.

Percobaan 3:Aklimatisasi

1. Penggunaan media kalimatisasi yang berbeda yaitu kompos+pasir malang, kompos+arang sekam, maupun arang sekam menghasilkan keberhasilan aklimatisasi yang tinggi yaitu 70-90%.
2. Penggunaan media arang sekam menghasilkan tinggi tanaman bobot segar yang lebih besar daripada kompos+pasir malang, atau kompos+arang sekam, namu kompos+pasir malang menghasilkan jumlah akar dan panjang akar yang lebih tinggi daripada kompos+arang sekam atau arang sekam.

5.2 Saran

Pada media induksi tunas adventif perlu penelitian lebih lanjut dengan konsentrasi tanpa BA + TDZ atau BA + tanpa TDZ, dan konsentrasi BA/TDZ berbagai taraf.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbas, F., C. Isikalan., S. Namli., and B.E.Ak. 2009. Effect of plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltsinki. *African Journal of Biotechnology*, 8 (22) : 6168-6174.
- Ali, A., S. Naz., F.A. Siddiqui., J. Iqbal. 2008. Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum*) through callogenesis and organogenesis. *Pakistan Journal Botanical*, 4 (11):123-138.
- Armini, N. M., G.A. Wattimena., L.W. Gunawan. 1991. *Perbanyakan Tanaman Bioteknologi Tanaman Laboratorium Kultur Jaringan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Astuti, D. 2007. Pengaruh beberapa konsentrasi thidiazuron pada pembentukan tunas adventif dua kultivar *Sansevieria trifasciata* secara *in vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
- BPS. 2014. <http://www.bps.go.id/site/pilihdata>. Diakses pada tanggal 31 Januari 2016.
- Cao.H., J.Yang., Z.S. Peng., C.Y. Kang., D.C. Chen., Z.C. Gong., X. Tan. 2007. Micropropagation of *Penthorum chinense* through axillary bud. *In vitro Cell. Development Biologi Plant*, 43:149-153.
- Djarmiko, B.S., Ketaren., S. Setyahartini. 1985. *Pengolahan Arang dan Kegunaannya*. Agro Industri Press. Bogor.
- Djumat, L.A. 2012. Multiplikasi *in vitro* Samama (*Anthocephalus macrophyllus* (Robx).Havil) melalui tunas pucuk dan tunas aksilar. *Seminar Nasional Basic Science VI*. F-MIPA UNPATTI. Ambon.
- Dumas, E., O. Monteuis. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants influence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 40: 231–235.
- Gati, E., I. Mariska. 1992. Pengaruh auksin dan sitokinin terhadap kalus *Mentha piperita* Linn. *Buletin Penelitian Tanaman Industri*. 3 : 1-4.

- George, E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Easter Press. England.
- Gahan, P.B., E.F. George. 2008. *Adventitious regeneration*. In : *Plant Propagation By Tissue Culture 3rd Edition*. Vol I. The Background. E.F. George., M.A.Hall., G-J de Klerk (eds). Springer. Dordrecht. The Netherland.501 p.
- Goldsworthy, A., M.G. Mina. 1991. Electrical patterns of tobacco cells in media containing indole-3-acetic acid or 2,4-D. *Planta*, 183 : 386-373.
- Gunawan, L. W. 1995. *Teknik Kultur In vitro Dalam Hortikultura*. Penerbit Penebar Swadaya. Jakarta. 68 Hlm.
- Hapsoro, D., R.B. Mayang.,Yusnita. 2011. Regenerasi *in vitro* tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) induksi dan proliferasi kalus, serta induksi tunas. *Agrotropika*, 16 (2) : 52.
- Hapsoro, D.,Yusnita. 2016. *Kultur Jaringan Untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.)*. Aura. Lampung. 122 hal.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester., F.T. Davies., R.L. Geneve. 2011. *Plant Propagation: Principles and Practices*. Seventh edition. Prentice Hall. New Jersey-USA.
- Hasim, I., M. Reza. 1995. *Krisan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Hendaryono, D.P.S., A. Wijayani. 1994. *Kultur Jaringan (Pengenal dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif)*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Hussain A., I.A. Qarshi., H. Nazir., I. Ullah. 2012. *Plant Tissue Culture : Current Status and Opportunities*. INTECH. DOI: 10.5772/50568.
- Hosseini,S.Z., N.B. Jelodar., H. Rahimian., G.Ranjbar.2015. Effect of different concentrations of kinetin and 2,4,D on callus induction of *Citrus rootstock (Citrus sp.)*. *Journal Biological*, 7(2) 1045-1050.
- Ilahi, I., M. Jabeen., S.N. Sadaf. 2007. Rapid clonal propagation of chrysanthemum through embryogenic callus formation. *Pakistan Journal Botanical*, 39 (6): 1945-1952.
- Islam, M.D.S.S., S. Khan., T. Ito., T. Maruo., Y. Shinohara. 2002. Characterization of the physico-chemical properties of environmentally friendly organic substrates in relation to rockwool. *Journal Horticulture. Science Biotechnological* , 77 (2): 143-148.

- Kane, M. E. 2000. Propagation from preexisting meristems. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises Second Editions*. CRC Press. New York.
- Karim, M.Z, M.N. Amin., M.A.K. Azad., F. Begum., M.M. Islam., R. Alam. 2002. Effect of different plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium*. *Pakistan Journal Of Biologi Science*, 3(6):553-560.
- Karim, M.Z., M.N. Amin., Assaduzzaman., S. Islam., F. Hossin., R. Alam. R. 2003. Rapid multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Through *In vitro* Culture. *Pakistan Journal Of Biologi Science*, 5 (11) : 1170-1172.
- Keresa, S., A. Mihovilovic., M. Baric., V. Zidovec., M. Skelin. 2012. The micropropagation of chrysanthemums via axillary shoot proliferation and highly efficient plant regeneration by somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology*, 11 (22) : 6027-6033.
- Khan, M.A., D. Khanam., K.A. Ara., A.K.M.A. Hossain. 1994. In vitro plant regeneration in *Chrysanthemum morifolium* Ramat Plant Tissue Culture, 4: 53-57.
- Lestari, E. G. 2011. Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal Agro Biogen*, 7 (1): 63-68.
- Maryani, Y., Zamroni. 2005. Penggandaan tunas krisan melalui kultur jaringan. *Ilmu Pertanian*, 12 (1) : 51-55.
- Mani, T., S. K. Senthii. 2011. Multiplication of chrysanthemum through somatic embryogenesis. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*, 1: 13-16.
- Michael, S.P. 2009. Effects of coconut water on callus initiation and plant regeneration potentials of sweetpotato. *Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales*, 144 (3&4) : 91-101.
- Muhit, A. 2007. Teknik produksi tahap benih vegetatif krisan. *Buletin Teknik Pertanian*, 12. (1).
- Murbandono, L.H.S. 2000. *Membuat Kompos*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Mok, M. C., R. C. Martin., D. W. S. Mok. 2000. Cytokinins: Biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plants*, 36:102-107.
- Namdeo, A. G., R.R. Mahadik., S.S. Kadam. 2006. Cost effective method for callus initiation from *Catharanthus roseus* leaves. *Pharmacology Magazine*, (2): 227-231.

- Rachmawati, Y.A. Pengaruh Konsentrasi IBA dan Jumlah Buku pada Keberhasilan Penyetekan Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) dengan Media Pasir Malang. Skripsi. Universitas Lampung. 61 hlm.
- Ravindran, C. P., M. Manokari., M.S. Shekhawat. 2016. *In vitro* propagation through ex vitro rooting of a medicinal spice *Piper longum* Linn. *World Scientific News*, 37:2-24.
- Rukmana, R., A.E. Mulyana. 1997. *Krisan*. Seri bunga potong. Kanisius. Yogyakarta.
- Rahayu, B. 2002. The effect of 2,4dichlorophenoxyacetic-acid (2,4-D) on callus growth and production flavonoid content on culture callus *Acalypha indica* L. *Journal Biopharmacy* 1 (1): 1-6
- Sheen, J. 2008. Cytokinin and auxin interplay in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, 453(7198): 1094–1097.
- Sherkar, H.D., A.M. Chavan. 2014. Effect of 2,4-D, BAP, and TDZ on callus induction and shoot regeneration in potato. *Science Research Reporter*, 4 (1): 101-105 .
- Sismanto, 2010. Studi Perbanyakan tanaman Anthurium Gelombang Cinta (*Anthurium plowmanii*) secara *in vitro*. Tesis Pascasarjana Magister Agronomi. Universitas Lampung.
- Sujatha, D., R. Chithakari, L. Raghuvardhan., B. Prasad., G. Khan R., A. Sadanandam., C. Reuben. T. 2013. *In vitro* plantlet regeneration and genetic transformation of sponge gourd (*Luffa cylindrica* L.). *African Journal of Plant Science* ,7(6): 244-252.
- Taji, A., P. Kumar., P. Lakshmanan. 2002. *In vitro Plant Breeding*. Food Products Press. New York. 167p.
- Thuringiensis, B., A. Mihovilovi., M. Bari., V. Zodovac., M. Skelin. 2012. Cultivation of chrysanthemums via axillary bud proliferation and regeneration plants are highly efficient with the introduction somatic embryogenesis. *African Journal of Plant Science* 11(22); 6027- 6033.
- Pari, G. 2002. Teknologi Alternatif Pemanfaatan Limbah Industri Pengolahan Kayu. Makalah Falsafah Sains. Program Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Van Staden, J.E. Zazimalova., E.F. George.2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In : *Plant Propagation By Tissue Culture 3rd edition*. Vol I. The Background. E.F. George., M.A.Hall., G-J de Klerk (eds). Springer. Dordrecht. The Netherland.501 p.

- Wankhede, K.N., M.N. Narkhede., R.S. Shivankar., T.H. Rathod. 2000. Callus induction and micropropagation studies in chrysanthemum. *Ann. Plant Physiol*, 14(2): 174-177.
- Waseem, K., M.S. Jilani., M.S. Khan. 2009. Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) through shoot tip culture. *African Journal Biotechnology*, 8(9): 1871-1877.
- Wattimena, G. A. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 143 hlm.
- Wattimena, G. A., L. W. Gunawan., N. A. Mattjik., E. Syamsudin., N. M. A. Wiendi., A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 68 hlm.
- Windiastika, G. 2013. *Peranan Kultur Jaringan dalam Memperoleh Benih Unggul*. Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan Surabaya. Surabaya.
- Yusnita., W. Pungkastiani., D. Hapsoro. 2011. *In vitro* organogenesis of two sansevieria cultivars on different concentrations of benzyladenine. *Agrivita*, 33:147-153.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan: Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 105 Hal.
- Yusnita, 2015. *Kultur Jaringan Tanaman Sebagai Teknik Penting Bioteknologi Untuk Menunjang Pembangunan Pertanian*. Orasi Ilmiah Guru Besar Bioteknologi Pertanian Universitas Lampung. Aura Publishing. Lampung.
- Zhang, W., Z.G. Ye., J. Cui., S.F. Qiu., W.H. Xu., H.P. Wang., L.B. Qian., H.D. Jiang., Q. Xia. 2009. Antiarrhythmic effect of ethyl acetate extract from *Chrysanthemum morifolium* Ramat on Rats. *Journal of Zhejiang University-Medicine/Medical Science*, 38: 377-382.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman; Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya*. Bumi Aksara, Jakarta.