

## Regenerasi Tanaman Kitolod (*Hippobroma longiflora* (L.) G.Don) pada Kultur *In Vitro*

## Plant Regeneration of Kitolod (*Hippobroma longiflora* (L.) G.Don) in *In Vitro* Culture

FITRI NUR'AENI<sup>1</sup>, DIAH RATNADEWI<sup>1\*</sup>, SUMARYONO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, Bogor 16680

<sup>2</sup>Laboratorium Biak Sel Tanaman, Jl. Jabaru II No. 21, Pasirkuda, Bogor 16119

Diterima 18 Maret 2022/Disetujui 21 April 2022

Kitolod (*Hippobroma longiflora* (L.) G. Don) is a wild plant. Its flower is widely used as a traditional medicine. When this plant is utilized more intensively, there may be a shortage of the plant due to the lack of seed sources. This study aimed to obtain the best techniques and culture conditions for *in vitro* propagation of kitolod to provide a large number of planting materials. The experiments were arranged using a completely randomized design with two treatment factors and 10 replications for all experiments except in shoot rooting. Leaves and petioles were used as explant sources. Various combinations of benzilamino purine (BAP) and naphtalene acetic acid (NAA) were applied. Leaf explants in Murashige and Skoog (MS) medium enriched with 1 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA combination produced the highest number of adventitious shoots per explant, but 2 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA was more effective for shoot initiation and multiplication. The latter medium was also able to produce the tallest shoots, and presented 75% of successful rate over the acclimatization period. The best rooting was provided by MS medium added with 0.5-1.0 mg/L NAA.

Key words: organogenesis, planting materials, tissue culture, traditional medicine

### PENDAHULUAN

Kitolod (*Hippobroma longiflora* (L.) G.Don) adalah salah satu tanaman obat tradisional dari famili Campanulaceae. Secara empiris, kitolod banyak digunakan oleh masyarakat untuk mengobati penyakit mata seperti katarak. Selain itu, tanaman kitolod memiliki efek antibakteri penyebab konjungtivitis (Siregar 2012), efek antifungi terhadap *Candida albicans* penyebab kandidiasis (Herdianto *et al.* 2016), efek antiglaukoma (Siska *et al.* 2016), antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis* penyebab karies gigi (Fazil *et al.* 2017), serta memiliki efek antituberkulosis (Aqila *et al.* 2017). Selain itu, ekstrak daun kitolod bisa dimanfaatkan sebagai bahan aktif dalam krim tabir surya (Savira dan Iskandar 2020).

Tanaman kitolod belum banyak dibudidayakan sebagai tanaman obat. Di Indonesia, orang menanam kitolod untuk keperluan sendiri, dengan teknik tradisional dalam pot, dengan sumber benih berupa biji, stek batang atau anakan. Tanaman kitolod yang

dibudidayakan jarang sampai menghasilkan biji, karena bunga dipetik untuk dimanfaatkan sebagai obat, sedangkan perbanyak tanaman kitolod secara *in vitro* sejauh ini belum dilakukan. Bila pemanfaatan tanaman ini semakin berkembang, dikhawatirkan akan terjadi kekurangan ketersediaan sumber benih, sedangkan untuk budidaya tanaman kitolod secara komersial, diperlukan benih dalam jumlah banyak. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan teknik kultur jaringan untuk mendapatkan benih tanaman kitolod secara cepat dan masal, dengan memperhatikan setiap pertumbuhan serta perkembangannya dalam kultur *in vitro*.

### BAHAN DAN METODE

**Bahan Eksplan.** Berupa daun dan petiol muda dari tanaman kitolod berumur  $\pm$  10 minggu sejak stek batangnya ditanam. Tanaman dipelihara di dalam polibag dan ditempatkan di selasar laboratorium yang terbuka.

**Sterilisasi Eksplan.** Eksplan direndam dalam larutan deterjen selama lima menit, kemudian dibilas dengan air mengalir hingga bersih. Lalu disterilisasi dengan etanol 70% selama 30 detik, kemudian dengan

\*Penulis korespondensi:

E-mail: dratnadewi@apps.ipb.ac.id

natrium hipoklorit komersial 1% yang telah ditambah Tween 80 (2 tetes/100 ml) selama 5 menit. Setelah itu, eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali.

**Inisiasi Tunas Adventif.** Inisiasi tunas dilakukan dengan menggunakan media dasar MS (Murashige dan Skoog 1962) padat, dengan kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa BAP dan NAA (Tabel 1). Eksplan berupa potongan helai daun (2 x 2 cm) dan potongan petiol (1-2 cm), ditanam sebanyak empat eksplan per botol kultur. Sepuluh botol kultur dibuat per perlakuan sebagai ulangan. Kultur dipelihara selama tujuh minggu di ruang kultur bersuhu  $25 \pm 1$  °C dengan intensitas cahaya 800-1.000 lux selama 16 jam per hari, dan diamati tiap minggu.

**Multiplikasi dan Pembesaran Tunas Adventif.** Setelah didapatkan tunas, tahap multiplikasinya dilakukan dengan memindahkan kelompok tunas tersebut ke media baru dengan komposisi yang sama dengan media inisiasi. Tunas dipelihara lagi selama tiga minggu dalam media tersebut, kemudian dipindahkan ke media pembesaran, yaitu MS + BAP 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L. Tunas adventif dipelihara selama lima minggu dalam media ini.

**Pengakaran.** Tunas yang sudah mencapai panjang 2-3 cm di media pembesaran dipindahkan ke media pengakaran, yaitu media MS ditambah dengan NAA 0.5 mg/L (MSA0.5) atau 1 mg/L (MSA1), dan NAA 0 mg/L (MSA<sub>0</sub>) berlaku sebagai kontrol. Kultur diinkubasi selama empat minggu dengan kondisi yang sama dengan sebelumnya di ruang kultur. Planlet yang telah berakar masuk ke tahap aklimatisasi.

Tabel 1. Komposisi perlakuan ZPT untuk inisiasi tunas

Kode perlakuan	Perlakuan
B <sub>1</sub> A <sub>0</sub>	BAP 1 mg/L + NAA 0 mg/L
B <sub>2</sub> A <sub>0</sub>	BAP 2 mg/L + NAA 0 mg/L
B <sub>4</sub> A <sub>0</sub>	BAP 4 mg/L + NAA 0 mg/L
B <sub>8</sub> A <sub>0</sub>	BAP 8 mg/L + NAA 0 mg/L
B <sub>1</sub> A <sub>0.1</sub>	BAP 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L
B <sub>2</sub> A <sub>0.1</sub>	BAP 2 mg/L + NAA 0.1 mg/L
B <sub>4</sub> A <sub>0.1</sub>	BAP 4 mg/L + NAA 0.1 mg/L
B <sub>8</sub> A <sub>0.1</sub>	BAP 8 mg/L + NAA 0.1 mg/L

Tabel 2. Pengaruh kombinasi ZPT pada tahap inisiasi tunas adventif *H. longiflora*, tujuh minggu setelah kultur

Eksplan	Perlakuan	Jumlah eksplan yang menghasilkan tunas/jumlah eksplan yang dikulturkan	% Respons	Rerata (dan selang) jumlah tunas per eksplan
Daun	B <sub>1</sub> A <sub>0</sub>	0/40	0.00	0.00
	B <sub>2</sub> A <sub>0</sub>	0/40	0.00	0.00
	B <sub>4</sub> A <sub>0</sub>	0/40	0.00	0.00
	B <sub>8</sub> A <sub>0</sub>	0/40	0.00	0.00
	B <sub>1</sub> A <sub>0.1</sub>	6/40	15.00	1.78 (0-32)
	B <sub>2</sub> A <sub>0.1</sub>	4/40	10.00	0.90 (0-19)
	B <sub>4</sub> A <sub>0.1</sub>	0/40	0.00	0.00
	B <sub>8</sub> A <sub>0.1</sub>	0/40	0.00	0.00
	Petiol	B <sub>8</sub> A <sub>0</sub>	0/40	0.00
B <sub>1</sub> A <sub>0.1</sub>		7/40	17.50	1.85 (0-23)

**Aklimatisasi.** Planlet berakar yang telah mencapai 4-5 cm dikeluarkan dari media pengakaran, dibersihkan dengan air mengalir, lalu akar diolesi dengan campuran Benlate dan Dithane (1:1). Planlet tersebut dipindahkan ke dalam polibag berisi campuran tanah:pasir:kompos (1:1:1) yang sudah steril. Tanaman disiram air agar media tanam tetap lembab. Selama tiga minggu pertama, tanaman diberi sungkup plastik bening yang sedikit dilubangi. Setelah itu, sungkup plastik berangsur dibuka. Pengamatan dilakukan pada minggu ke enam fase aklimatisasi ini.

**Analisis Data.** Data hasil pengamatan kualitatif disajikan secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif diolah menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dan uji multivariat analisis jalur (MANOVA) menggunakan *software Statistical Product and Service Solution (SPSS)* versi 26.0. Jika hasil uji memberikan perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji Tukey pada tingkat kepercayaan 95%.

## HASIL

**Inisiasi Tunas Adventif.** Pengaruh kombinasi ZPT menunjukkan bahwa hanya eksplan daun pada perlakuan B<sub>1</sub>A<sub>0.1</sub> dan B<sub>2</sub>A<sub>0.1</sub>, serta eksplan petiol perlakuan B<sub>1</sub>A<sub>0.1</sub> yang berhasil menginisiasi tunas, dengan kisaran 10.0-17.5% pada minggu ke tujuh (Tabel 2). Oleh karena itu, kedua kombinasi ZPT tersebut dipilih untuk media subkultur untuk multiplikasi tunas pada tahap berikutnya. Jumlah tunas per eksplan daun dalam tahap inisiasi tunas ini bervariasi antara 0-32. Eksplan daun dan petiol pada perlakuan B<sub>1</sub>A<sub>0.1</sub> menginisiasi lebih banyak tunas dari eksplan yang responsif tersebut.

Tunas adventif kitolod terbentuk melalui kalus lebih dahulu, yang segera berdiferensiasi menjadi tunas. Pembengkakan pada eksplan teramati pada tujuh hari setelah eksplan ditanam, ukuran eksplan menjadi lebih besar dari ukuran semula. Selanjutnya, muncul kalus pada eksplan, diawali pada tepian daun dan petiol yang terluka, yang menempel pada media (Gambar 1a dan b). Kalus pada eksplan kitolod berwarna hijau

muda, memiliki tekstur keras dan kompak. Setelah itu, pada kalus muncul bercak-bercak kecil berwarna keputihan (panah pada Gambar 1c). Pada minggu berikutnya, bercak tersebut memanjang membentuk primordium tunas (Gambar 1d), yang bertambah panjang dan berkembang menjadi tunas (Gambar 1e). Rerata waktu yang diperlukan eksplan untuk menjadi tunas utuh adalah tujuh minggu di media inisiasi.

Pemberian BAP tanpa NAA tidak dapat menginisiasi tunas. Penambahan NAA 0.1 mg/L pada BAP 4 mg/L dan 8 mg/L juga tidak dapat menginisiasi tunas. Beberapa eksplan mengalami pencokelatan (*browning*), menjadi agak mengering, dan tidak berkembang menjadi kalus maupun tunas. Semua eksplan, yang tumbuh dan belum tumbuh disubkultur satu kali ke medium baru dengan komposisi terbaik tersebut ( $B_1A_{0.1}$  dan  $B_2A_{0.1}$ ).

#### Multiplikasi dan Pembesaran Tunas Adventif.

Data dari perlakuan yang menghasilkan tunas diolah secara statistik. Rerata jumlah tunas menunjukkan tidak ada perbedaan antar-perlakuan (Tabel 3). Meskipun persentase eksplan yang menghasilkan tunas rendah, tunas adventif dapat tumbuh lebih banyak setelah disubkultur, rerata menjadi 2.65-3.23 tunas per eksplan, setelah tiga minggu di tahap multiplikasi. Persentase eksplan yang tumbuh bertambah, demikian juga dengan jumlah tunas, sehingga sejumlah kultur

mampu menghasilkan 35 hingga 49 tunas per eksplan. Tunas bermultiplikasi dengan membentuk rumpun, tanpa melalui kalus lagi. Eksplan daun dan petiol sama baiknya dalam menghasilkan tunas, namun eksplan daun pada  $B_1A_{0.1}$  mampu memberikan jumlah tunas per eksplan paling tinggi, yaitu sampai 49 tunas, dari 17.50% kultur yang responsif.

Dalam media pembesaran, tinggi tunas menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan antar-perlakuan asal (media inisiasi) (Tabel 4). Dalam media ini, tunas yang berasal dari eksplan daun dengan perlakuan  $B_2A_{0.1}$  paling tinggi ( $2.62 \pm 0.69$  cm) dari perlakuan lainnya.

**Pengakaran Tunas.** Perbedaan konsentrasi NAA berpengaruh nyata terhadap jumlah akar dan panjang akar (Tabel 5). Semua konsentrasi NAA dapat menginisiasi akar pada semua tunas, dengan kisaran 2.5-100%. NAA 0.5-1.0 mg/L terlihat baik dalam menumbuhkan akar. Tunas asal eksplan daun- $B_2A_{0.1}$  dan asal eksplan petiol- $B_1A_{0.1}$  memberikan perakaran terbaik pada kedua konsentrasi NAA tersebut. Media pengakaran tanpa NAA tetap dapat menginisiasi akar, namun persentasenya sangat rendah, yaitu 2.5 hingga 25% saja. Pemberian NAA 1 mg/L dapat mendorong pembentukan akar dengan jumlah yang lebih banyak pada tunas asal eksplan petiol- $B_1A_{0.1}$  dan daun- $B_1A_{0.1}$ .

Akar yang terbentuk merupakan akar adventif yang tumbuh dari pangkal batang, pada minggu



Gambar 1. Inisiasi tunas adventif pada eksplan daun dan petiol kitolod. Inisiasi kalus di daerah pelukaan pada eksplan daun (a) dan petiol (b) setelah tiga minggu kultur, bercak berwarna putih pada kalus (c), pemanjangan menjadi primordium tunas (d), tunas memanjang (e), dan eksplan mengalami pencokelatan (*browning*) pada perlakuan  $B_8A_{0.1}$  (f). Skala:  $\approx 5$  mm

kedua sampai ketiga setelah disubkultur ke media pengakaran. Perakaran pada tunas yang berasal dari eksplan daun- $B_1A_{0.1}$  memiliki karakter seperti serat, berwarna hijau tua dan memiliki lebih banyak akar cabang (Gambar 2a), sedangkan perakaran pada tunas yang berasal dari eksplan daun- $B_2A_{0.1}$  dan petiol- $B_1A_{0.1}$  memiliki karakter gemuk, berwarna hijau muda dan sedikit akar cabang (Gambar 2b dan c).

Tabel 3. Jumlah tunas adventif *H. longiflora* tiga minggu setelah disubkultur ke tahap multiplikasi

Eksplan	Perlakuan	Rerata (selang) jumlah tunas adventif per eksplan	% Eksplan yang menghasilkan tunas
Daun	$B_1A_{0.1}$	3.10 <sup>a</sup> (0-49)	17.50
	$B_2A_{0.1}$	2.65 <sup>a</sup> (0-35)	12.50
Petiol	$B_1A_{0.1}$	3.23 <sup>a</sup> (0-39)	27.50

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Tukey pada tingkat kepercayaan 95%

Tabel 4. Pembesaran tunas adventif *H. longiflora* pada media BAP 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, lima minggu setelah subkultur

Eksplan	Perlakuan	Rerata tinggi tunas adventif (cm)*
Daun	$B_1A_{0.1}$	1.57±0.36 <sup>a</sup>
	$B_2A_{0.1}$	2.62±0.69 <sup>b</sup>
Petiol	$B_1A_{0.1}$	2.41±0.68 <sup>b</sup>

\*Nilai rerata ± standar deviasi. Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Tukey pada tingkat kepercayaan 95%

Tabel 5. Pengaruh konsentrasi NAA pada pengakaran tunas *H. longiflora* empat minggu setelah subkultur

Asal tunas	Perlakuan	Panjang akar (cm)*	Jumlah akar*	Persentase tunas yang menghasilkan akar (%)
Daun $B_1A_{0.1}$	$MSA_0$	0.03±0.10 <sup>a</sup>	0.02±0.08 <sup>a</sup>	2.50
	$MSA_{0.5}$	0.87±0.39 <sup>b</sup>	2.80±1.23 <sup>b</sup>	72.50
	$MSA_1$	1.08±0.22 <sup>b</sup>	5.22±1.80 <sup>c</sup>	95.00
Daun $B_2A_{0.1}$	$MSA_0$	0.47±0.43 <sup>a</sup>	0.65±0.85 <sup>a</sup>	19.08
	$MSA_{0.5}$	1.88±0.19 <sup>c</sup>	5.10±0.56 <sup>b</sup>	100.00
	$MSA_1$	1.34±0.20 <sup>b</sup>	4.92±0.83 <sup>b</sup>	100.00
Petiol $B_1A_{0.1}$	$MSA_0$	0.72±0.63 <sup>a</sup>	0.42±0.39 <sup>a</sup>	25.00
	$MSA_{0.5}$	1.73±0.31 <sup>c</sup>	3.80±0.95 <sup>b</sup>	95.00
	$MSA_1$	1.32±0.26 <sup>b</sup>	6.72±2.14 <sup>c</sup>	97.50

\*Nilai rerata ± standar deviasi. Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Tukey pada tingkat kepercayaan 95%



Gambar 2. Perakaran tunas adventif kitolod setelah empat minggu di media pengakaran. Planlet asal eksplan daun  $B_1A_{0.1}$  (a), planlet asal eksplan daun  $B_2A_{0.1}$  (b), dan planlet asal eksplan petiol  $B_1A_{0.1}$  (c). Skala: ≈ 10 mm

**Aklimatisasi.** Planlet berhasil diaklimatisasi dengan persentase hidup sebesar 12.50 sampai 75.00% di dalam media campuran tanah:pasir:kompos (1:1:1), yang dipelihara selama enam minggu. Planlet yang berasal dari eksplan daun- $B_2A_{0.1}$  menunjukkan pertumbuhan paling baik, dilihat dari pertambahan jumlah daun, tunas aksilar, serta tinggi tanaman; demikian pula dengan persentase keberhasilan hidupnya di masa aklimatisasi, yang mencapai 75% (Tabel 6). Pertumbuhan tunas aksilar baru di tahap aklimatisasi terjadi, namun tidak tampak dipengaruhi oleh kombinasi ZPT di media inisiasi. Planlet asal eksplan petiol- $B_1A_{0.1}$  menunjukkan persentase keberhasilan hidup terendah (12.50%).

Secara umum, planlet mulai beradaptasi sejak minggu pertama sampai tiga minggu setelah dipindahkan ke tahap aklimatisasi. Setelah enam minggu, planlet asal daun- $B_1A_{0.1}$  memiliki perawakan yang besar, batang tipis, dan daun yang berwarna hijau tua (Gambar 3a). Planlet asal eksplan daun- $B_2A_{0.1}$  memiliki perawakan besar, batang tebal, tegak, dan memiliki daun yang berwarna hijau cerah (Gambar 3b). Planlet asal eksplan petiol- $B_1A_{0.1}$  berperawakan lebih kecil dari planlet lainnya (Gambar 3c).

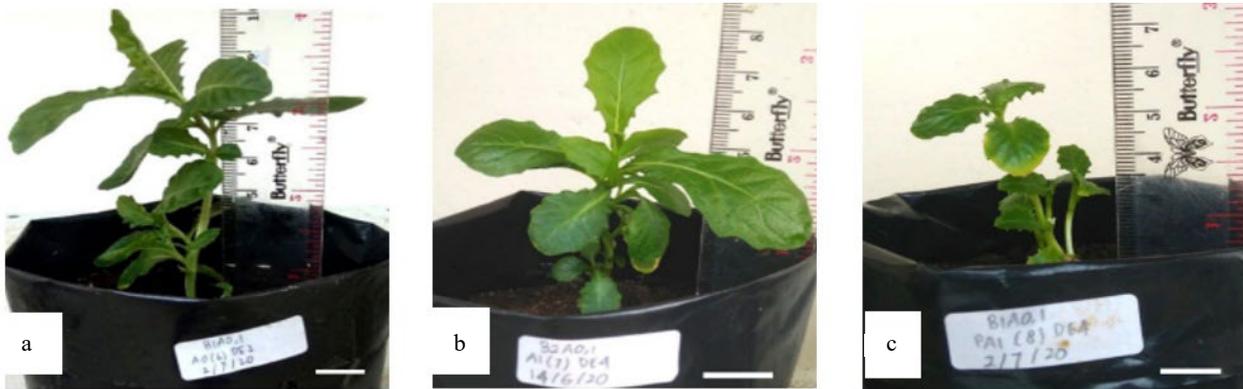
## PEMBAHASAN

Eksplan daun dan petiol muda kitolod dipilih sebagai eksplan karena memiliki jaringan meristematik yang masih aktif membelah, sehingga lebih cepat

Tabel 6. Pengaruh kombinasi ZPT pada tahap aklimatisasi *H. longiflora*, enam minggu setelah aklimatisasi

Eksplan	Perlakuan	Pertambahan daun baru*	Pertambahan tunas aksilar baru*	Pertambahan tinggi tanaman (cm)*	Persentase hidup (%)
Daun	B <sub>1</sub> A <sub>0,1</sub>	2.88±2.23 <sup>a</sup>	1.12±0.83 <sup>a</sup>	1.09±0.56 <sup>a</sup>	37.5
	B <sub>2</sub> A <sub>0,1</sub>	8.75±4.53 <sup>b</sup>	2.12±1.73 <sup>a</sup>	2.39±1.47 <sup>b</sup>	75.0
Petioli	B <sub>1</sub> A <sub>0,1</sub>	3.00±2.51 <sup>a</sup>	0.88±0.83 <sup>a</sup>	0.86±0.62 <sup>a</sup>	12.5

\*Nilai rerata ± standar deviasi. Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Tukey pada tingkat kepercayaan 95%



Gambar 3. Tanaman muda kitolid hasil aklimatisasi selama enam minggu. Tanaman asal eksplan daun-B<sub>1</sub>A<sub>0,1</sub> (a), tanaman asal eksplan daun-B<sub>2</sub>A<sub>0,1</sub> (b), dan tanaman asal eksplan petiol-B<sub>1</sub>A<sub>0,1</sub> (c). Skala: ≈ 10 mm

mengalami dediferensiasi lalu re-diferensiasi menjadi tunas baru. Menurut Mahadi *et al.* (2015), sitokinin yang dikombinasikan dengan auksin dapat merangsang pembelahan dan menentukan arah diferensiasi sel. Apabila dalam medium kultur cukup tersedia auksin, maka peran sitokinin BAP dalam mendorong pertumbuhan tunas akan lebih efektif, seperti terlihat pada penelitian ini. Kombinasi BAP dan NAA efektif dalam menginisiasi tunas kitolid daripada BAP saja. Warna hijau pada kalus disebabkan oleh adanya klorofil, hasil interaksi antara auksin dan sitokinin yang ditambahkan pada media, serta terinduksi oleh cahaya yang diberikan.

Pemberian BAP tanpa NAA tidak dapat menginisiasi tunas. Hal ini dapat disebabkan oleh kandungan auksin endogen pada eksplan yang tidak mencukupi, sehingga membutuhkan auksin eksogen pada media kultur. Penambahan NAA 0.1 mg/L pada BAP 4 mg/L dan 8 mg/L juga tidak dapat menginisiasi tunas, yang mungkin disebabkan karena konsentrasi BAP tersebut berlebihan dari yang dibutuhkan. Peningkatan konsentrasi BAP di atas 3 mg/L pada media inisiasi tunas dapat menghambat pembentukan tunas *Curcuma sp.* (Rustikawati *et al.* 2021) dan anggrek Vanda (Sutriana *et al.* 2014), sedangkan pada penelitian Ario dan Setiawan (2020), konsentrasi BAP di atas 1.5 mg/L sudah menghambat pembentukan tunas pada kultur *Dendrobium spectabile*. Taraf ZPT yang dibutuhkan sangat tergantung pada jenis tumbuhan serta varietasnya. Konsentrasi BAP yang terlalu tinggi dalam media akan menyebabkan keterlambatan perkembangan

tunas, karena justru akan menyebabkan penurunan laju proliferasi sel dan perkembangan meristem apikal pucuk (Kalra dan Bhatla 2018). Eksplan yang tidak dapat menginisiasi tunas mengalami pencokelatan (*browning*), menjadi mengering. Pencokelatan dapat disebabkan oleh pelukaan saat pemotongan eksplan, sehingga jaringan mengeluarkan senyawa sekunder berupa fenol sebagai respons pertahanan diri. Oksidasi senyawa fenol menyebabkan terbentuknya warna cokelat pada eksplan (Pierik 1987). Penggunaan sterilan yang terlalu lama menyebabkan eksplan kehilangan warna hijau, eksplan berubah menjadi mencokelat atau klorosis (Gambar 1f). Selanjutnya, keragaman pertumbuhan dan perkembangan tunas dipengaruhi oleh adaptasi awal eksplan pada media kultur (Mukasyaf *et al.* 2017).

Pembentukan sistem akar fungsional dibutuhkan dalam kultur *in vitro*. Akar akan berguna dan terus tumbuh selama aklimatisasi. Oleh karena itu, sistem perakaran yang kuat harus diinisiasi dari tunas secara *in vitro*. Media MS tanpa penambahan NAA tetap dapat menginisiasi akar, karena auksin endogen yang telah terbentuk di dalam tunas. Pemberian auksin dalam konsentrasi kurang dari 1 mg/L dapat menginisiasi akar pada tunas *Citrus microcarpa*, namun pada konsentrasi lebih tinggi, pembentukan akar akan terhambat, dan bahkan dapat terbentuk kalus (Mahadi *et al.* 2015). Penelitian Emoghene *et al.* (2018) pada tunas *Phoenix dactylifera* menunjukkan bahwa pemberian NAA di atas 1 mg/L menginisiasi lebih sedikit akar.

Pemberian NAA 1 mg/L dapat mendorong pembentukan akar dengan jumlah yang lebih banyak pada tunas asal eksplan petiol- $B_1A_{0.1}$  dan daun- $B_1A_{0.1}$ . Konsentrasi tersebut dapat mencukupi kebutuhan auksin pada tunas *in vitro* kitolod dalam pembentukan akar. Jumlah akar yang banyak mampu menyerap nutrisi di dalam media secara optimal. Panjang akar cenderung meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi auksin, seperti ditunjukkan oleh tunas asal eksplan daun- $B_1A_{0.1}$ . Hal ini serupa dengan penelitian Rostiana dan Seswita (2007) pada tunas aseptik *Chrysanthemum cinerariifolium* klon Prau 6; yang diberi perlakuan NAA 1 mg/L memiliki akar yang lebih panjang dari perlakuan NAA kurang dari 1 mg/L. Pemberian auksin dengan konsentrasi yang berlebihan dapat memicu sintesis etilen. Etilen berperan dalam menghambat pemanjangan sel, sehingga pemanjangan akar dapat terhambat (Taiz *et al.* 2015).

Planlet diberi sungkup plastik bening pada minggu pertama hingga minggu ketiga masa aklimatisasi, karena planlet hasil kultur jaringan memiliki kemampuan buka-tutup stomata yang lemah. Kondisi tersebut dapat mengakibatkan planlet mudah terdehidrasi dan tidak tahan terhadap intensitas cahaya yang tinggi. Lagipula, planlet terbiasa dengan air dan nutrisi yang selalu tersedia saat dalam kultur (Sianturi *et al.* 2017). Planlet asal eksplan petiol- $B_1A_{0.1}$  memiliki persentase hidup terendah (12.50%). Hal ini disebabkan oleh adanya beberapa masalah sebelumnya, seperti kontaminasi media dan layu daun secara tiba-tiba. Bibit kitolod hasil kultur jaringan belum menghasilkan anakan sampai minggu keenam setelah aklimatisasi, namun bentuk daunnya yang mulai memanjang menyerupai tanaman induknya.

**Kesimpulan.** Perbanyak tanaman secara *in vitro* dapat diterapkan pada tanaman kitolod. Eksplan daun dan petiol sama baiknya dalam menghasilkan tunas adventif. Perlakuan BAP 2 mg/L + NAA 0.1 mg/L pada eksplan daun memberikan hasil terbaik untuk perbanyak tanaman kitolod dengan keberhasilan hidupnya sebesar 75% di akhir tahap aklimatisasi. Media pengakaran terbaik ditunjukkan oleh perlakuan NAA pada konsentrasi 0.5-1.0 mg/L.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aqila FN, Kusuma SAF, Iskandar Y. 2017. Antituberculosis activity test of kitolod leaf ethanol extract (*Laurentia longiflora* (L.) Peterm.). *IJSEAS* 3:76-82.
- Ario A, Setiawan S. 2020. The effect of benzyl amino purine (BAP) concentration on the growth amount of the explant of *Dendrobium spectabile* orchid by *in vitro*. *IJ-MDS* 3:33-38. <https://doi.org/10.26737/ij-mds.v3i2.2397>
- Emoghene BO, Asemota O, Eke CR, Idu M, Aghimien E, Nwite AP. 2018. Evaluation of optimum concentration of naphthalene acetic acid on *in vitro* rooting and acclimatization of tissue culture date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets. *J Appl Sci Environ* 22:1595-1598. <https://doi.org/10.4314/jasem.v22i10.11>
- Fazil M, Suci RN, Allfiah F, Alam DN, Angelia G, Situmeang B. 2017. Analisis senyawa alkaloid dan flavonoid dari ekstrak kitolod (*Isotoma longiflora*) dan uji aktivitasnya terhadap bakteri penyebab karies gigi. *Itekima* 2:73-83.
- Herdianto FA, Hazar S, Fitrianiingsih SP. 2016. Uji aktivitas antifungi ekstrak dan karakterisasi fitokimia herba kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C.Presl) terhadap *Candida albicans*. Di dalam: Ahmadi D, Gunawan G, Yulianti Y, Sunendiari S (Eds.). *Peran Unisba dalam Pemanfaatan Hasil Penelitian untuk Pengembangan dan Penyebarluasan Iptek dan Imtak yang Berkelanjutan di Jawa Barat*. Bandung, Indonesia. p. 655-662.
- Kalra G, Bhatla SC. 2018. *Plant Physiology, Development and Metabolism*. New Delhi: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>
- Mahadi I, Syafi'i W, Agustiani S. 2015. Kultur jaringan jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) dengan menggunakan hormon kinetin dan naftalen acetyl acid (NAA). *J Dinamika Pertanian* XXX:37-44.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Mukasyaf AA, Faridah E, Indrioko S, Herawan T. 2017. Induksi tunas, multiplikasi dan perakaran *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke secara *in vitro*. *JPTH* 11:155-168.
- Pierik RLM. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. London: Kluwer Academic. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-3621-8>
- Rostiana O, Seswita D. 2007. Pengaruh indole butyric acid dan naphthalene acetic acid terhadap induksi perakaran tunas piretrum [*Chrysanthemum cinerariifolium* (Trevir.) Vis.] klon Prau 6 secara *in vitro*. *Bul Littro* 18:39-48.
- Rustikawati, Herison C, Inorah E, Dwisari V. 2021. Effect of BAP (6-Benzyl Aminopurine) on *in vitro* shoot growth of curcumas. *Agritropica: J Agric Sci* 4:82-92. <https://doi.org/10.31186/j.agritropica.4.1.82-92>
- Savira D, Iskandar D. 2020. Pemanfaatan ekstrak daun kitolod (*Hippobroma Longiflora* (L.) G.Don) sebagai bahan aktif sediaan tabir surya. *JKR* 5:44-48. <https://doi.org/10.20473/jkr.v5i1.19680>
- Sianturi RUD, Supriyanto, Wulandari AS, Subandy B. 2017. Regenerasi tunas adventif dari eksplan daun tembesu (*Fagraea fragrans* Roxb.) melalui teknik kultur jaringan. *JPTH* 14:1-17. <https://doi.org/10.20886/jpht.2017.14.1.1-17>
- Siregar RM. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak daun dan bunga kitolod (*Laurentia longiflora* (L.) Peterm) terhadap beberapa bakteri penyebab konjungtivitis [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Siska, Sunaryo H, Wardani TK. 2016. Uji efek antiglaukoma infus daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C.Presl) terhadap tikus putih jantan berdasarkan tekanan bola mata. *Farmasains* 3:73-76.
- Sutriana S, Jumin HB, Mardaleni. 2014. Interaksi BAP dan NAA terhadap pertumbuhan eksplan anggrek vanda secara *in vitro*. *J Dinamika Pertan* 29:1-8. <https://doi.org/10.25299/dp.v29i1.854>
- Taiz L, Zeiger E, Moeller M, Murphy A. 2015. *Plant Physiology and Development*. Sixth Ed. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Assoc. Inc.