

Pengaruh Jenis Media Kultur In Vitro dan Jenis Eksplan terhadap Morfogenesis Lili Oriental

Pramanik, D. dan F. Rachmawati

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

Naskah diterima tanggal 8 April 2009 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 13 Juli 2010

ABSTRAK. Perbanyakan secara in vitro merupakan teknik yang sangat menjanjikan untuk perbanyakan tanaman. Dengan teknik ini dapat diperoleh bibit tanaman yang banyak dalam waktu singkat. Tujuan penelitian ialah memperoleh informasi mengenai pengaruh jenis media dan jenis eksplan terhadap morfogenesis lili secara in vitro. Varietas yang digunakan ialah lili oriental cv. Donau. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cianjur, Jawa Barat, dari bulan Januari-Desember 2007. Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dua faktor dengan tiga ulangan. Faktor pertama ialah empat jenis media, yaitu A = Murashige dan Skoog (MS)+BAP 1 ppm+2,4-D 1 ppm, B = MS+NAA 0,5 ppm+TDZ 0,08 ppm, C=MS+NAA 1 ppm+TDZ 2 ppm, dan D = MS+2,4-D 1,5 ppm+Kinetin 1 ppm+TDZ 1 ppm dan faktor kedua adalah empat jenis eksplan (petal, petiol, ovul, dan sisik umbi). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada interaksi antara faktor pertama dan faktor kedua pada semua parameter yang diamati. Media B yang dikombinasikan dengan eksplan ovul memberikan hasil tertinggi untuk inisiasi pembengkakan eksplan, sedangkan media B dengan eksplan petal, serta media D dengan eksplan petal dan sisik umbi memberikan hasil terbaik untuk induksi kalus. Media A dan sisik umbi merupakan kondisi terbaik untuk pembentukan tunas dan akar. Media A dengan eksplan sisik umbi dan media C dengan eksplan tangkai bunga menunjukkan hasil perlakuan terbaik dalam menginduksi umbi mikro. Pembentukan kalus embriogenik tertinggi terjadi pada media D dengan eksplan petal.

Katakunci: Lili oriental cv. Donau; Media; Eksplan; Kalus embriogenik

ABSTRACT. Pramanik, D. and F. Rachmawati. 2010. The Effect of In Vitro Culture Media and Explants on Morphogenesis of Oriental Lily. Tissue culture technique is the promising method for plant multiplication. The aim of this study was to evaluate the effect of in vitro media and explants on the morphogenesis of oriental lily cv. Donau. The research was conducted by using randomized complete design with two factors and three replications. The first factor was media, that were A = Murashige and Skoog (MS)+BAP 1 ppm+2.4-D 1 ppm, B = MS+NAA 0.5 ppm+TDZ 0.08 ppm, C = MS+NAA 1 ppm+TDZ 2 ppm, and D = MS+2.4-D 1.5 ppm+Kinetin 1 ppm+TDZ 1 ppm. While second factors was explants, i.e. petal, peduncle, ovule, and bulb-scale. The results of the study showed that there was a very significant difference of interaction between first factor and second factor to all parameters observed. B medium combined with ovule explants gave the best treatment for explants-swollen induction. Meanwhile B medium with petal explants and D medium with petal and bulb-scale explants were the best treatment for callus induction. A medium with bulb-scale explants provided the best condition for shoot and root formation. A medium with bulb-scale explants and C medium with peduncle explants showed the best treatment in micro-bulb induction. The best result on embryogenic callus induction was D medium combined with petal explants.

Keywords: Oriental lily cv. Donau; Media; Explants; Embryogenic callus

Lili termasuk dalam genus *Lilium* salah satu dari 280 genus dari keluarga Liliaceae. Genus *Lilium* memiliki hampir 4.000 spesies (Carr 2010). Lili tersebar luas di seluruh dunia dan digemari masyarakat luas karena penampilan bunganya sangat menarik. Sebagian besar spesies lili merupakan tanaman herba semusim yang diperbanyak dengan umbi. Di antara berbagai spesies yang dibudidayakan, lili oriental sangat populer di Jepang, USA, dan beberapa negara Eropa dan Asia (Nhut *et al.* 2001a). Di Indonesia lili banyak dibudidayakan di Cipanas-Cianjur, Bandung, Sukabumi, Malang, dan Bali (Setiawati 2007).

Perbanyakan tanaman lili secara komersial saat ini umumnya dilakukan melalui umbi dengan ukuran keliling 10-14 cm (Budiarto dan Hilman 2007). Teknik perbanyakan melalui umbi memerlukan waktu yang cukup lama, karena itu diperlukan perbanyakan klonal secara massal sebagai persiapan untuk pengembangan secara komersial. Salah satu alternatif untuk penyediaan benih secara massal ialah melalui pengembangan teknik kultur jaringan yang dapat menyediakan benih dalam jumlah besar dan dalam waktu yang relatif singkat. Kultur jaringan merupakan salah satu teknik perbanyakan tanaman yang potensial untuk mendukung pengembangan induksi benih

lili. Inovasi ini tidak hanya untuk menyediakan bibit secara massal, tetapi juga digunakan untuk mengeliminasi virus pada lili (Dapkuniene *et al.* 2004). Teknik proliferasi tunas maupun induksi kalus embriogenik dikembangkan untuk penyediaan benih lili bermutu. Dengan teknik ini diharapkan kebutuhan benih lili dapat terpenuhi, sehingga mengurangi volume impor dari Belanda seperti yang terjadi saat ini.

Umumnya teknik perbanyak klonal lili menggunakan eksplan umbi dari lapangan. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, perbanyak lili secara *in vitro* dapat dilakukan menggunakan eksplan berbagai organ tanaman, antara lain sisik umbi (Stimart dan Ascher, 1981), anther (Qu *et al.* 1988), embrio (McRae dan McRae 1979), segmen batang dan umbi mikro (Nhut 1998), atau lapisan umbi mikro (Bui *et al.* 1999). Sayatan tipis eksplan batang, daun, akar, atau embrio juga digunakan sebagai sumber eksplan untuk menginisiasi somatik embriogenesis dan regenerasi tunas beberapa spesies lili (Bui *et al.* 1998a).

Selain jenis eksplan, morfogenesis lili secara *in vitro* sangat bergantung pada media yang digunakan. Pada penelitian sebelumnya, media dasar yang umum digunakan dalam perbanyak lili secara *in vitro* ialah media Murashige dan Skoog (Nhut *et al.* 2006 dan 2001a, Chang *et al.* 2000). Hasil penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa proses pembentukan organ bukan hanya dipengaruhi oleh media dasar, tetapi juga oleh hormon pertumbuhan, terutama sitokinin dan auksin. Menurut Wattimena *et al.* (1992) auksin berperan dalam berbagai aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman antara lain pembesaran sel, penghambatan mata tunas samping, aktivitas sel kambium, dan pertumbuhan akar. Auksin sintetik yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* antara lain *2,4-dichlorophenxy acetic acid* (2,4-D), *α-naphthalene acetic acid* (NAA), *indole acetic acid* (IAA), *4-chlorophenoxy acetic acid* (4-CPA), dan pikloram. Menurut George dan Sherrington (1984) pengaruh sitokinin dalam kultur jaringan antara lain menstimulasi pembelahan sel, pembentukan tunas adventif, dan proliferasi tunas aksilar, serta pembentukan akar. Sitokinin yang biasa digunakan ialah kinetin, *Benzyl Amino Purine* (BAP), dan zeatin. Walaupun demikian setiap tanaman memiliki

kisaran kebutuhan hormon yang berbeda. Hal tersebut menyebabkan sulitnya menentukan model aksi hormon (Nhut *et al.* 2001a). Oleh karena itu kebutuhan hormon harus ditentukan secara empiris melalui pengamatan terhadap pola pertumbuhan morfogenesis pada berbagai eksplan dengan berbagai media yang diuji.

Pada percobaan ini diteliti pengaruh media dengan komposisi hormon yang berbeda pada berbagai jenis eksplan dari organ bunga (petal, tangkai bunga, ovul, dan sisik umbi) terhadap morfogenesis pada kultur *in vitro* lili. Media yang digunakan merupakan media pengembangan hasil penelitian sebelumnya yang potensial untuk perbanyak lili oriental. Hasil penelitian berupa protokol perbanyak lili oriental secara *in vitro*, baik melalui jalur organogenesis maupun embriogenesis. Protokol tersebut dapat digunakan sebagai bahan untuk produksi planlet secara massal maupun untuk pengembangan riset lainnya seperti pemuliaan lili dengan teknik mutasi maupun transformasi gen.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan Januari sampai Desember 2007 di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cianjur. Lili yang digunakan ialah lili oriental cv. Donau. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dengan dua faktor perlakuan dan tiga ulangan. Faktor pertama ialah komposisi media dengan empat taraf yaitu: (1) A= MS (Murashige dan Skoog medium)+BAP 1 ppm+2,4-D 1 ppm, (2) B = MS+NAA 0,5 ppm +TDZ 0,08 ppm, (3) C = MS+NAA 1 ppm+ TDZ 2 ppm, dan (4) D = MS+2,4-D 1,5 ppm+Kinetin 1 ppm+TDZ 1 ppm. Komposisi media dasar yang digunakan ialah media MS penuh yang mengandung 3% sukrosa dan 0,25% fitagel. Faktor perlakuan kedua ialah empat jenis eksplan, yaitu: petal, tangkai bunga, ovul, dan sisik umbi. Setiap perlakuan terdiri atas lima botol kultur dengan tiga ulangan. Dengan demikian terdapat 240 satuan percobaan untuk seluruh kegiatan penelitian. Penanaman dilakukan sebanyak dua kali untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat dan konsisten. Penanaman pada media perlakuan terbagi menjadi kultur aseptik pertama dan diulang pada kultur aseptik kedua.

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan membersihkan eksplan menggunakan air mengalir. Untuk sisik umbi, setiap sisik dipisahkan dari umbinya. Kemudian sisik umbi dibersihkan menggunakan detergen, lalu dibilas dengan akuadestilata. Eksplan direndam selama 30 menit dalam larutan fungisida sistemik 1% (50% bahan aktif benomil) dan larutan bakterisida sistemik (bersifat bakteriostatik antibiotika) 1%, kemudian direndam lagi dalam larutan 5% klorox (5,25% bahan aktif sodium hipoklorit) selama 10 menit dan dibilas menggunakan akuadestilata sebanyak tiga kali. Kemudian eksplan direndam menggunakan alkohol 70% selama 5 menit dan dibilas dengan akuadestilata steril sebanyak tiga kali. Di dalam *laminar air flow cabinet* (LAF), eksplan direndam lagi dalam klorox 8% selama 10 menit, kemudian dibilas menggunakan akuadestilata steril sebanyak lima kali.

Eksplan dipotong $\pm 1-1,5 \text{ cm}^2$ untuk petal dan sisik umbi, sedangkan eksplan ovul dan tangkai bunga dipotong $\pm 0,5-1 \text{ cm}$. Potongan eksplan dilukai di bagian tengah untuk merangsang inisiasi morfogenesis tanaman. Kemudian eksplan ditanam pada medium inisiasi kalus dengan posisi terbalik dan sedikit ditekan.

Kultur eksplan diinkubasi dalam lingkungan gelap pada suhu $24 \pm 1^\circ\text{C}$ hingga terjadi morfogenesis. Selanjutnya hasil morfogenesis ditempatkan dalam kondisi terang untuk diinduksi menjadi planlet utuh dengan periodisitas penyinaran 12 jam terang selama 6 minggu.

Pengamatan dilakukan sejak 1 minggu setelah inkubasi dan dilakukan periodik setiap minggunya dengan mengamati interaksi antara jenis eksplan dan media terhadap pertumbuhan eksplan. Hasil pengamatan diperoleh dengan menghitung frekuensi jumlah eksplan (dalam persen) yang dapat menginisiasi: (1) pembengkakan eksplan, pertumbuhan kalus, tunas, akar, dan umbi mikro, dan (2) pertumbuhan kalus embriogenik dan warna kalus embriogenik.

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan rerata perlakuan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan (DMRT) pada taraf uji 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembengkakan Eksplan, Inisiasi Kalus, Inisiasi Tunas, Inisiasi Akar, dan Inisiasi Umbi Mikro

Protokol perbanyakan in vitro dibuat berdasarkan informasi hasil morfogenesis tanaman model lili oriental cv. Donau. Penggunaan media dan eksplan memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap pertumbuhan morfogenesis. Menurut Nhut *et al.* (2001a) komposisi media dapat menstimulasi pembentukan organ secara langsung, seperti planlet, tunas, akar, *protocorm-like bodies* (Plbs), kalus, dan embrio somatik.

Tabel 1 menunjukkan bahwa peubah eksplan yang membengkak berbeda nyata pada taraf kombinasi media dan eksplan. Inisiasi pembengkakan eksplan terjadi 2-6 minggu setelah inkubasi (MSI). Pembengkakan eksplan terjadi pada media B dan eksplan ovul (Gambar 4), dengan nilai rerata 86,68%. Nilai terendah ditemukan pada media C dengan eksplan petal (40%). Komposisi media B yang mengandung NAA dan TDZ dalam jumlah yang seimbang dapat menginisiasi terjadinya pembesaran sel eksplan yang selanjutnya diikuti proses organogenesis atau embriogenesis.

Tabel 2 menunjukkan bahwa inisiasi kalus dipengaruhi oleh interaksi antara media dan jenis eksplan. Rerata persentase pembentukan kalus dipengaruhi oleh interaksi antara jenis media dan jenis eksplan. Media B dengan eksplan petal dan media D dengan eksplan petal dan sisik umbi mengindikasikan pertumbuhan kalus sebesar 80%. Sebaliknya interaksi media C yang berinteraksi dan eksplan ovul tidak ditemukan kalus. Hal tersebut diduga karena komposisi hormon eksogen pada media tidak sesuai dengan kebutuhan eksplan. Secara umum kombinasi media B dan D dengan keempat jenis eksplan berpotensi untuk menginisiasi kalus cukup tinggi (40-80%).

Tabel 3 menunjukkan bahwa inisiasi tunas terjadi pada 6-10 MSI pada kombinasi media A dengan eksplan sisik umbi (80%) (Gambar 1). Rerata frekuensi inisiasi tunas yang tertinggi diperoleh juga pada kombinasi media C dan D dengan eksplan sisik umbi masing-masing

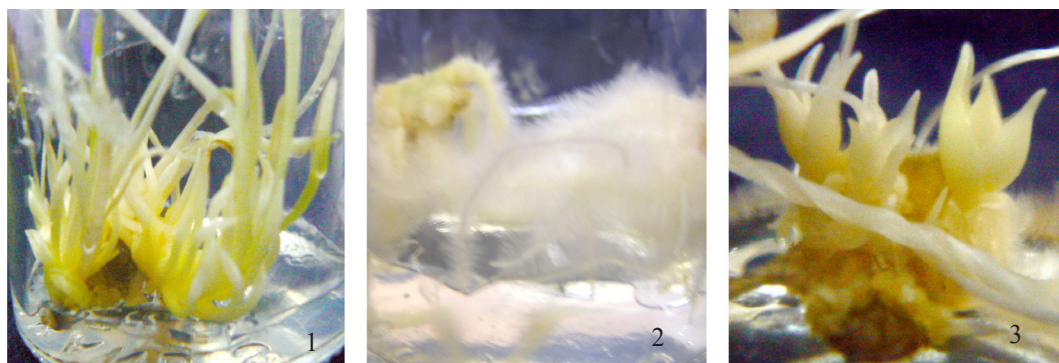
Tabel 1. Pengaruh komposisi media dan eksplan terhadap frekuensi eksplan membesar (The effect of media composition and explants on frequency of swollen explants)

Media (Media)	Rerata frekuensi pembengkakan eksplan (Average on frequency of swollen explants)			
	Petal (Petal)	Tangkai bunga (Peduncle)	Ovul (Ovule)	Sisik umbi (Bulb-scale)
 %			
MS+BAP 1 ppm+2,4-D 1 ppm	50,00 b	60,00 a	73,33 a	46,67 b
MS+NAA 0,5 ppm +TDZ 0,08 ppm	53,33 b	53,33 b	86,68a	60,00 ab
MS+NAA 1 ppm+ TDZ 2 ppm	40,00 c	60,00 a	73,33a	66,67 ab
MS+2,4-D 1,5 ppm+Kinetin 1 ppm +TDZ 1 ppm	80,00 a	66,67 a	66,67a	73,33 a

Nilai koefisien keragaman adalah 9,897 (The number of coefficient variant is 9.897)

Tabel 2. Pengaruh jenis media dan eksplan terhadap frekuensi inisiasi kalus (The effect of media composition and explants on frequency of callus initiation)

Media (Media)	Rerata frekuensi inisiasi kalus (Average on frequency of callus initiation)			
	Eksplan (Explants)			
	Petal (Petal)	Tangkai bunga (Peduncle)	Ovul (Ovule)	Sisik umbi (Bulb-scale)
 %			
MS+BAP 1 ppm+2,4-D 1 ppm	33,33 b	26,67 b	20,00 b	53,33 b
MS+NAA 0,5 ppm +TDZ 0,08 ppm	80,00 a	66,67 b	06,67 c	73,33 a
MS+NAA 1 ppm+ TDZ 2 ppm	33,33 c	40,00 b	00,00 c	53,33 b
MS+2,4-D 1,5 ppm+Kinetin 1 ppm +TDZ 1 ppm	80,00 a	66,67 a	40,00 a	80,00 a



Gambar 1-3. Respons pertumbuhan eksplan terhadap empat jenis media (Response of explants growth on four media composition): (1) inisiasi tunas pada eksplan sisik umbi dengan media A (shoot initiation of bulb-scale in A medium), (2) inisiasi akar pada eksplan sisik umbi pada media A (root initiation of bulb-scale in A medium), (3) inisiasi umbi mikro pada eksplan tangkai bunga dengan media C (micro-bulb initiation of flower-stalk in C medium)

sebesar 66,67 dan 73,33%. Eksplan ovul tidak menginisiasi tunas pada keempat komposisi media. Hal itu berarti inisiasi tunas sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan. Sisik umbi merupakan eksplan terbaik pada keempat komposisi media yang digunakan (Tabel 3).

Hal tersebut diduga karena eksplan sisik umbi mengandung hormon sitokinin endogen yang tinggi, sehingga komposisi hormon pada media tidak berpengaruh terhadap inisiasi tunas.

Interaksi antara empat jenis media dengan empat jenis eksplan memberikan persentase akar

yang terinisiasi dibawah 50% (Tabel 4). Persentase inisiasi akar tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan media A dengan sisik umbi (40%). Namun nilai tersebut tidak berbeda nyata dengan persentase inisiasi akar pada sisik umbi pada media B (33,33%) dan C (26,67%) (Gambar 2).

Data pada Tabel 5 menunjukkan bahwa inisiasi umbi mikro terjadi pada 8-10 MSI. Interaksi antara empat jenis media dan empat jenis eksplan tidak menginduksi inisiasi umbi mikro yang tinggi. Potensi terbentuknya umbi mikro berkisar dari 0-33%. Pembentukan umbi mikro tertinggi terjadi pada media C dengan eksplan tangkai bunga (Gambar 3). Pada media A, eksplan sisik umbi, terinduksi umbi mikro dengan frekuensi 33,3%. Eksplan ovul mampu menginisiasi pembengkakan eksplan, inisiasi kalus, dan akar, tetapi tidak mampu menginisiasi umbi mikro. Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa induksi umbi mikro dapat diinisiasi dari perlakuan (Nhut *et al.* 2002).

Menurut Yu dan Omelko (2008) secara in vitro tanaman memiliki potensi morfogenesis yang luas karena dapat berevolusi dari jaringan vaskuler tanaman. Walaupun demikian, morfogenesis tersebut dipengaruhi oleh faktor internal dan eksternal. Hal ini menyebabkan kesulitan dalam menentukan tipe in vitro morfogenesis.

Kombinasi antara jenis media dengan kandungan ZPT yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda pula terhadap inisiasi kalus, tunas, akar, dan umbi mikro pada lili cv. Donau. Setiap jenis media dan jenis eksplan menginduksi pertumbuhan morfogenesis yang spesifik. Eng (2006) mampu menginduksi morfogenesis tanaman melalui manipulasi media kultur dan ZPT, seleksi genotip, dan sumber eksplan. Hal tersebut telah dibuktikan oleh Nhut *et al.* (2001a) bahwa auksin dan sitokinin pada media kultur serta jenis eksplan dapat menginduksi morfogenesis tanaman lili.

Tabel 3. Pengaruh jenis media dan eksplan terhadap frekuensi inisiasi tunas (*The effect of media composition and explants on frequency of shoot initiation*)

Media (Media)	Rerata frekuensi inisiasi tunas (Average on frequency of shoot initiation)			
	Eksplan (Explants)			
	Petal (Petal)	Tangkai bunga (Peduncle)	Ovul (Ovule)	Sisik umbi (Bulb-scale)
	%.....			
MS + BAP 1 ppm +2,4-D 1 ppm	46,67 a	13,33 b	00,00 a	80,00 a
MS+NAA 0,5 ppm +TDZ 0,08 ppm	33,33 a	46,67 a	00,00 b	46,67 b
MS+NAA 1 ppm+ TDZ 2 ppm	46,67 a	26,67 ab	00,00 c	66,67 a
MS+2,4-D 1,5 ppm+Kinetin 1 ppm +TDZ 1 ppm	53,33 a	46,67 a	00,00 d	73,33 a

Tabel 4. Pengaruh jenis media dan eksplan terhadap frekuensi inisiasi akar (*The effect of media composition and explants on frequency of root initiation*)

Media (Media)	Rerata frekuensi inisiasi akar (Average on frequency of root initiation)			
	Eksplan (Explants)			
	Petal (Petal)	Tangkai bunga (Peduncle)	Ovul (Ovule)	Sisik umbi (Bulb-scale)
	%.....			
MS+BAP 1 ppm +2,4-D 1 ppm	13,33 ab	13,33 ab	00,00 b	40,00 a
MS+NAA 0,5 ppm +TDZ 0,08 ppm	13,33 ab	13,33 ab	00,00 b	33,33 a
MS+NAA 1 ppm+ TDZ 2 ppm	33,33 a	26,67 a	13,33 a	26,67 a
MS+2,4-D 1,5 ppm+Kinetin 1 ppm +TDZ 1 ppm	13,33 b	13,33 b	13,33 ab	13,33 b

Tabel 5. Pengaruh jenis media dan eksplan terhadap frekuensi inisiasi umbi mikro (*The effect of media composition and explants on frequency of micro-bulb initiation*)

Media (Media)	Rerata frekuensi inisiasi umbi mikro (Average on frequency of micro-bulb initiation)			
	Eksplan (Explants)			
	Petal (Petal)	Tangkai bunga (Peduncle)	Ovul (Ovule)	Sisik umbi (Bulb-scale)
%			
MS+BAP 1 ppm+2,4-D 1 ppm	06,67 ab	20,00 ab	00,00 b	33,33 a
MS+NAA 0,5 ppm +TDZ 0,08 ppm	06,67 ab	26,67 ab	00,00 b	20,00 a
MS+NAA 1 ppm+ TDZ 2 ppm	06,67 a	33,33 a	00,00 a	26,67 a
MS+2,4-D 1,5 ppm+Kinetin 1 ppm +TDZ 1 ppm	06,67 b	26,67 b	00,00 b	26,67 b

Penggunaan auksin 2,4-D dan NAA dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari sitokinin dapat menginisiasi kalus embriogenik. Penambahan 2,4-D konsentrasi yang rendah (1,5 ppm) yang dikombinasikan dengan dua jenis sitokinin (kinetin dan TDZ) ternyata efektif menginisiasi tunas. Hasil ini membuktikan bahwa penggunaan 2,4-D pada konsentrasi yang rendah dapat meningkatkan pertumbuhan embriosomatik. Penambahan TDZ pada dua jenis media berpengaruh nyata terhadap inisiasi kalus pada lili oriental cv. Donau. Media B dan D memberikan pengaruh tertinggi terhadap nilai rerata frekuensi pembentukan kalus embriogenik. Hasil ini membuktikan bahwa TDZ sebagai salah satu senyawa *Phenylurea* sintetik (Hamidah *et al.* 1997) banyak menentukan dalam inisiasi kalus (Singh dan Syamal 2001). Respons eksplan terhadap hormon ini sangat dipengaruhi oleh konsentrasinya (Nhut *et al.* 2001a). Pada kultur lili, penggunaan TDZ dalam konsentrasi rendah (0,08-1 ppm) dapat meningkatkan peran hormon auksin (NAA dan 2,4-D) dalam meningkatkan pertumbuhan kalus. Penggunaan 2,4-D dan NAA dalam konsentrasi yang rendah memegang peran penting dalam keseluruhan hasil percobaan. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Nhut *et al.* (2001b) bahwa penggunaan hormon 2,4-D dan NAA dapat meningkatkan potensi pembentukan kalus, tunas, akar, dan umbi mikro.

Frekuensi dan Warna Kalus Embriogenik

Hasil pengamatan terhadap frekuensi dan warna kalus embriogenik disajikan pada Tabel 6. Kalus embriogenik dan nonembriogenik pada eksplan lili berwarna kuning (Gambar 6 dan 7).

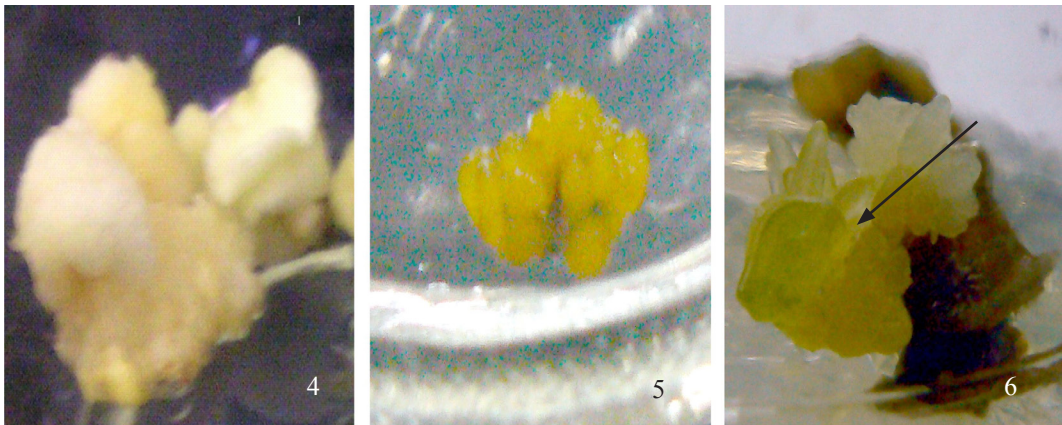
Warna kalus tersebut berubah menjadi kehijauan apabila terjadi pembentukan kotiledon dan planlet (Gambar 6).

Inisiasi kalus embriogenik tidak terjadi pada semua eksplan yang diinkubasikan pada media A dan C. Inisiasi kalus embriogenik hanya terjadi pada dua jenis media dan dua jenis eksplan yaitu pada media D dan B, dengan eksplan petal dan tangkai bunga. Kalus embriogenik pada semua perlakuan berwarna kuning. Frekuensi kalus embriogenik yang terbesar diperoleh dari media D dengan eksplan petal sebesar 90%. Nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan frekuensi kalus embriogenik yang dihasilkan pada media D dengan eksplan tangkai bunga (85%).

Penggunaan hormon auksin pada beberapa spesies telah terbukti efektif untuk menginisiasi somatik embriogenesis. Hormon ini berguna saat pertumbuhan apikal (Schwabe 1984). Menurut Fujimura dan Komamine (1980) untuk kultur yang berasal dari jaringan yang telah berdiferensiasi, penambahan ZPT eksogen khususnya auksin tunggal maupun auksin yang dikombinasikan dengan sitokinin sangat penting untuk menginduksi embriogenesis. Seperti pada pertumbuhan embriogenesis *Anthurium* inisiasi kalus dapat terjadi pada aplikasi 2,4-D dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan konsentrasi sitokinin (Teng 1997). Menurut Evans *et al.* (1981) dari semua jenis hormon golongan auksin, 2,4-D terbukti memiliki peran yang penting, dengan keberhasilan inisiasi embriosomatik 57,1%, sedangkan menurut Vasil dan Vasil (1981) penggunaan auksin jenis 2,4-D sangat efektif untuk menginisiasi kalus embriogenik pada kultur millet, serealia, dan

Tabel 6. Warna dan jumlah kalus embriogenik pada media dan eksplan yang berbeda (*The color and number of embryogenic callus from different media and explants*)

Media (Media)	Hasil observasi (Observation parameters)			
	Warna kalus embriogenik (The color of embryogenic callus)		Jumlah kalus embriogenik (The number of embryogenic callus)	
	Petal (Petal)	Tangkai bunga (Peduncle)	Petal (Petal)	Tangkai bunga (Peduncle)
 %			
MS+BAP 1 ppm+2,4-D 1 ppm	-	-	0,0	0,0
MS+NAA 0,5 ppm +TDZ 0,08 ppm	Kuning (Yellow)	Kuning (Yellow)	65	70
MS+NAA 1 ppm+ TDZ 2 ppm	-	-	0,0	0,0
MS+2,4-D 1,5 ppm+Kinetin 1 ppm+TDZ 1 ppm	Kuning (Yellow)	Kuning (Yellow)	90	85



Gambar 4-6. Respons pertumbuhan eksplan terhadap empat jenis media, adalah sebagai berikut: (4) pembengkakan eksplan ovul pada media B, (5) inisiasi kalus embriogenik pada eksplan petal dengan media B, dan (6) inisiasi kalus embriogenik pada eksplan sisik umbi dengan media D (*Explant growth response in four media composition are : (4) swollen explant from ovule in B medium, (5) embryogenic callus initiation from petal in B medium, and (6) embryogenic callus initiation from bulb-scale in D medium*)

rumpun-rumputan. Pada percobaan lainnya menunjukkan bahwa hormon TDZ sering digunakan untuk inisiasi embriogenesis (Zhang *et al.* 2001) dan organogenesis pada banyak jenis tanaman (Murch dan Saxena 2001). TDZ juga merupakan senyawa nonkunjungsi yang dapat diserap secara langsung dari medium oleh eksplan atau tanaman *in vitro*. Oleh karena pengaruhnya yang sangat kuat, hormon ini digunakan dalam konsentrasi yang rendah dibanding jenis sitokinin yang lain (de Klerk *et al.* 1999).

Pemberian ZPT khususnya hormon dari golongan auksin dan sitokinin sangat berpengaruh terhadap inisiasi kalus, baik kalus organogenik maupun kalus embriogenik. Media B memiliki komposisi hormon dengan perbandingan TDZ 0,08 ppm dan NAA 0,5 ppm, sedang media D memiliki komposisi hormon yang lebih lengkap 2,4-D 1,5 ppm, Kinetin 0,1 ppm dan TDZ 1 ppm. Hormon ini diketahui berpengaruh terhadap modifikasi metabolisme sitokinin dan auksin (Murthy *et al.* 1995) serta meningkatkan akumulasi dan translokasi auksin dalam jaringan tanaman (Murch dan Saxena 2001).

Kegagalan inisiasi kalus embriogenesis pada perlakuan kombinasi media A dan C dengan eksplan ovul dan sisik umbi diduga terjadi akibat tidak seimbangnya rasio perbandingan penggunaan auksin dan sitokinin eksogen, ataupun karena pemilihan jenis auksin dan sitokinin eksogen yang kurang sesuai. Walaupun pada percobaan sebelumnya Nhut *et al.* (2001a) melaporkan bahwa media C dapat menginduksi pembentukan embriosomatik, tetapi pada percobaan ini tidak diperoleh induksi embriosomatik.

KESIMPULAN

1. Kombinasi perlakuan jenis media dan eksplan dapat menginisiasi pembengkakan eksplan, pertumbuhan tunas, akar, umbi mikro, kalus embriogenik dan nonembriogenik pada lili oriental cv. Donau.
2. Pembentukan kalus embriogenik hanya diperoleh pada media B dan D yang dikombinasikan dengan eksplan petal dan eksplan tangkai bunga.
3. Warna kalus embriogenik dan nonembriogenik pada seluruh kombinasi perlakuan berwarna kuning.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Dr. Budi Winarto, MSc., Nina Marlina, Euis Rohayati, Dedi Rusnandi, dan Supenti, di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cianjur.

PUSTAKA

1. Alemano, L., M. Berthouly, and N. Michaux-Ferriere. 1996. Histology of Somatic Embryogenesis from Floral Tissue Cocoa. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. 46:187-194.
2. Budiarto, K dan Y. Hilman. 2007. Pengaruh Jenis Induktan Eksogen terhadap Pembungaan Lili pada Berbagai Ukuran Umbi. *Agritek*. 15(4):766-771.
3. Bui, V.L., D.M. Nghieng Thao, M. Jeanneau, S. Sadik, S Tu, J. Vidal, and K. Tran Thanh Van. 1998a. Rapid Plants Regeneration of *C₄* Dicot Species: *Amaranthus edulis*. *Plant Sci*. 132:45-54.

4. _____, D.T. Nhut, and K. Tran Thanh Van. 1999. Plant Production via Shoot Regeneration from Thin Cell Layer Pseudo-bublet Explants of *Lilium longiflorum* In Vitro. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences*. 322:303-310.
5. Carr, G. 2010. Liliaceae <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/lili.htm>. [22 Oktober 2010]
6. Chang, C., C.T. Chen, Y.C. Tsai, and W.C. Chang. 2000. A Tissue Culture Protocol for Propagation of a Rare Plant, *Lilium speciosum* Thunb. Var. *gloriosoides* Baker. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41:139-142.
7. de Klerk, G.J., W.V.D. Kreiken, and J.C. de Jong. 1999. The Information of Adventitious Roots: New Concepts, New Possibilities. *In Vitro. Cell Div. Biol.-Plant*. 35:189-199.
8. Dapkūniene, S., G. Indrišiūna, R. Juodkaite, M. Navalinskiene, and M. Samutiene. 2004. Tissue Culture for Elimination of Lily Viruses Depending on Explant Type. *Acta Universitatis Latviensis. Biology*. 676: 163-166.
9. Eng, Chang Pua. 2006. Regulation of Plant Morphogenesis In Vitro Role of Ethylen and Polyamines on Biotechnology and Sustainable Agriculture. In: Xu, Zhihong, Jiayang Li, Yongbiao Xue, and Weicai Yang (Eds.) *Proceeding of 11th IAPTC and Congress*. August 18-31, Beijing China.
10. Evans, D.A., W.R. Sharp, and C.E. Flick. 1981. Growth and Behavior of Cell Cultures; Embryogenesis and Organogenesis. In T.A. Thorpe (Ed.) *Plant Tissue Culture: Methods and Application in Agriculture*. Academic Press New York. pp.45-113.
11. Fujimura, T. and A. Komamine. 1980. Mode of Action of 2,4-D and Zeatin on Somatic Embryogenesis in a Carrot Cell Suspension Culture. *Z. Pflanzenphysiol*. 99:1-8.
12. George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited, England. 709 p.
13. Hamidah, M., A.G.A. Karim, and P. Debergh. 1997. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Anthurium andraeanum* L. Hybrids. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 48:183-193.
14. Kavathekar, A.K. and B.M. Johri. 1978. In Vitro Responses of Embryogenesis of *Escholiza californica*. *Bio Plant*. 20: 92-106.
15. McRae, E.A. and J.F. McRae. 1979. Eight Years of Adventure in Embryo Culture. *Lili Yearb. N. Amer. Lili Soc.* 32:74-81.
16. Murch, S.J. and P.K. Saxena. 2001. Molecular Fate of Thidiazuron and Its Effects on Auxin Transport in Hypocotill Tissues of *Pelargonium hortorum* x Bailey. *Plant Growth Regulation*. 35:269-275.
17. Murthy, B.N.S., S.J. Murch, and P.K. Saxena. 1995. Thidiazuron Induced Somatic Embryogenesis in Intact Seedling of Peanut (*Arachis hypogaea* L), Endogenous Growth Regulator Levels and Significance of Cotyledons. *Physiologia Plantarum*. 94:268-276.
18. _____. 1998. Micropropagation of *Lilium longiflorum* Thunb Via In Vitro Stem Node and Pseudo-bublet Culture. *Plant Cell Rep*. 17:913-916.

19. _____, V.L. Bui, and K. Tran Thanh Van. 2001a. Manipulation of the Morphogenetic Pathways of *Lilium longiflorum* Transverse Thin Cell Layer Explants by Auxin and Cytokinin. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 37:44-49.
20. _____, V.L. Bui, J.A. Teixeira da Silva, and C.R. Aswath. 2001b. Thin Cell Layers Culture System in *Lilium*: Regeneration and Transformation Perspectives. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 37:516-523.
21. _____, N.T. Minh, J.A. Teixeira da Silva, S. Fukai, M. Tanaka, and Tran Thanh Van K. 2002. Somatic Embryogenesis Through Pseudo Bublelet Transverse Thin Cell Layers of *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Reg.* 37:193-198.
22. Nhut D.T., N.T.M. Hanh, P.Q. Tuan, L.T.M. Nguyet, N.T.H. Tram, N.C. Chinh, N.H. Nguyen, and D.N. Vinh. 2006. Liquid Culture as a Positive Condition to Induce and Enhance Quality and Quantity of Somatic Embryogenesis of *Lilium longiflorum*. *Sci. Hort.* 110(1): 93-97.
23. Qu, Y., M.C. Mok, D.W.S. Mok, and J.R. Stang. 1988. Phenotypic and Cytological Variation Among Plants Derived from Anther Cultures of *Lilium longiflorum*. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 24:471-476.
24. Schwabe, W.W. 1984. *Phylotaxis in Positional Control in Plant Development*. In P. W. Barlow and D.J. Carr, (Eds.) Cambridge, UK. Cambridge University Press. pp:403-440.
25. Setiawati, E. 2007. Teknik Perbanyak Klon Lili Terseleksi Secara In Vitro. *Bul. Teknik Pert.* 12(1):4-6.
26. Singh, S.K. and M.M. Syamal. 2001. A Short Pre-culture Soak in Thidiazuron of Forchorfenuron Improves Axillary Shoot Proliferation in Rose Micropropagation. *HortSci.* 91:169-177.
27. Steward, F.C. 1958. Growth and Development of Cultured Cells. III. Interpretations of Growth from Free Cell to Carrot Plant. *Am. J. Bot.* 45:795-713.
28. Stimart, D.P., and P.D. Ascher. 1981. Foliar Emergence from Bublelets of *Lilium longiflorum* Thumb as Related to In Vitro Generation Temperature. *J.Am.Soc. Hortic.Sci.* 106:446-450.
29. Teng, W.L. 1997. Regeneration of Anthurium Adventitious Shoots Using Liquid or Raft Culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 49:153-156.
30. Terzy, M. and Lo Schiavo F. 1990. *Somatic Embryogenesis Plant Tissue Culture: Application and Limmitation*, S.S. Bhajwani, ed (Amsterdam:Elsevier) pp 54-101.
31. Vasil, V., and I.K. Vasil. 1981. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Tissue Culture of *Pennisetum americanum* and *Pennisetum americanum x P. purpureum* Hybrid. *Am.J.Bot.* 68:864-872.
32. Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N.A. Mattjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, dan A. Ermawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 247 Hlm.
33. Yu, N. Zuralev and A.M. Omelko. 2008. Reviews Plant Morphogenesis In Vitro. *Russia J. of Plant Phisiol.* 55(5):579-596.
34. Zhang, C.L., D.F.Chen, M.C. Elliot and A.Slater.2001. Thidiazuron-induced Organogenesis and Somatic Embryogenesis in Sugar Beet (*Beta vulgaris L.*) *In Vitro Cell Development and Biology-Plant.* 37:305-310.