

TEKNOLOGI PERBANYAKAN TANAMAN PANDAN LAUT (*Pandanus tectorius* Park.) MELALUI KULTUR TUNAS PUCUK

[*Propagation Technology of Screw Pines (Pandanus tectorius Park.) Through Shoot-Tip Culture*]

Ikhsan Matondang^{1,3*}✉, Sisunandar², Alice Yuniaty¹, Triani Hardiyati¹, Agus Hery Susanto¹, Endang Srimurni Kusmintarsih¹

¹Program Studi Biologi Program Doktor Fakultas Biologi Unsoed

²Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Muhammadiyah Purwokerto

³Fakultas Biologi Universitas Nasional Jakarta

email: matondangikhsan@gmail.com

ABSTRACT

Pandanus tectorius Park., tree of life, which almost all of its parts are used by humans. Industrial fiber made from screw pine leaves has been successfully exported to several countries, while the fruit is consumed as an alternative staple food. Fruit is only produced by female plants because screw pine is dioecious plant. Farmers obtain screw pine seedlings using stem cuttings from female trees, but the number of seedlings produced is limited and this technique can damage the plant. Alternative seedling production using seeds has constraints in the form of uncertainty over the sex of the seedling. One of the best ways to provide screw pine seedlings is to use a shoot-tip culture technique. Shoot-tip culture is able to reproduce plants efficiently and quickly and does not damage the plant. Seedlings will also have the same genetic traits as the selected plant. However, efforts to develop an efficient and fast screw pine shoot-tip culture protocol have not been carried out massively. The induction and shoot multiplication stages still had a low success rate. Another problem in seedling production through tissue culture is the certainty whether the seedlings produced are true-to-type. This review article aims to reveal the potential of shoot-tip culture for in vitro screw pine seedling production and to test the genetic stability of the screw pine seedling.

Key words: genetic stability, in vitro culture, screw pine, shoot-tip culture

ABSTRAK

Pandanus tectorius Park. termasuk tanaman kehidupan yang hampir semua bagiannya dimanfaatkan oleh manusia. Serat hasil industri berbahan daun pandan laut telah berhasil diekspor ke beberapa negara, sedangkan buahnya dikonsumsi sebagai makanan pokok alternatif. Buah hanya dihasilkan tanaman betina, karena pandan laut termasuk tanaman berumah dua. Petani memperoleh benih pandan laut menggunakan setek batang dari pohon betina, namun jumlah benih yang dihasilkan terbatas serta teknik ini dapat merusak pohon induk. Alternatif produksi benih menggunakan biji memiliki kendala berupa ketidakpastian jenis kelamin tanaman yang dihasilkan. Salah satu cara terbaik untuk menyediakan benih tanaman pandan laut adalah menggunakan teknik kultur pucuk. Kultur pucuk mampu memperbanyak tanaman secara efisien dan cepat serta tidak merusak pohon induk. Benih tanaman yang dihasilkan juga akan memiliki sifat genetik yang sama seperti pohon induk terpilih. Namun demikian, upaya pengembangan protokol kultur pucuk pandan laut yang efisien dan cepat belum dilakukan secara masif. Tahap induksi dan multiplikasi tunas masih memiliki tingkat keberhasilan yang rendah. Permasalahan lain dalam produksi benih melalui kultur jaringan adalah kepastian apakah benih kultur jaringan yang dihasilkan bersifat *true-to-type*. Artikel ini merupakan review teknologi *in vitro* yang potensial yaitu kultur tunas pucuk untuk produksi benih pandan laut yang secara genetik stabil.

Kata kunci: kestabilan genetik, kultur *in vitro*, kultur pucuk, pandan laut

PENDAHULUAN

Pandan laut atau pandan samak atau pandan tikar (*Pandanus tectorius* Park.) termasuk anggota Pandanaceae, tanaman asli pulau-pulau di Pasifik, Australia bagian Utara, Asia Tenggara dan Asia Selatan (Heyne, 1987; Adkar dan Bhaskar, 2014; Thomson *et al.*, 2006). Hampir semua bagian dari pandan laut memiliki nilai ekonomi tinggi, sehingga pandan laut disebut sebagai tanaman serbaguna. Batang utama pandan laut bermanfaat untuk bahan bangunan, pot bunga, perangkap ikan, ataupun bahan baku untuk industri cat. Daun muda banyak dipakai untuk pakan ternak sedangkan daun tua digunakan sebagai atap, membuat tikar, topi, dinding rumah, layar dan keranjang (Gallaher, 2014; Thomson *et al.*, 2006; Rahayu *et al.*, 2008).

Serat daun dimanfaatkan sebagai bahan baku industri tenun (Ashish *et al.*, 2015), selulosa asetat dari daun pandan laut digunakan untuk aplikasi baterai ion lithium (Sukarno, 2016).

Buah pandan laut memiliki nilai ekonomi tinggi. Saat ini dikembangkan sebagai pangan alternatif yang menyehatkan karena mengandung β -karoten, karbohidrat, protein, lemak dan serat yang tinggi (Sarungallo *et al.*, 2018). Buah segar juga merupakan sumber vitamin A, B dan C tinggi (Adkar dan Bhaskar, 2014; Thomson *et al.*, 2006).

Pandan laut dikembangkan sebagai tanaman obat tradisional. Hampir semua bagian tanaman dapat digunakan sebagai obat. Daun pandan laut dikembangkan sebagai obat antikanker karena

*Kontributor Utama

*Diterima: 13 September 2021 - Diperbaiki: 21 Juni 2022- Disetujui: 21 Juni 2022

kandungan flavonoid dan alkaloid yang memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel kanker payudara, T47D (Holle *et al.*, 2013). Steroid dari ekstrak kulit batang pandan laut menunjukkan sifat sitotoksik terhadap karsinoma epidermal manusia (Hoa *et al.*, 2014). Daun, buah, biji merupakan antioksidan dan antibakteri (Andriani, Ramli, *et al.*, 2019; Rahayu *et al.*, 2019). Akar tunjang dan akar sebagai antidiabetes (Rajeswari *et al.*, 2012; Venkatesh *et al.*, 2012). Potensi bahan obat tanaman ini cukup tinggi, pola budi daya pandan laut perlu untuk dipelajari.

Upaya peremajaan pandan laut mengalami kendala utama khususnya dalam hal ketersediaan benih yang masih terbatas. Pada saat ini upaya penyediaan benih pandan laut dilakukan secara tradisional melalui setek batang maupun melalui biji (Thomson *et al.*, 2006; Rahayu *et al.*, 2008). Penyediaan melalui setek batang menghasilkan tanaman yang identik dengan induknya, namun apabila dilakukan dengan skala besar akan merusak tanaman induk. Perbanyakan melalui biji selain menyebabkan timbulnya variasi genetik, juga membutuhkan waktu yang sangat lama (Thomson *et al.*, 2006). Salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk produksi benih pandan laut secara cepat dan memiliki keunggulan seperti yang diharapkan adalah dengan menggunakan teknik kultur *in vitro* (Thorpe, 2007).

Produksi benih pandan laut secara *in vitro* dapat dilakukan melalui pendekatan embriogenesis somatik maupun melalui proses organogenesis. Namun demikian kedua metode tersebut memerlukan waktu yang lama untuk proses pengembangan protokol dan pengaplikasikannya meskipun kedua metode tersebut mampu memproduksi benih secara massal (Roostika *et al.*, 2005; Devy *et al.*, 2012a). Salah satu teknik kultur *in vitro* yang banyak digunakan untuk produksi benih tanaman secara cepat meskipun dengan jumlah anakan yang relatif terbatas dibandingkan dengan teknik kultur *in vitro* yang lain adalah dengan menggunakan kultur tunas pucuk (*shoot-tip culture*).

Eksplan pucuk terdiri dari bagian meristem dan primordia daun serta tunas ketiak (George, 2008). Pemberian zat pengatur tumbuh sitokinin dapat meniadakan dominansi apikal sehingga menumbuhkan lebih dari satu tunas. Tunas yang

dihasilkan dari eksplan pucuk tidak sebanyak melalui teknik organogenesis dan embriogenesis, meskipun demikian, kultur pucuk masih dianggap sebagai pilihan perbanyakan massal karena dapat menjaga kestabilan genetik dalam kultur.

Salah satu faktor yang perlu diperhatikan ketika akan mengaplikasikan teknik produksi benih tanaman melalui kultur jaringan khususnya kultur pucuk adalah faktor kestabilan genetik benih tanaman hasil kultur pucuk. Perubahan genetik benih tanaman yang dihasilkan dari teknik kultur pucuk banyak dilaporkan seperti yang terjadi pada tanaman tebu (Zucchi *et al.*, 2000; Doule *et al.*, 2008; Lengkong *et al.*, 2012). Pada tanaman *Dendrocalamus strictus* (Goyal *et al.*, 2015), *Origanum majorana* (Cetin, 2018), *Tectona grandis* (Nurtjahjaningsih *et al.*, 2018) dan *Salvia hispanica* (Yadav *et al.*, 2019) hasil kultur pucuk tidak terjadi perubahan genetik.

Benih tanaman yang dihasilkan dari kultur pucuk diharapkan memiliki kesamaan genetik dengan induknya. Uji kesamaan genetik yang memiliki akurasi tinggi dengan menggunakan penanda molekular. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dan ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) merupakan penanda molekular yang cukup banyak digunakan peneliti saat ini (Kumar *et al.*, 2010; Poerba *et al.*, 2012; Lengkong *et al.*, 2012; Al-Qurainy *et al.*, 2018; Yulianti *et al.*, 2018; Indaryani *et al.*, 2019).

Produksi Benih Pandan Laut

Secara alami pandan laut berkembang biak dengan biji. Produksi benih melalui biji memerlukan waktu yang cukup panjang (Thomson *et al.*, 2006). Proses penyemaian biji dimulai dengan perendaman dalam air selama 5 hari dan rata-rata akan berkecambah setelah 2 bulan. (Gambar 1) menunjukkan semai siap ditanam di lapang. Untuk mendapatkan benih yang siap ditumbuhkan di lapang, total waktu produksi benih dapat mencapai 6 bulan (Hani dan Dendang, 2008). Meskipun mudah dilakukan, murah, dapat dihasilkan benih dalam jumlah massal, dan tidak memerlukan teknologi yang maju, produksi benih melalui biji akan menghasilkan tanaman yang tidak identik dengan induknya dan jenis kelamin tanamannya juga belum diketahui (Thomson *et al.*, 2006).



Gambar 1. Benih pandan laut. (*Seedlings of screw pines*) (Thomson *et al.*, 2006)

Metode produksi benih pandan laut lain yang dapat menghasilkan benih sesuai induknya adalah dengan menggunakan setek batang (Gallaher, 2014; Thomson *et al.*, 2006). Panjang setek yang akan digunakan sebagai bahan perbanyakan berukuran 30 – 40 cm (Gambar 2-A). Penanaman setek batang dapat dilakukan langsung atau setelah semua koleksi setek dikumpulkan (Gurmeet dan Amrita, 2015; Thomson *et al.*, 2006). Pertumbuhan setek batang di dalam polybag (Gambar 2-B). (Rahayu *et al.*, 2015).

Namun demikian, produksi benih menggunakan setek batang akan merusak tanaman induknya. Oleh karena itu untuk mencegah kerusakan tanaman induk maka setiap pohon induk hanya dapat diambil maksimal 3 setek batang (Rahayu *et al.*, 2015). Meskipun metode produksi benih pandan laut menggunakan setek batang mudah dilakukan, murah, cepat serta tidak membutuhkan teknologi tinggi namun jumlah benih yang dihasilkan sangat terbatas serta berpotensi merusak tanaman induknya.



Gambar 2. A. Setek batang siap ditanam (*The cutting stems are ready for planting*) (Thomson *et al.*, 2006), B. Pertumbuhan setek batang di dalam polybag (*Growth of stem cuttings in polybags*) (Rahayu *et al.*, 2015)

Metode produksi benih pandan laut tanpa merusak pohon induknya adalah dengan memisahkan anakan atau tunas samping, atau dikenal dengan istilah “sengke” atau “sengket” untuk digunakan sebagai benih (Susiarti dan Rahayu, 2010; Gurmeet dan Amrita, 2015; Rahayu *et al.*, 2008). Tunas samping yang telah memiliki akar cukup panjang dipisahkan dari induknya kemudian ditanam di lahan agak basah dengan jarak tanam 1x2 m serta kedalaman 20 – 30 cm. Cara perbanyakan vegetatif

(setek batang dan anakan) murah dan mudah dilakukan, jumlah benih yang dihasilkan masih sangat terbatas. Belum ada informasi tentang jumlah anakan dari pohon induk, namun dari pengalaman menumbuhkan benih pandan laut dapat diketahui jumlah anakan dapat mencapai 3 dalam satu periode tumbuh, serta tidak semua tanaman menghasilkan anakan (S.E. Rahayu, komunikasi pribadi).

Perbanyak Secara Kultur *In Vitro*

Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengatasi kelemahan produksi benih pandan laut secara konvensional baik melalui biji, setek batang ataupun anakan adalah metode kultur *in vitro*. Kultur *in vitro* merupakan teknik budi daya sel, jaringan, organ atau keseluruhan tanaman dengan kontrol nutrisi dan lingkungan yang steril (Thorpe, 2007). Dengan menggunakan metode kultur *in vitro*, produksi benih tanaman kurma (Kumar *et al.*, 2010), pisang (Poerba *et al.*, 2012), rotan (Goyal *et al.*, 2015), termasuk produksi benih pandan laut dapat dilakukan dalam jumlah massal tanpa merusak tanaman induknya. Bahkan jika produksi benih tanaman dengan menggunakan eksplan yang diambil dari tanaman unggul maka dapat diharapkan seluruh benih yang dihasilkan akan memiliki sifat yang unggul. Namun demikian teknik produksi benih pandan laut dengan menggunakan metode kultur *in vitro* belum banyak dikembangkan.

Banyak teknik yang dapat digunakan untuk memproduksi benih tanaman menggunakan metode *in vitro*, seperti melalui teknik organogenesis, embriogenesis somatik, ataupun kultur meristem (Suman, 2017). Organogenesis merupakan proses terbentuknya organ yaitu akar atau pucuk dan daun. Terbentuknya organ dapat secara langsung dari pertumbuhan meristem sebagai sumber eksplan atau melalui pertumbuhan kalus terlebih dahulu. Pemberian zat pengatur tumbuh auksin lebih tinggi dibandingkan sitokinin akan membentuk akar, sebaliknya bila sitokinin lebih tinggi dibandingkan auksin akan membentuk pucuk (Skoog dan Miller, 1957).

Embriogenesis somatik merupakan teknik regenerasi yang banyak digunakan dalam menghasilkan klon (Park *et al.*, 1998). Embriogenesis somatik merupakan suatu proses dimana struktur bipolar yang menyerupai embrio zigotik berkembang dari satu sel non-zigotik tanpa adanya hubungan pembuluh dengan jaringan asalnya (Suman, 2017; Devy *et al.*, 2012b). Embriogenesis somatik dapat terbentuk secara langsung dari eksplan atau tidak langsung melalui kalus. Pembentukan embriogenesis somatik langsung jarang terjadi. Embriogenesis somatik telah banyak dilakukan pada tanaman berkayu dan tanaman hias dari famili yang berbeda.

Keuntungan embriogenesis somatik (1) dapat menghasilkan embrio mencapai 1,35 juta dalam satu liter medium, (2) pucuk dan akar terbentuk secara bersamaan, tidak memerlukan induksi akar, (3) hemat tenaga kerja, (4) pembentukan embrio dapat dimanipulasi, (5) dapat memaksimalkan hasil dengan harga yang murah, (6) embrio somatik dapat dibuat dorman. Kelemahan embriogenesis somatik (1) perkembangannya cenderung tidak

sinkron, (2) stabilitas pembentukan embrio berkurang, (3) terbentuknya mutasi (Bhatia dan Bera, 2015).

Penggunaan kultur meristem telah berhasil mendapatkan klon bebas virus pada tanaman kentang (Bhuiyan, 2013; Al-Taleb *et al.*, 2011) dan tanaman *Gentiana kurroo* (Kaushal *et al.*, 2015). Kultur meristem bebas virus yang disimpan dalam kriogenik mampu tumbuh (55%) pada tanaman anggur (Shatnawi *et al.*, 2011). Kombinasi kemoterapi dan kultur meristem dapat menghasilkan tanaman tebu yang bebas virus mosaic (Manuel dan George, 2013).

Kultur Pucuk Pandan Laut

Salah satu teknik kultur *in vitro* yang paling banyak digunakan untuk memperbanyak benih tanaman adalah menggunakan teknik kultur pucuk. Kultur *in vitro* pucuk menggunakan eksplan ujung tunas apikal atau tunas aksilar yang berukuran 3 – 20 mm yang masih menyertakan primordia daun dan jaringan pembuluh. Langkah awal kultur pucuk yaitu memilih tanaman induk yang sehat, selanjutnya akan melalui tahapan sterilisasi, inisiasi, multiplikasi tunas, induksi akar dan aklimatisasi, termasuk untuk menghasilkan benih pandan laut.

Tahap pertama: inisiasi kultur terdiri dari sterilisasi, penanaman dan inkubasi pucuk dalam medium. Bahan untuk sterilisasi eksplan antara lain alkohol 70%, Raksa (II) klorida (HgCl_2), Natrium hipoklorit (NaOCl), Natrium alkil benzena sulfonat (LAS Na), Natrium lauril eter sulfat (SLES), Natrium lauril sulfat (SLS), Cocamidopropyl betaine (CAPB), Benzalkonium Chloride 1 %, Fipronil (Pranata dan Herawati, 2019). Pada perbanyak *Pandanus tectorius*, (Zainal *et al.*, 1999) menggunakan alkohol 70% sebagai bahan sterilisasi sedangkan pada perbanyak *Pandanus amaryllifolius* menggunakan HgCl_2 0,25% sebagai bahan sterilisasi eksplan (Gangopadhyay *et al.*, 2004). Pada perbanyak tanaman marga *Pandanus* bahan sterilisasi menggunakan 0,1% HgCl_2 , NaOCl dengan berbagai konsentrasi, dan teepol 0,01% (Jose *et al.*, 2016). Eksplan yang telah disterilkan selanjutnya ditanam pada medium dan diletakkan di ruang pertumbuhan, baik dalam kondisi terang maupun gelap sesuai dengan metoda yang diinginkan (Suman, 2017).

Tahapan kedua: multiplikasi tunas dengan cara melakukan subkultur beberapa kali sampai jumlah yang diinginkan telah diperoleh. Medium untuk multiplikasi ditambahkan zat pengatur tumbuh sitokinin yang lebih tinggi. Sitokinin yang paling sering digunakan adalah *Benzil amino purin* (BAP) dengan konsentrasi 2–5 mgL^{-1} . Dengan penambahan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin dapat mereduksi apikal dominansi sehingga terbentuk

tunas yang lebih banyak (Vuylsteke, 1989).

Tahap ketiga merupakan tahap induksi akar. Tahap induksi akar dapat berlangsung pada medium bersamaan dengan proses pemanjangan tunas (Vuylsteke, 1989), atau pada medium yang berbeda dengan modifikasi nutrisi dan zat pengatur tumbuh untuk menumbuhkan akar yang kuat (Suman, 2017). Zat pengatur tumbuh golongan auksin yang biasa digunakan untuk induksi akar adalah *Naphthalene Acetic Acid* (NAA), *Indoleacetic Acid* (IAA) dan *Indolebutyric Acid* (IBA). NAA 0,2mgL⁻¹ lebih efektif dibandingkan IAA pada proses pemanjangan tunas dan pembentukan akar pada kultur pucuk pisang (Vuylsteke, 1989). Pada multiplikasi tanaman marga *Pandanus* penggunaan IBA lebih efektif untuk induksi akar. Induksi akar berlangsung selama 4 minggu (Jose *et al.*, 2016).

Tahap berikutnya penguatan planlet dan aklimatisasi. Tahapan ini merupakan penentu keberhasilan perbanyakan klon kultur pucuk. Planlet yang dihasilkan dalam botol medium dibersihkan dan selanjutnya ditanam dalam wadah yang berisi pasir secara bertahap untuk proses pengerasan dan penyesuaian lingkungan dari tingkat kelembapan tinggi ke rendah, dari intensitas cahaya yang rendah ke tinggi. Tanaman ini diletakkan di rumah kaca atau ruang yang memiliki naungan dengan melakukan penyiraman secara teratur (Vuylsteke, 1989; Suman, 2017; Jose *et al.*, 2016).

Upaya perbanyakan pandan laut dengan menggunakan kultur pucuk menunjukkan tingkat keberhasilan yang masih sangat rendah (Tabel 1). Tahap induksi dan multiplikasi tunas telah dilakukan, namun tahap induksi akar, aklimatisasi maupun penanaman di lapang belum pernah dilaporkan. Salah satu penyebab utama kegagalan upaya tersebut adalah tingkat kontaminasi (60 %) maupun adanya pencokelatan jaringan (80%) yang masih tinggi mengakibatkan sebagian besar eksplan (68%) mati dan hanya sebagian kecil (16,5%) yang

dapat tumbuh menjadi kalus. Pada tahap inisiasi menggunakan medium Murashige dan Skoog (MS) ditambahkan NAA (0–3mg/L) yang dikombinasikan dengan kinetin (0–2mg/L) belum menghasilkan tunas. (Zainal *et al.*, 1999).

Perbanyakan *in vitro* kerabat pandan laut, *P amaryllifolius* Roxb. yang dilakukan oleh (Gangopadhyay *et al.*, 2004) dengan menggunakan meristem sebagai eksplan, berhasil menginduksi pembentukan tunas dengan menggunakan medium MS yang ditambahkan 0,5mM myoinositol, 88 mM sukrosa, 0,022mM Benzil Adenin (BA) dan 0,003 mM IAA. Pemberian BA 0,022mM menghasilkan planlet normal 23,33% dan planlet yang daunnya transparan 76,67%. Pemberian BA sebanyak 0,002 mM mendapatkan planlet normal 86,67% dan masih ada planlet vitrifikasi sebesar 13,33%. Hasil ini memperlihatkan bahwa dengan pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh BA semakin sedikit, peluang mendapatkan planlet yang normal semakin besar.

Penelitian perbanyakan benih pada marga *Pandanus* (*P fascicularis* Lam. dan *P furcatus* Roxb.) telah berhasil mendapatkan planlet. Media yang digunakan adalah medium ¼ MS, ½ MS dan MS penuh serta medium *Woody Plant Medium* (WPM) dan medium Gamborg (B5). Eksplan berhasil tumbuh pada medium MS penuh dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan IAA, dalam 5 minggu menghasilkan 2–3 pucuk per eksplan. Tingkat keberhasilan pada komposisi medium MS penuh dengan penambahan BAP 2,5mg/L dan IAA 0,5mg/L mencapai 64,66% dan masih terdapat kontaminasi sebesar 35% dari jumlah percobaan yang dilakukan, serta masih terlihat adanya pencokelatan yang mengakibatkan tidak tumbuhnya eksplan (Jose *et al.*, 2016). Masih tingginya tingkat kontaminasi oleh mikroorganisme jamur dapat diatasi dengan penggunaan dithane sebagai bahan sterilisasi eksplan.

Tabel 1. Perkembangan penelitian kultur jaringan *Pandanus* spp. Angka dalam kurung menunjukkan tingkat keberhasilan pada tahap tersebut. (*Development of tissue culture research of Pandanus spp. The numbers in parentheses indicate the success rate at that step.*)

Jenis Eksplan/ spesies	Teknik sterilisasi	Induksi tunas	Multiplikasi tunas	Induksi akar	Aklimatisasi dan pengerasan	Penanaman di tanah	Pustaka
Pucuk <i>P tectorius</i>	Alkohol 70%	Medium MS + Kn + NAA (0 %)	Belum dilakukan	Belum dilakukan	Belum dilakukan	Belum dilakukan	Zainal <i>et al.</i> , 1999
Meristem <i>P amaryllifolius</i>	HgCl ₂ 10 min	0,25% Medium MS + BA + IAA (23,3 %)	Medium MS + BA + IAA (86,67 %)	Medium MS + IBA + Kn	Belum dilakukan	Belum dilakukan	Gangopadhyay <i>et al.</i> , 2004
Pucuk <i>P fascicularis</i>	HgCl ₂ 1 min	0,1% 2 – 3 pucuk per eksplan Medium MS + BAP + IAA (64,66 %)	5 – 6 pucuk/ eksplan Medium MS + BAP + IAA	Medium MS + IBA (87,4 %)	Dalam gelas plastik, baki plastik, dan baki telur di tempat ternaungi (85 %)	Berhasil (100 %)	Jose <i>et al.</i> , 2016

Perlakuan yang Berpengaruh Terhadap Keberhasilan Kultur Pucuk: Kemungkinan Aplikasi pada Pandan Laut

Keberhasilan kultur pucuk tidak terlepas dari tahapan-tahapan kerja yang dilakukan. Tahap sterilisasi, menghilangkan kontaminasi merupakan tantangan atau hambatan dalam proses kultur pucuk karena akan mengganggu pertumbuhan eksplan. Kontaminan ada yang eksternal, terbawa pada bagian luar permukaan eksplan dan ada yang sistemik berada dalam jaringan eksplan. Senyawa disinfektan yang umum digunakan adalah NaOCl, Kalsium hipoklorit (CaOCl) dan etanol. Untuk mengeliminasi kontaminan berupa jamur dapat menggunakan dithane sebagai bahan sterilan. Beberapa antibiotik dapat digunakan untuk membantu menghilangkan kontaminan bakteri seperti Bavistin dan streptomisin (Tyagi dan Tomar, 2013).

Keberhasilan tahap induksi dan multiplikasi tunas banyak dipengaruhi medium pertumbuhan (Tabel 2). Komposisi medium terdiri dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino dan sumber karbon. Medium kultur jaringan yang paling sering digunakan adalah medium MS. Medium MS telah digunakan pada multiplikasi tunas apikal tanaman *Pistacia khinjuk* (Tilkat *et al.*, 2005), tebu (Khan *et al.*, 2008; Biradar *et al.*, 2009; Sughra *et al.*, 2014), stroberi (Ko *et al.*, 2009), tanaman lidah buaya (Nayanakantha *et al.*, 2010), pisang kultivar berangan (Jafari *et al.*, 2011), anggrek *Dendrobium primulinum* (Pant dan Thapa, 2012), pisang (Ferdous *et al.*, 2015), jambu biji (Ahmad *et al.*, 2016), manggis (Isda *et al.*, 2016), ulin (Tarampak *et al.*, 2019).

Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium tanam juga terbukti berpengaruh terhadap keberhasilan induksi dan multiplikasi tunas. Pada umumnya zat pengatur tumbuh sitokinin diberikan lebih banyak dari auksin untuk merangsang pertumbuhan tunas sebaliknya bila auksin lebih banyak dari sitokinin akan menumbuhkan akar. Sitokinin yang sering digunakan adalah BAP, sementara auksin yang sering digunakan adalah NAA (Lestari, 2011).

Induksi tunas pada tanaman *Tecomella undulata* lebih baik dengan pemberian zat pengatur tumbuh BA ditambah NAA dibandingkan BA ditambah IAA (Tyagi dan Tomar, 2013). Konsentrasi zat pengatur tumbuh mempengaruhi jumlah tunas yang dihasilkan. Pemberian zat pengatur tumbuh BA 1 mg/L pada kultur *Fragaria* sp lebih banyak menghasilkan tunas (11–14 tunas) dibandingkan pemberian BA 0,5mg/L (5–8 tunas) (Ko *et al.*, 2009). Beberapa perlakuan lain yang dapat berpengaruh terhadap keberhasilan induksi dan multiplikasi tunas adalah lama dan kualitas penyiangan di dalam ruang kultur, kadar sukrosa yang ditambahkan ke dalam medium tanam, maupun pH medium tanam (Singh dan Patel, 2014).

Pada tahapan induksi akar, beberapa perlakuan dilaporkan dapat mempengaruhi keberhasilan pada tahap tersebut. Salah satu perlakuan utama adalah penambahan auksin ke dalam medium induksi akar. Tahap induksi akar pada tanaman *Tecomella undulata* menghasilkan jumlah akar paling banyak pada medium $\frac{1}{2}$ B5 dengan penambahan IBA dan NAA (Tyagi dan Tomar, 2013). Sedangkan pada tanaman *Carica papaya* L. cv. *Red Lady* induksi akar paling baik pada medium $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan IBA (Nguyen *et al.*, 2018).

Tahapan aklimatisasi merupakan tahapan yang paling penting dalam keberhasilan kultur pucuk. Pada tahapan ini dilakukan penyapihan dan pengerasan secara bertahap, dari kondisi *heterotroph* ke kondisi *autotroph*. Perubahan intensitas cahaya rendah ke intensitas cahaya tinggi secara bertahap terbukti berhasil digunakan untuk mengaklimatisasikan tanaman *P. fascicularis* maupun tanaman *P. furcatus*. Perubahan kelembapan udara dari kelembapan sangat tinggi (hampir 100 %) di dalam botol kultur ke lingkungan *ex vitro* yang memiliki kelembapan lebih rendah juga perlu dilakukan secara bertahap. Proses aklimatisasi plantlet *Pandanus* berhasil dilakukan ketika plantlet diletakkan di kondisi teduh (rumah kaca) sebelum dipindahkan ke tanah menunjukkan keberhasilan tumbuh sebesar 100% (Jose *et al.*, 2016).

Tabel 2. Keberhasilan kultur pucuk pada beberapa tanaman. (*Successful shoot culture on several plants*).

Tanaman	Medium	Hasil	Referensi
<i>Pistacia khinjuk</i>	Medium MS + BA	7,25 tunas	Tilkat <i>et al.</i> , 2005
<i>Saccharum officinarum</i>	Medium MS + BAP + GA3	3 – 7 tunas	Khan <i>et al.</i> , 2008
<i>Saccharum officinarum</i>	Medium MS + BAP	5,46 tunas	Biradar <i>et al.</i> , 2009
<i>Fragaria sp</i>	Medium MS + BA + NAA	5 – 14 tunas	Ko <i>et al.</i> , 2009
<i>Sphilanthes mauritiana</i>	Medium MS+ BA	18,8 tunas	Sharma <i>et al.</i> , 2009
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Medium MS+BAP	4,1 tunas	Waseem <i>et al.</i> , 2009
<i>Aloe Vera</i>	Medium MS + BAP + NAA + PVP + asam sitrat + arang aktif	16 – 21,5 tunas	Nayanakantha <i>et al.</i> , 2010
<i>Musa acuminata</i>	Medium MS + BAP	3,5 – 20,25 tunas	Jafari <i>et al.</i> , 2011
<i>Hevea braziliensis</i>	Medium MS Ag NO ₃ , Pepton 6-Benzyladenine arang aktif	2 – 3 tunas	Sirisom dan Te-Chato, 2012
<i>Tecomella undulata</i>	Medium MS + BA + NAA	2 tunas	Tyagi dan Tomar, 2013
<i>Vanda coerulea</i>	Medium VW+BA	2 tunas	Jitsopakul <i>et al.</i> , 2013
<i>Punica granatum</i>	Medium MS + BAP +kinetin + Adenin sulfat	3,75 tunas	Singh dan Patel, 2014
<i>Curculigo latifolia</i>	Medium MS + IBA+ Thidiazuron	3,08 tunas	Babaei <i>et al.</i> , 2014
<i>Carica papaya</i>	Medium MS BAP, NAA Casein hydrolysate	1,8 tunas	Nguyen <i>et al.</i> , 2018
Rose	Medium MS+ BAP+NAA	7,0 tunas	Khaskheli <i>et al.</i> , 2018
<i>Paulownia tomentosa</i>	Medium MS+Thidiazuron	9,1 tunas	Amirova <i>et al.</i> , 2022

Konfirmasi Kestabilan Genetik Tanaman Hasil Kultur Tunas Pucuk

Salah satu faktor penting sebelum teknik kultur *in vitro* dapat diaplikasikan untuk memproduksi benih tanaman secara masal adalah memastikan tanaman hasil kultur *in vitro* memiliki tingkat kestabilan genetik yang tinggi. Benih hasil kultur *in vitro* memiliki kesamaan genetik dengan induk yang digunakan sebagai tanaman sumber eksplan. Namun demikian, banyak penelitian melaporkan bahwa tanaman hasil kultur *in vitro* memiliki varisasi genetik dibandingkan dengan tanaman induknya. Teknik *in vitro* dilaporkan dapat menghasilkan variasi genetik pada ‘klon-klon’ yang dihasilkan, suatu fenomena yang dikenal sebagai *somaclonal variation*. Oleh karena itu uji kestabilan genetik tanaman hasil kultur *in vitro* sangat diperlukan untuk memastikan bahwa teknik tersebut mampu menghasilkan tanaman-tanaman yang *true to type*.

Konfirmasi kestabilan genetik tanaman hasil kultur *in vitro* banyak dilakukan secara morfologi, sitologi, biokimia ataupun dengan menggunakan penanda molekular (Semagn *et al.*, 2006; Sisunandar *et al.*, 2010; Sarwat *et al.*, 2012;

Nadeem *et al.*, 2018). Analisis morfologi banyak dilakukan berdasarkan pada ciri bentuk luar organ tanaman seperti tinggi tunas, jumlah akar, jumlah daun, panjang daun, lebar daun maupun warna bunga, bentuk biji, warna organ (Rani dan Raina, 2000). Kekurangan penanda ini adalah jumlah sifat agronomis yang terbatas dan dipengaruhi faktor lingkungan (Nadeem *et al.*, 2018).

Uji biokimia didasarkan pada variasi enzim yang disebut isoenzim dan metabolit sekunder (Mateu-Andrés dan De Paco, 2004). Penanda ini bersifat kodominan, mudah digunakan dan harga relatif murah, namun karakter yang diamati sedikit, mendeteksi sedikit polimorfisme dan tergantung pada faktor teknik kultur *in vitro* yang dilakukan (Mondini *et al.*, 2009). Penanda biokimia ini sangat tergantung pada ekspresi gen, lingkungan dan tahapan perkembangan tanaman (Sarwat *et al.*, 2012; Nadeem *et al.*, 2018).

Uji sitologi banyak dilakukan berdasarkan aberasi kromosom (Phillips *et al.*, 1994) dan perubahan derajat ploidi (Rani dan Raina, 2000). Variasi yang dapat dilihat pada penanda sitologi berdasarkan perbedaan *euchromatin* dan *heterochromatin*. Sebagai contoh Pita G diproduksi

pewarna Giemsa, pita Q diproduksi oleh *quinacrine hydrochloride* dan pita R merupakan kebalikan dari pita G (Nadeem *et al.*, 2018). Pemanfaatan penanda DNA banyak digunakan karena: (1) tidak dipengaruhi kondisi lingkungan, (2) mendeteksi perubahan pada daerah penyandi maupun bukan penyandi, (3) bersifat turun temurun, (4) jumlah melimpah di dalam genom, (5) mudah dan efisien dalam penanganan, (6) bersifat polimorfik, (7) *reproducible* (Sarwat *et al.*, 2012).

Penanda molekular saat ini yang telah digunakan untuk analisis stabilitas genom tanaman hasil kultur *in vitro* antara lain dengan penanda *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) pada tanaman *Azadirachta indica* (Singh *et al.*, 2002), penanda *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) pada tanaman *Hypericum perforatum* (Halušková dan Košuth, 2003), penanda *Simple single repeat* (SSR) pada tanaman kelapa sawit (Cahyaningsih *et al.*, 2016) dan penanda *Randomly amplified microsatellite polymorphism* (RAMP) pada tanaman *Sechium edule* (Cruz-Martínez *et al.*, 2017). Ramet kelapa sawit menunjukkan kesamaan genetik 90–100% terhadap ortet berdasarkan penanda molekular SSR (Cahyaningsih *et al.*, 2016).

Salah satu penanda molekular yang banyak digunakan untuk menguji tingkat kestabilan genetik tanaman hasil kultur *in vitro* adalah *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD). Metode ini didasarkan atas teknik reaksi polimerisasi berantai (PCR) dengan primer yang digunakan adalah oligonukleotida yang terdiri dari 5–10 nukleotida (Semagn *et al.*, 2006; Nadeem *et al.*, 2018). Uji molekular ini dilakukan dengan cara melihat pola pita DNA yang dihasilkan setelah DNA genom diamplifikasi menggunakan primer acak. Keunggulan RAPD: (1) tidak memerlukan pengetahuan latar belakang genom tanaman yang akan diteliti, (2) mampu menghasilkan karakter yang relatif tidak terbatas jumlahnya, (3) diperlukan kuantitas sampel DNA yang sedikit, (4) hemat biaya, (5) mudah dipelajari, (6) primer mudah didapatkan. Sedangkan kelemahannya adalah

tingkat reproduibilitasnya rendah, sensitif terhadap variasi konsentrasi DNA, dan memerlukan optimasi suhu dan primer pada saat pengujian. Penanda RAPD bersifat dominan, sehingga tidak dapat membedakan individu genotipe homozigot dan heterozigot (Semagn *et al.*, 2006).

Random amplified polymorphic DNA telah banyak digunakan untuk menganalisis kestabilan genetik tanaman hasil kultur *in vitro* (Tabel 3). Hasil uji molekular dengan menggunakan teknik RAPD menunjukkan hasil yang bervariasi. Pada beberapa tanaman, uji RAPD menunjukkan bahwa tanaman hasil kultur *in vitro* memiliki tingkat kestabilan yang tinggi, seperti pada tanaman *Phoenix dactylifera* (Kumar *et al.*, 2010), *Citrus suhuiensis* (Devy *et al.*, 2012b), *Musa acuminata x Musa balbisiana*, ABB (Poerba *et al.*, 2012), *Dendrocalamus strictus* (Goyal *et al.*, 2015), *Origanum majorana* (Çetin, 2018), *Tectona grandis* (Nurtjahjaningsih *et al.*, 2018). Namun demikian, pada tanaman yang lain, uji kestabilan genetik dengan menggunakan teknik RAPD menunjukkan adanya variasi somaklonal pada tanaman hasil kultur *in vitro*, seperti pada tanaman tebu (Zucchi *et al.*, 2000; Doule *et al.*, 2008; Lengkon *et al.*, 2012).

Uji molekular lain yang banyak digunakan untuk memastikan kestabilan genetik tanaman hasil kultur *in vitro* adalah teknik *Inter simple sequence repeat* (ISSR). ISSR merupakan penanda molekular berbasis PCR (reaksi polimerisasi berantai) yang menggunakan sekuen mikrosatelit (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Mikrosatelit terdiri dari sekuen berulang dalam untai DNA yang tidak mengkode sifat tertentu dan bersifat lestari (Widiastuti *et al.*, 2013). Sekuen berulang terdiri dari di, tri dan tetra oligonukleotida. ISSR menggunakan primer lebih panjang (15–30 mers) bila dibandingkan dengan RAPD yang hanya 10 mers. ISSR memiliki jangkauan amplifikasi yang lebih luas karena melibatkan sekuen diantara mikrosatelit yang memiliki panjang sekuen berbeda-beda. Biasanya pita DNA yang dihasilkan dari ISSR sekitar 200–2000 bp (Semagn *et al.*, 2006).

Tabel 3. Kestabilan genetik tanaman hasil kultur jaringan berdasarkan penanda RAPD. (*Plant genetic stability of tissue culture based on RAPD markers*).

Tanaman	Hasil	Referensi
<i>Dioscorea bulbifera</i>	Tidak ada variasi	Dixit <i>et al.</i> , 2003
<i>Arachis retusa</i>	Genetik stabil	Gagliardi <i>et al.</i> , 2007
<i>Vitis</i> spp	Genetik stabil	Alizadeh dan Singh, 2009
<i>P. fascicularis</i>	Belum dilakukan	Jose <i>et al.</i> , 2016
<i>Phoenix dactylifera</i>	Tidak ada variasi genetik	Kumar <i>et al.</i> , 2010
<i>Citrus suhuiensis</i>	Tidak ada variasi genetik	Devy <i>et al.</i> , 2012b
<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> , ABB	Tidak ada variasi genetik	Poerba <i>et al.</i> , 2012
<i>Dendrocalamus strictus</i>	Tidak ada variasi genetik	Goyal <i>et al.</i> , 2015
<i>Origanum majorana</i>	Tidak ada variasi genetik	Çetin, 2018
<i>Tectona grandis</i>	Tidak ada variasi genetik	Nurtjahjaningsih <i>et al.</i> , 2018
<i>Salvia hispanica</i> L.	Tidak ada variasi genetik	Yadav <i>et al.</i> , 2019
<i>Saccharum officinarum</i>	Ada variasi genetik (37 %) Ada variasi genetik (6,93 %) Ada variasi genetik (13,8 %; 3,0 % dan 0,3 %)	Lengkong <i>et al.</i> , 2012 Zucchi <i>et al.</i> , 2000 Doule <i>et al.</i> , 2008
<i>Bambusa balcooa</i>	tidak ada variasi somklonal	Suwal <i>et al.</i> , 2021

Penanda ISSR lebih sederhana dalam aplikasi, mudah dilakukan, cepat dan tidak memerlukan banyak informasi untuk mendesain primer (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Dibandingkan RAPD, ISSR disebut lebih *reliable* yang ditunjukkan dengan polimorfisme per primer lebih tinggi. Rata-rata polimorfisme yang dihasilkan primer ISSR 6.5 sedangkan RAPD hanya 2.0 (Qian *et al.*, 2001).

Seperti halnya RAPD, ISSR juga dapat digunakan untuk menguji stabilitas genetik tanaman hasil kultur *in vitro* dengan hasil yang bervariasi (Tabel 4). Beberapa studi menunjukkan bahwa teknik kultur *in vitro* mampu menghasilkan

tanaman dengan kestabilan genetik yang tinggi, seperti pada *Phoenix dactylifera* (Kumar *et al.*, 2010), *Citrus suhuiensis* (Devy *et al.*, 2012b), *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (Poerba *et al.*, 2012), *Dendrocalamus strictus* (Goyal *et al.*, 2015), *Reseda pentagyna* (Al-Qurainy *et al.*, 2018), *Salvia hispanica* L. (Yadav *et al.*, 2019). Namun demikian, uji kestabilan genetik pada tanaman *citrumelo* yang menggunakan eksplan daun muda (Yulianti *et al.*, 2018) dan tanaman anggur yang menggunakan eksplan berupa batang dan akar (Indaryani *et al.*, 2019) menunjukkan adanya variasi somaklonal pada tanaman hasil kultur *in vitro*.

Tabel 4. Kestabilan genetik tanaman hasil kultur jaringan berdasarkan penanda ISSR. (*Plant genetic stability of tissue culture based on ISSR markers*).

Tanaman	Hasil	Referensi
<i>Vitis</i> spp	Genetik stabil	Alizadeh dan Singh, 2009
<i>Phoenix dactylifera</i>	Tidak ada variasi genetik	Kumar <i>et al.</i> , 2010
<i>Citrus suhuiensis</i>	Tidak ada variasi genetik	Devy <i>et al.</i> , 2012b
<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> , ABB	Tidak ada variasi genetik	Poerba <i>et al.</i> , 2012
<i>Dendrocalamus strictus</i>	Tidak ada variasi genetik	Goyal <i>et al.</i> , 2015
<i>Reseda pentagyna</i>	Tidak ada variasi genetik	Al-Qurainy <i>et al.</i> , 2018
<i>Salvia hispanica</i> L.	Tidak ada variasi genetik	Yadav <i>et al.</i> , 2019
Citrumelo	Ada variasi genetik (2,6%)	Yulianti <i>et al.</i> , 2018
<i>Vitis vinifera</i>	Ada variasi genetik (34 %)	Indaryani <i>et al.</i> , 2019

Prospek dan Rekomendasi

Pandanus tectorius merupakan tanaman serbaguna yang memiliki fungsi ekologi, ekonomi, industri, bahan pangan, bahan untuk pengobatan yang potensial untuk dimanfaatkan dan dikembangkan. Perbanyak tanaman ini dapat dilakukan secara kultur *in vitro* melalui kultur pucuk tunas. Uji kestabilan genetik klon-klon hasil kultur *in vitro* penting dilakukan untuk mengkonfirmasi sifat genetik yang diinginkan. Uji stabilitas genetik pada *P. tectorius* dapat dilakukan dengan menggunakan penanda molekular RAPD dan ISSR.

DAFTAR PUSTAKA

- Adkar, P.P. and Bhaskar, V.H., 2014. *Pandanus odoratissimus* (Kewda): A review on ethnopharmacology, phytochemistry, and nutritional aspects. In *Advances in Pharmacological Sciences* (pp. 1–19). <https://doi.org/10.1155/2014/120895>.
- Ahmad, I., Jaskani, M. J., Nafees, M., Ashraf, I. and Qureshi, R., 2016. Control of media browning in micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 48(2), 713–716.
- Al-Qurainy, F., Nadeem, M., Khan, S., Alansi, S., Tarrour, M., Al-Ameri, A.A., Gaafar, A.R.Z., and Alshameri, A., 2018. Rapid plant regeneration, validation of genetic integrity by ISSR markers and conservation of *Reseda pentagyna* an endemic plant growing in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.003>.
- Al-Taleb, M.M., Hassawi, D.S. and Abu-Romman, S.M., 2011. Production of virus free potato plants using meristem culture from cultivars

grown under Jordanian environment. *J. Agric. and Environ. Sci.*, 11(4), 467–472.

- Alizadeh, M. and Singh, S.K., 2009. Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, 7(1), 37–44.
- Amirova, A., Dossymbetova, S., Rysbayeva, Y., Usenbekov, B., Tolegen, A. and Ydyrys, A., 2022. Multiple Plant Regeneration from Embryogenic Calli of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. *Plants*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/plants11081020>.
- Ashish, S.S., Vidyasagan, K., Kumar, V. and Ajeesh, R., 2015. Evaluation of leaf biomass production and fibre properties of *Pandanus tectorius* in the coastal plains of Thrissur District, Kerala, India. *Indian Journal of Tropical Biodiversity*, 23(1), 69–73.
- Bhatia, S. and Bera, T., 2015. Somatic embryogenesis and organogenesis. In K. Bhatia, Saurabh; Bera, Tanmoy; Dahiya, Randhir; Sarma (Ed.), *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 209–230). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00006-6>.
- Bhuiyan, F.R., 2013. In vitro meristem culture and regeneration of three potato varieties of Bangladesh. *Research in Biotechnology*, 4(3), 29–37.
- Biradar, S., Biradar, D.P., Patil, V.C., Patil, S.S. and Kamar, N.S., 2009. In vitro plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane. *Karnataka J. Agric. Sci.*, 22(1), 21–24.
- Cahyaningsih, Y.F., Wiendi, N.M.A. dan

- Toruan-Mathius, D.N., 2016. Deteksi kestabilan genetik ramet kelapa sawit hasil kultur in vitro menggunakan SSR. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 44(1), 83–90. <https://doi.org/10.24831/jai.v44i1.12507>.
- Çetin, B., 2018. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro raised plants of *Origanum majorana* L. using random amplified polymorphic DNA. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 14(2), 237–239. <https://doi.org/10.18466/cbayarfbe.406873>
- Cruz-Martínez, V., Castellanos-Hernández, O.A., Acevedo-Hernández, G.J., Torres-Morán, M.I., Gutiérrez-Lomelí, M., Ruvalcaba-Ruiz, D., Zurita, F. and Rodríguez-Sahagún, A., 2017. Genetic fidelity assessment in plants of *Sechium edule* regenerated via organogenesis. *South African Journal of Botany*, 112(October), 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.020>.
- Devy, N.F., Yulianti, F. dan Hardiyanto, H., 2012a. Pengaruh densitas awal kalus dalam perbanyakan melalui embriogenesis somatik terhadap daya multiplikasi dan stabilitas genetik planlet siam kintamani. *Jurnal Hortikultura*, 22(4), 309–315. <https://doi.org/10.21082/jhort.v22n4.2012.p309-315>.
- Devy, N.F., Yulianti, F. dan Hardiyanto, H., 2012b. Perbanyakan massal embrio kalamondin melalui teknologi somatik embriogenesis menggunakan bioreaktor. *Jurnal Hortikultura*, 22(1), 1–7. <https://doi.org/10.21082/jhort.v22n1.2012.p1-7>.
- Dixit, S., Mandal, B.B., Ahuja, S. and Srivastava, P.S., 2003. Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. *Cryo-Letters*, 24(2), 77–84.
- Doule, R.B., Kawar, P.G., Devarumath, R.M. and Nerkar, Y.S., 2008. Field performance and RAPD analysis for assessment of genetic variation in sugarcane somaclones. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 68(3), 301–306.
- Ferdous, M.H., Masum Billah, A.A., Mehraj, H., Taufique, T. and Jamal Uddin, A.F.M., 2015. BAP and IBA pulsing for in vitro multiplication of banana cultivars through shoot-tip culture. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 03(02), 87–95. <https://doi.org/10.18801/jbar.030215.35>.
- Gagliardi, R.F., Hanai, L.R., Pacheco, G., Oliveira, C.A., Carneiro, L.A., Montenegro Valls, J.F., Mansur, E. and Vieira, M.L.C., 2007. Assessment of genetic stability among in vitro plants of *Arachis retusa* using RAPD and AFLP markers for germplasm preservation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(3), 307–312. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00402.x>.
- Gallaher, T., 2014. The past and future of hala (*Pandanus tectorius*) in Hawai'i. In *'Ike Ulana Lau Hala: The Vitality and Vibrancy of Lau Hala Weaving Traditions in Hawai'i* (pp. 1–18). <https://doi.org/10.21313/hawaii/9780824840938.003.0008>.
- Gangopadhyay, G., Bandyopadhyay, T., Modak, B.K., Wongpornchai, S. and Mukherjee, K.K., 2004. Micropropagation of Indian pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), a rich source of 2-acetyl-1-pyrroline. *Current Science*, 87(11), 1589–1592.
- Goyal, A.K., Pradhan, S., Basistha, B.C. and Sen, A., 2015. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*, 5, 473–482. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0244-7>.
- Gurmeet, S. and Amrita, P., 2015. Unique pandanus -Flavour, food and medicine. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 5(3), 08–14.
- Halušková, J. and Košuth, J., 2003. RAPD analysis of somaclonal and natural DNA variation in *Hypericum perforatum* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45(2), 101–104.
- Hani, A. dan Dendang, B., 2008. Teknik pembibitan pandan *Pandanus tectorius* Parkinson ex Z. *Balai*, V(3), 255–260.
- Heyne, K., 1987. Tumbuhan berguna Indonesia, jil. 3, terjemahan Badan Litbang Kehutanan Jakarta. In *Yayasan Sarana Warna Jaya, Jakarta*.
- Hoa, N.T., Dien, P.H. and Quang, D.N., 2014. Cytotoxic steroids from the stem barks of *Pandanus tectorius*. *Research Journal of Phytochemistry*, 8(2), 52–56. <https://doi.org/10.3923/rjphyto.2014.52.56>.
- Holle, M.J., Farkhah, Y., Arfriana, F.R. and Nuriliani, A., 2013. Cytotoxic activity and apoptotic induction of leaves and fruit extract of screw pine (*Pandanus tectorius*) to T47D cell line. *The 1st Annual International Scholars Conference in Taiwan*, April, 580–586.
- Indaryani, P.M.K., Ashari, S. and Mariana, B.D., 2019. Analysis genetic diversity of grape (*Vitis vinifera* L.) varieties BS 60 from tissue culture propagation with ISSR markers. *Jurnal Produksi Tanaman*, 7(11), 2100–2106.
- Isda, M.N., Fatonah, S. dan Sari, L.N., 2016. Pembentukan tunas dari biji manggis (*Garcinia mangostana* L.) Asal Bengkulu

- dengan penambahan BAP dan madu secara in vitro. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 9(2), 119–124. <https://doi.org/10.15408/kauniyah.v9i2.3376>.
- Jafari, N., Othman, R.Y. and Khalid, N., 2011. Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on in vitro shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. *African Journal of Biotechnology*, 10(13), 2446–2450. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1149>.
- Jitsopakul, N., Thammasiri, K. and Ishikawa, K., 2013. Efficient adventitious shoot regeneration from shoot tip culture of *Vanda coerulea*, a Thai orchid. *ScienceAsia*, 39(5), 449–455. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.449>.
- Jose, B., Harikumar, K., Krishnan, P.N. and Satheeshkumar, K., 2016. In vitro mass multiplication of screw pines (*Pandanus* spp.) - an important coastal bio- resource. *Journal of Coastal Conservation*, 20, 443–453. <https://doi.org/10.1007/s11852-016-0458-4>.
- Kaushal, S., Sidana, A. and Dev, K., 2015. In vitro plant production through apical meristem culture of *Gentiana kurroo* Royle. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 3(1), 04–09.
- Khan, S.A., Rashid, H., Chaudhary, M.F., Chaudhry, Z. and Afroz, A., 2008. Rapid micropropagation of three elite Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*, 7(13), 2174–2180. <https://doi.org/10.5897/AJB08.869>
- Khaskheli, A.J., Khaskheli, M.I., Khaskheli, M.A., Shar, T., Ahmad, W., Lighari, U.A., Khaskheli, M.A., Khaskheli, A.A. and Makan, F.H., 2018. Proliferation, multiplication and improvement of micro-propagation system for mass clonal production of rose through shoot tip culture. *American Journal of Plant Sciences*, 09(02), 296–310. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.92024>.
- Ko, C.Y., Al-Abdulkarim, A.M., Al-Jowid, S.M. and Al-Baiz, A., 2009. An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. *African Journal of Biotechnology*, 8(11), 2611–2615. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i11.60783>.
- Kumar, N., Modi, A.R., Singh, A.S., Gajera, B.B., Patel, A.R., Patel, M.P. and Subhash, N., 2010. Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(2), 207–212. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0023-9>.
- Lengkong, C.L.W., Polii-Mandang, J. dan Lengkong, E.F., 2012. Identifikasi keragaman genetik kentang supejohn transgenik (*Solanum tuberosum* L. var supejohn). *EUGENIA*, 18(3), 197–204. <https://doi.org/10.35791/eug.18.3.2012.4095>.
- Lestari, E.G., 2011. Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 7(1), 63–68. <https://doi.org/10.21082/jbio.v7n1.2011.p63-68>.
- Manuel, J. and George, P., 2013. Influence of apical meristem and chemotherapy on production of virus free sugarcane plants. *Research Journal of Recent Sciences Res. J. Recent. Sci*, 3, 305–309.
- Mateu-Andrés, I. and De Paco, L., 2004. Allozymic differentiation of the *Antirrhinum majus* and *A. siculum* species groups. *Annals of Botany*, 465–473. <https://doi.org/10.1093/aob/mci055>.
- Mondini, L., Noorani, A. and Pagnotta, M.A., 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1), 19–35. <https://doi.org/10.3390/d1010019>.
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G. and Baloch, F.S., 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(2), 261–285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- Nayanakantha, N., Singh, B. and Kumar, A., 2010. Improved culture medium for micropropagation of *Aloe vera* L. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 13(4), 87–93. <https://doi.org/10.4038/tare.v13i4.3291>.
- Nguyen, V.H., Yen, C.R., and Hsieh, C.H., 2018. Effect of nutritional and growth hormonal factors on in vitro regeneration of papaya (*Carica papaya* L. cv. Red Lady). *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 46(4), 559–568. <https://doi.org/10.4038/JNSFSR.V46I4.8631>.
- Nurtjahjaningsih, I., Herawan, T., Rachman, R.P. dan Rimbawanto, A., 2018. Pengujian penanda random amplified polymorphism DNA untuk mengetahui kestabilan genetik klon jati (*Tectona grandis*). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 12(2), 127–134. <https://doi.org/10.20886/jpth.2018.12.2.127-134>.
- Pant, B. and Thapa, D. 2012. In vitro mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. *African Journal of*

- Biotechnology*, 11(42), 9970–9974. <https://doi.org/10.5897/ajb11.3106>.
- Park, Y.S., Barrett, J.D. and Bonga, J.M., 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: Deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* (pp. 231–239). <https://doi.org/10.1007/BF02822713>.
- Phillips, R.L., Kaeppeler, S.M. and Olhoft, P., 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5222>.
- Poerba, Y.S., Imelda, M. dan Martanti, D., 2012. Analisa kestabilan genetik pisang kepok ‘Unti Sayang’ hasil mikroprogasi dengan marka RAPD dan ISSR. *Berita Biologi*, 11(2), 275–282. <https://www.neliti.com/publications/69068/analisa-kestabilan-genetik-pisang-kepok-unti-sayang-hasil-mikroprogasi-dengan-ma>.
- Pranata, I.T. dan Herawati, M.M., 2019. Efektivitas sterilisasi kimiawi eksplan pucuk *Artemisia annua* LINN. dengan berbagai prosedur sterilisasi pada tahap inisiasi in vitro. *Agrium*, 22(2), 94–101.
- Qian, W., Ge, S. and Hong, D.Y., 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 440–449. <https://doi.org/10.1007/s001220051665>
- Rahayu, M., Sunarti, S. dan Keim, A.R.Y.P., 2008. Kajian etnobotani pandan samak (*Pandanus odoratissimus* L.f.): Pemanfaatan dan peranannya dalam usaha menunjang penghasilan keluarga di Ujung Kulon, Banten. *Biodiversitas*, 9(4), 310–314.
- Rahayu, S., Sinaga, E. dan Noverita., 2015. Kajian pandanus tectorius dalam upaya mitigasi Tsunami dan pemanfaatannya sebagai tumbuhan obat dan bahan kerajinan anyama. *Laporan Akhir Penelitian Strategis Nasional*, 114.
- Rani, V. and Raina, S., 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagation plants: A critical reappraisal. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36(5), 319–330.
- Roostika, I., Mariska, I. dan Purnamaningsih, R., 2005. Regenerasi tanaman sedap malam melalui Organogenesis dan Embriogenesis Somatik. *Jurnal Hortikultura*, 15(4), 233–241. <https://doi.org/10.21082/jhort.v15n4.2005.p%0p>.
- Sarungallo, Z.L., Susanti, C.M.E., Sinaga, N.I., Irbayanti, D.N. dan Latumahina, R.M.M., 2018. Kandungan gizi buah pandan laut (*Pandanus tectorius* Park.) pada tiga tingkat kematangan. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 7(1), 21–26. <https://doi.org/10.17728/jatp.2577>.
- Sarwat, M., Nabi, G., Das, S. and Srivastava, P.S., 2012. Molecular markers in medicinal plant biotechnology: Past and present. In *Critical Reviews in Biotechnology* (pp. 1–19). <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.551872>.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å. and Ndjondjop, M.N., 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25), 2540–2568. <https://doi.org/10.5897/AJB2006.000-5110>.
- Sharma, S., Shahzad, A., Jan, N. and Sahai, A., 2009. In vitro studies on shoot regeneration through various explants and alginate-encapsulated nodal segments of *Spilanthes mauritiana* DC., an endangered medicinal herb. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 3(1), 56–61.
- Shatnawi, M., Anfoka, G., Shibli, R., Al-Mazra’Awi, M., Shahrou, W. and Arebiat, A., 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35, 173–184. <https://doi.org/10.3906/tar-0912-519>.
- Singh, A., Negi, M.S., Moses, V.K., Venkateswarlu, B., Srivastava, P.S. and Lakshmikumar, M., 2002. Molecular analysis of micropropagated neem plants using AFLP markers for ascertaining clonal fidelity. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(5), 519–524. <https://doi.org/10.1079/IVP2002341>.
- Singh, P. and Patel, R.M., 2014. Factors influencing in vitro growth and shoot multiplication of pomegranate. *The Bioscan*, 9(3), 1031–1035. http://www.thebioscan.in/Journals_PDF/9323_2772_PUSHPRAJ_SINGH.pdf.
- Sirisom, Y. and Te-Chato, S., 2012. The effect of peptone and silver nitrate on In vitro shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. *Journal of Agricultural Technology*, 8(4), 1509–1516.
- Sisunandar, Rival, A., Turquay, P., Samosir, Y. and Adkins, S.W., 2010. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. *Planta*, 232, 435–447. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1186-x>.

- Skoog, F. and Miller, C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, v(11), 118–131.
- Sughra, M.G., Altaf, S.A., Rafique, R.M., Muhammad, M.S., Rind Balouch, S.N. and Umar, D.M., 2014. *In vitro* regenerability of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties through shoot tip culture. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 11(1), 13–23.
- Suman, S., 2017. Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. In *Biochemical and Cellular Archives* (pp. 1–26).
- Susiarti, S. dan Rahayu, M., 2010. Kajian etnobotani pandan samak (*Pandanus tectorius* Sol.) di kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat. *Berita Biologi*, 10(1), 113–121.
- Suwal, M.M., Lamichhane, J. and Gauchan, D.P., 2021. *PTC and B Assessment of Genetic Stability of Micropropagated Bambusa*. 31 (1), 81–95.
- Tarampak, T.C., Sulistiawati, S. dan Nirmala, R., 2019. Metode mengatasi browning pada eksplan ulin (*Eusideroxylon zwageri*) untuk inisiasi regenerasi secara *in Vitro*. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika Lembab*, 1(2), 106–117. <https://doi.org/10.35941/jatl.1.2.2019.1972.106-113>.
- Thomson, L.A.J., Englberger, L., Guarino, L., Thaman, R.R. and Elevitch, C.R., 2006. *Pandanus tectorius* (Pandanus) Pandanaceae (screwpine family). In *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry* www.traditionaltree.org (Issue April ver 1.1, pp. 1–29).
- Thorpe, T.A., 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>.
- Tilkat, E., Işikalan, Ç. and Onay, A., 2005. *In vitro* propagation of khinjuk pistachio (*Pistacia khinjuk* Stocks) through seedling apical shoot tip culture. *Propagation of Ornamental Plants*, 5(3), 1–5.
- Tyagi, H. and Tomar, U.K., 2013. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and rooting of mature *Tecomella undulata* (Sm .) seem tree. *Research in Plant Sciences*, 1(2), 38–44.
- Vuylsteke, D.R., 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of Musa germplasm. *Practical Manuals for Handling Crop Germplasm In Vitro*, 2, 1–56.
- Waseem, K., Jilani, M.S. and Khan, M.S., 2009. Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* l.) through shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*, 8(9), 1871–1877.
- Widiastuti, A., Sobir. dan Suhartanto, M., 2013. Analisis keragaman manggis (*Garcinia mangostana*) diiradiasi dengan sinar gamma berdasarkan penanda ISSR. *Bioteknologi*, 10 (1), 15–22.
- Yadav, A., Kothari, S.L., Kachhwaha, S. and Joshi, A., 2019. *In vitro* propagation of chia (*Salvia hispanica* L.) and assessment of genetic fidelity using random amplified polymorphic DNA and intersimple sequence repeat molecular markers. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(1), 42–47. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70108>.
- Yulianti, F., Arisah, H. dan Agisimanto, D., 2018. Pengujian stabilitas genetik plantlet citrumelo hasil tTCL dari kultur *in vitro* dengan menggunakan teknik sekuen berulang. *Jurnal Hortikultura*, 27(2), 165–172. <https://doi.org/10.21082/jhort.v27n2.2017.p165-172>.
- Zainal, A., Anwar, A. dan Kasim, M., 1999. Pengaruh NAA dan Kinetin terhadap pertumbuhan pandan (*Pandanus tectorius*) secara *in vitro*. *Stigma Volume VII No.1: 90-94.*, VII(1), 90–94.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>.
- Zucchi, M.I., Arizono, H., Morais, V.A., Fungaro, M.H.P. and Vieira, M.L.C., 2002. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genetics and Molecular Biology*, 25(1), 91–96. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000100017>.