

Respons Pertumbuhan *Mentha* spp. terhadap Penambahan Air Kelapa dan 6-Benzylaminopurine pada Media *In Vitro*

APRILIANA DYAH PRAWESTRI¹, RESA SRI RAHAYU², INDIRA RIASTIWI³

¹Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46 Bogor, Indonesia. 16911

Email: ad.prawestri@gmail.com

²Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46 Bogor, Indonesia. 16911

Email: resa.rahayu@gmail.com

³Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46 Bogor, Indonesia. 16911

Email: indirariastiwi@gmail.com

ABSTRACT

No less than 600 cultivars have been developed from 25 *Mentha* species, but only four mint species are cultivated commercially for essential oil production in the world, two of them are peppermint (*Mentha* × *piperita* L.) and spearmint (*M. spicata* L.). Mints are generally cultivated through vegetative propagation due to pollen sterility and high ploidy levels, thus generative propagation is often unsuccessful. Therefore, to optimize vegetative propagation especially *in vitro* propagation, this study aimed to determine the growth response of mints, namely peppermint and spearmint grown on *in vitro* media with the addition of coconut water and BAP. Using a Randomized Block Design with 1 factor, node segments from peppermint and spearmint plantlets were inoculated on growth media with 4 levels: 1) MS (control, without the addition of coconut water and BAP); 2) MS with 50 mL coconut water (MS + AK); 3) MS with 0.25 mg/L BAP (MS + BAP); 4) MS with 50 mL of coconut water and 0.25 mg/L BAP (MS + AK + BAP). Each treatment consisted of 5 replicates with 5 explants each. The cultures were incubated for eight weeks, growth and physiological parameters were observed. The results showed that peppermint growth response was best in the medium with coconut water addition, while the addition of coconut water or BAP had no effect on spearmint growth. Coconut water and BAP increased the total chlorophyll content of peppermint and spearmint leaves. The combination of coconut water and BAP resulted in an inhibitory response to the growth of peppermint and spearmint *in vitro*.

Keywords: *in vitro* media; micropropagation; peppermint; plant growth regulator; spearmint

INTISARI

Hingga saat ini sebanyak 600 kultivar mint telah berhasil dikembangkan dari 25 spesies *Mentha*, namun hanya empat spesies mint yang dibudidayakan secara komersial untuk produksi minyak esensial di dunia, dua diantaranya adalah peppermint (*Mentha* × *piperita* L.) dan spearmint (*M. spicata* L.). Tanaman mint umumnya dibudidayakan melalui perbanyakan secara vegetatif karena memiliki pollen yang steril dan tingkat ploidi yang tinggi sehingga metode perbanyakan secara generatif sering kali tidak berhasil. Oleh karena itu, dalam upaya mengoptimalkan perbanyakan vegetatif khususnya secara *in vitro*, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons pertumbuhan tanaman mint, yaitu peppermint dan spearmint yang ditumbuhkan pada media pertumbuhan *in vitro* dengan penambahan air kelapa dan BAP secara tunggal maupun kombinasi. Eksplan buku batang dari planlet *in vitro* peppermint dan spearmint ditumbuhkan pada media *in vitro* dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok 1 faktor, yaitu media pertumbuhan dengan 4 taraf: 1) MS (kontrol, tanpa penambahan air kelapa dan BAP); 2) MS ditambah 50 mL air kelapa (MS + AK); 3) MS ditambah 0,25 mg/L BAP (MS + BAP); 4) MS ditambah 50 mL air kelapa dan 0,25 mg/L BAP (MS + AK + BAP). Masing-masing perlakuan terdiri atas 5 ulangan dan 5 eksplan setiap ulangan. Kultur diinkubasi selama delapan minggu dan diamati parameter pertumbuhan dan parameter fisiologis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa respons pertumbuhan biak *in vitro* peppermint terbaik pada media yang ditambah air kelapa, sementara pada biak spearmint penambahan air kelapa maupun BAP tidak memberikan pengaruh pada pertumbuhan. Air kelapa dan BAP meningkatkan kadar klorofil total daun biak peppermint maupun spearmint. Kombinasi penambahan air kelapa dan BAP secara simultan justru menghasilkan respons penghambatan pertumbuhan biak *in vitro* peppermint maupun spearmint.

Kata kunci: media *in vitro*; mikropropagasi; peppermint; spearmint; zat pengatur tumbuh

PENDAHULUAN

Minyak esensial (*essential oil*, EO) telah lama digunakan untuk tujuan pengobatan dan kesehatan di berbagai negara di dunia. Karakter minyak esensial, seperti antidepresan, detoksifikasi, antibakteri, antivirus dan sifat menenangkan, menjadikannya populer beberapa tahun terakhir sebagai bahan terapi yang alami dan aman untuk sejumlah masalah kesehatan (Herman *et al.*, 2019), termasuk terapi untuk pengobatan kanker (Marchand, 2014) dan peningkatan kualitas tidur (Hwang & Shin, 2015). Minyak esensial merupakan likuida minyak aromatik yang diekstraksi dari berbagai bagian tumbuhan, seperti daun, kulit kayu, biji, bunga dan kulit buah (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Beberapa spesies tumbuhan yang umum digunakan dan sangat diminati sebagai minyak esensial adalah tumbuhan mint (*Mentha* spp.).

Hingga saat ini sebanyak 600 kultivar mint telah berhasil dikembangkan dari 25 spesies *Mentha*, namun hanya empat spesies mint yang dibudidayakan secara komersial untuk produksi minyak esensial di dunia, yaitu *M. spicata*, *M. canadensis*, *M. × gracilis*, *M. × piperita* (Chen *et al.*, 2012). Minyak esensial yang dihasilkan dari tumbuhan mint secara luas digunakan di industri makanan dan farmasi dan juga memiliki aktivitas antioksidan dan antimikroba dengan senyawa aktif yang paling berperan adalah mentol (Ali *et al.*, 2015; Mahdavia & Saharkhiz, 2015). Tanaman mint umumnya dibudidayakan melalui perbanyakan secara vegetatif karena memiliki polen yang steril dan tingkat ploidi yang tinggi sehingga metode perbanyakan secara generatif sering kali tidak berhasil (Aker & Hoque, 2018). Selain itu, sebanyak 1,75 juta bakal biji dari 18.000 spikelet perbungaan peppermint hanya terdapat 6 biji yang viabel (Islam *et al.*, 2017). Propagasi klonal secara *in vitro* selanjutnya menjadi teknik yang tepat untuk produksi tanaman mint skala besar dan cepat dari planlet mint yang bebas penyakit untuk kepentingan produksi bahan baku obat, produksi metabolit sekunder, konservasi plasma nutfah dan pemanfaatan berkelanjutan dari tanaman ini (Islam *et al.*, 2017).

Aplikasi zat pengatur tumbuh (ZPT) telah digunakan dalam upaya perbanyakan tanaman mint secara *in vitro*, seperti *M. piperita* (Mehta *et al.*, 2012; Vaidya *et al.*, 2019; Łyczko *et al.*, 2020), *M. spicata* (Fadel, 2011; Samantaray *et al.*, 2012; Ozdemir, 2017) menggunakan buku batang, meristem apikal, nodus kotiledon sebagai eksplan. Kombinasi jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan bervariasi, yaitu 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin, *indole 3-butiric acid* (IBA), dan *α-naphthalene acetic acid* (NAA). Selama bertahun-tahun, pemilihan zat pengatur tumbuh telah dibahas dalam banyak percobaan untuk tanaman mint, tetapi hasil yang diperoleh menunjukkan reaksi spesifik dari genotipe yang dipilih untuk percobaan tertentu pada kondisi kultur jaringan tanaman (Łyczko *et al.*, 2020). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons pertumbuhan tanaman mint (*Mentha* spp.) yang ditumbuhkan pada media pertumbuhan *in vitro* dengan penambahan air kelapa dan BAP.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tumbuhan, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Bahan yang digunakan adalah buku batang dari biak tunas peppermint (*M. × piperita* L.) dan spearmint (*M. spicata* L.) *in vitro*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok 1 faktor, yaitu media pertumbuhan dengan 4 taraf: 1) MS (kontrol, tanpa penambahan air kelapa dan BAP); 2) MS ditambah 50 mL air kelapa (MS + AK); 3) MS ditambah 0,25 mg/L BAP (MS + BAP); 4) MS ditambah 50 mL air kelapa dan 0,25 mg/L BAP (MS + AK + BAP). Masing-masing perlakuan terdiri atas 5 ulangan dan 5 eksplan setiap ulangan.

Media dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS padat (Murashige & Skoog, 1962) yang terdiri dari garam makro dan mikro MS, vitamin MS, 100 mg/L myoinositol, 30 g/L dan 3 g/L gelrite sebagai pematat. Derajat keasaman medium diatur pada pH 5,7-5,8 dengan penambahan beberapa tetes 1 N NaOH atau 1 N HCl sebelum bahan pematat ditambahkan dalam media. Media kemudian disterilisasi dengan autoklaf

pada suhu 121°C selama 20 menit dan sebanyak 30 mL medium dituang pada botol gelas yang berukuran 350 mL. Sebanyak 5 buku batang dari planlet peppermint dan spearmint *in vitro* ditanam pada media perlakuan

Kultur diinkubasi selama 4 minggu dengan fotoperiode 16/8 jam terang/gelap pada ruang kultur dengan intensitas cahaya sebesar 2000 lux ($46 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), temperatur ruang pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$, dan kelembapan udara sebesar 40%. Parameter yang diamati terdiri atas parameter pertumbuhan, yaitu jumlah tunas, tinggi tunas, jumlah buku batang, jumlah cabang, jumlah daun, luas daun, jumlah akar, dan panjang akar; dan parameter fisiologis, yaitu klorofil total dan berat kering. Tunas samping yang tumbuh pada ketiak daun setiap eksplan dikategorikan sebagai tunas baru. Pengukuran tinggi tunas dan panjang akar dilakukan pada tunas tertinggi dan akar terpanjang setiap eksplan, diukur dengan menggunakan mistar. Jumlah cabang dihitung secara keseluruhan pada setiap eksplan. Pengukuran luas daun dilakukan dengan meletakkan daun ketiga dari pucuk pada gelas preparat dan ditutup dengan selotip bening, kemudian dipindai dengan alat pemindai (*scanner*). Hasil pemindaian diukur dengan menggunakan perangkat lunak ImageJ 1.53e untuk mendapatkan ukuran luas daun. Klorofil total diukur dengan menggunakan alat *Chlorophyll Meter* SPAD-502 (KONICA MINOLTA, Japan). Berat kering dihitung dari total berat kering akar dan tajuk.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji ANOVA dan Kruskal-Wallis, kemudian diuji lanjut dengan uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada taraf 5% dengan menggunakan perangkat lunak Statistical Analysis System 9.1 (SAS 9.1) (Mattjik & Sumertajaya, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Parameter pertumbuhan yang diamati pada penelitian ini meliputi jumlah tunas, jumlah cabang, tinggi tunas, panjang akar, jumlah daun, jumlah ruas, jumlah akar, dan luas daun, sementara parameter fisiologi yang diamati meliputi klorofil total dan berat kering.

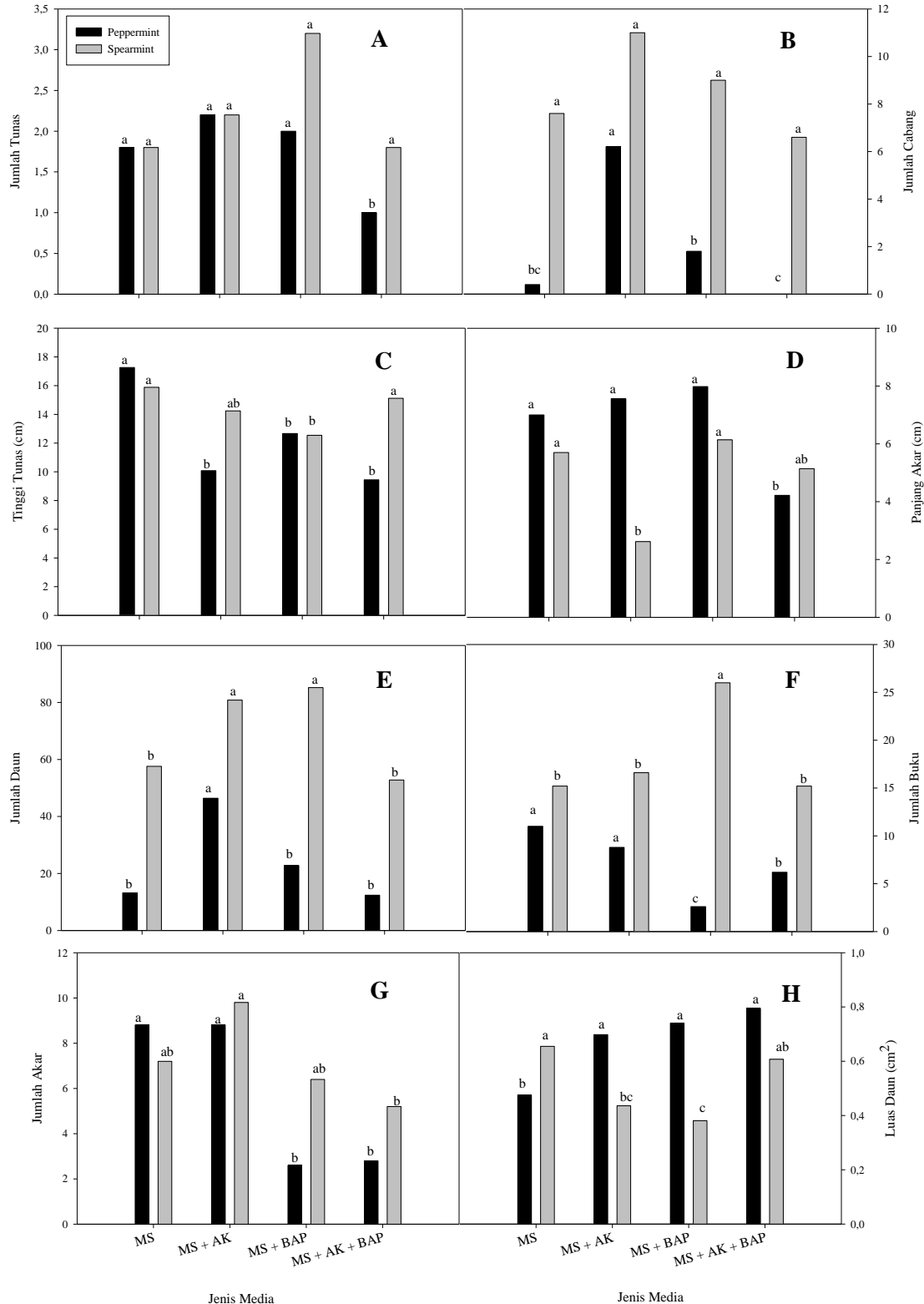
Hasil penelitian menunjukkan bahwa peppermint dan spearmint yang ditanam pada media yang berbeda menunjukkan respons yang berbeda-beda baik terhadap parameter pertumbuhan maupun parameter fisiologi tersebut.

Data pada Gambar 1 menunjukkan perbedaan respons pertumbuhan peppermint dan spearmint terhadap perlakuan kombinasi media yang berbeda. Pemberian air kelapa (MS + AK) tampaknya memberikan pengaruh pada pembentukan tunas dan cabang pada biak *in vitro* peppermint dibandingkan media lainnya. Jumlah tunas tertinggi terdapat pada media dengan penambahan air kelapa, walaupun tidak berbeda signifikan dengan media kontrol MS. Respons pembentukan cabang terbanyak juga terdapat pada media dengan penambahan air kelapa yang berbeda nyata dibandingkan perlakuan media lainnya. Di sisi lain, biak spearmint menghasilkan respons yang berbeda dimana jumlah tunas terbanyak pada media dengan penambahan BAP, sementara jumlah cabang terbanyak pada media yang ditambah air kelapa. Walaupun kedua jenis mint tersebut menghasilkan cabang terbanyak pada media MS + AK, tampak bahwa secara keseluruhan spearmint menunjukkan respons yang lebih baik dalam pembentukan cabang daripada peppermint (Gambar 1A-B).

Biak peppermint dan spearmint yang ditanam pada media kontrol (MS) menghasilkan tunas yang berukuran lebih tinggi dibandingkan media lainnya. Gambar 1C menunjukkan bahwa penambahan air kelapa dan BAP, baik secara tunggal maupun kombinasi, menghasilkan tunas yang lebih pendek dibandingkan kontrol. Jika ditinjau dari jumlah buku (Gambar 1F), peppermint dan spearmint menghasilkan jumlah buku batang berbeda pada perlakuan dengan penambahan BAP walaupun memiliki ukuran tinggi tunas yang sama (Gambar 1C). Rasio antara tinggi tunas dan buku batang dapat digunakan untuk menunjukkan seberapa panjang ruas pada batang. Jumlah buku yang sedikit pada peppermint menunjukkan bahwa pemberian BAP secara tunggal (MS + BAP) menghasilkan ruas batang yang lebih panjang. Dengan tinggi

tunas yang sama, spearmint menghasilkan jumlah buku yang lebih banyak daripada

peppermint. Ini berarti biak in vitro spearmint memiliki ruas lebih pendek.



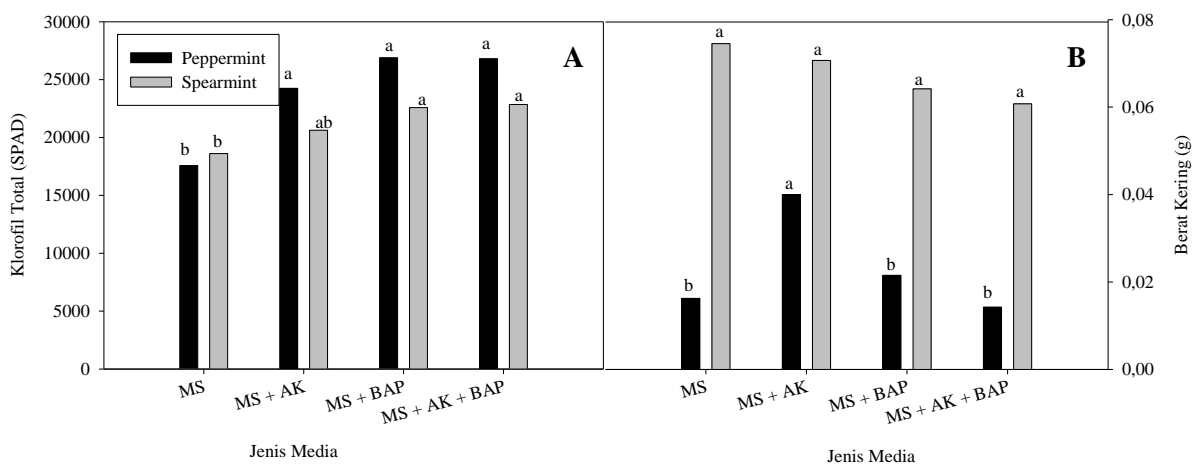
Gambar 1. Pertumbuhan planlet peppermint dan spearmint pada berbagai media in vitro, delapan minggu setelah kultur. Angka-angka pada bar dengan warna yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji Duncan's Multiple Range Test). Keterangan: MS: Murashige & Skoog; AK: Air kelapa; BAP: 6-Benzylaminopurine.

Mint merupakan tanaman yang memiliki tipe duduk daun berhadapan, setiap buku memiliki 2 daun sehingga jumlah daun setidaknya berjumlah dua kali lipat dari jumlah bukannya. Pada penelitian ini, respons pembentukan daun biak *in vitro* peppermint tertinggi pada media yang ditambah air kelapa (MS + AK) dan berbeda nyata dengan perlakuan media lainnya. Jumlah daun peppermint yang hampir sama dengan jumlah buku batang, seperti pada media kontrol (MS), menunjukkan bahwa banyak daun yang mengalami senescence. Adapun pada biak *in vitro* spearmint, penambahan air kelapa (MS + AK) dan BAP (MS + BAP) meningkatkan respons pembentukan daun yang lebih tinggi secara signifikan dibandingkan media MS dan MS + AK + BAP (Gambar 1E-F). Jumlah daun yang tinggi pada spearmint merupakan konsekuensi dari pertumbuhan tunas yang lebih tinggi dan pembentukan jumlah cabang yang lebih banyak, terutama pada media MS + AK dan MS + BAP (Gambar 1A-B).

Daun pada tanaman mint adalah bagian organ yang paling penting dalam sintesis minyak esensial sehingga pengukuran jumlah

dan luas daun menjadi parameter yang perlu untuk diamati. Hasil pada Gambar 1H menunjukkan bahwa penambahan air kelapa dan BAP meningkatkan luas daun biak *in vitro* peppermint dan berbeda nyata dibandingkan kontrol, dengan luas daun terbesar pada media MS + AK + BAP. Sedangkan pada spearmint penambahan air kelapa dan BAP cenderung menurunkan luas daun dengan luas daun terendah terdapat pada perlakuan penambahan BAP (MS + BAP).

Pada parameter pertumbuhan akar, peppermint dan spearmint menunjukkan respons yang berbeda antar perlakuan pada jumlah akar dan panjang akar. Akar peppermint pada perlakuan kombinasi air kelapa dan BAP (MS + AK + BAP) tumbuh lebih pendek dibandingkan perlakuan media lainnya dengan jumlah yang lebih sedikit (Gambar 1D, G). Perlakuan BAP menghasilkan respons pertumbuhan akar yang panjang namun sedikit, sementara perlakuan air kelapa menghasilkan respons pertumbuhan akar yang panjang dan banyak serta tidak berbeda nyata dengan kontrol.



Gambar 2. Pengaruh air kelapa dan BAP pada klorofil total dan biomassa planlet peppermint dan spearmint, delapan minggu setelah kultur. Angka-angka pada bar dengan warna yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji *Duncan's Multiple Range Test*). Keterangan: MS: Murashige & Skoog; AK: Air kelapa; BAP: 6-Benzylaminopurine.

Biak *in vitro* peppermint dan spearmint menunjukkan respons yang berbeda pada klorofil total daun dan berat kering (Gambar 2). Penambahan air kelapa dan BAP secara tunggal maupun kombinasi pada media meningkatkan

klorofil total pada peppermint maupun spearmint. Biak *in vitro* peppermint menghasilkan klorofil total yang lebih tinggi secara signifikan pada media yang ditambah air kelapa dan BAP dibandingkan media dasar MS.

Sementara itu, pada biak *in vitro* spearmint, penambahan air kelapa secara tunggal meningkatkan klorofil total namun tidak berbeda nyata terhadap media MS. Biak *in vitro* peppermint menghasilkan respons pembentukan klorofil yang lebih tinggi dibandingkan spearmint (Gambar 2A).

Gambar 2B menunjukkan bahwa berat kering biak *in vitro* peppermint tertinggi pada perlakuan media yang ditambah air kelapa (MS + AK), dan berbeda signifikan dengan perlakuan media lainnya. Sementara itu, berat kering spearmint cenderung mengalami penurunan pada media dengan penambahan air kelapa dan BAP dengan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada semua perlakuan media.

Biak *in vitro* peppermint dan spearmint dalam penelitian ini menunjukkan respons pertumbuhan yang berbeda pada perlakuan penambahan air kelapa dan BAP pada media tumbuh *in vitro*. Perbedaan respon ini dapat disebabkan oleh perbedaan spesies walaupun masih dalam genus yang sama. Menurut Wilson (2015), peppermint (*M. × piperita* L.) merupakan allohexaploid, $2n = 6x = 72$, hasil hibridisasi alami antara *M. spicata* dan *M. aquatica*. Sedangkan spearmint (*M. spicata* L.) adalah allotetraploid, $2n = 4x = 48$, hasil hibridisasi antara *M. longifolia* dan *M. suaveolens*. Pada penelitian ini, secara keseluruhan eksplan spearmint memberikan respons pertumbuhan yang lebih baik daripada peppermint. Hasil ini berbeda dengan laporan sebelumnya oleh Poovaiah *et al.* (2006) yang menyebutkan bahwa eksplan peppermint beregenerasi jauh lebih cepat daripada eksplan spearmint.

Peppermint dan spearmint dikenal karena kandungan minyak esensial yang tinggi yang dihasilkan dari kelenjar trikoma (Dhifi *et al.*, 2016; Kalemba & Synowiec, 2020) dan kelimpahan senyawa fenol pada daun (Park *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). Oleh karena itu, produksi daun merupakan hal yang penting dalam perbanyakannya kedua spesies ini, serta dipengaruhi oleh tingkat regenerasi eksplan membentuk tunas samping dan cabang. Semakin banyak pertumbuhan tunas samping

dan cabang, semakin banyak pula daun yang tumbuh (Gambar 1A, B, E). Hasil menunjukkan bahwa penambahan air kelapa mampu meningkatkan pertumbuhan daun peppermint yang merupakan manifestasi dari jumlah tunas dan jumlah cabang yang banyak. Sementara itu, eksplan spearmint lebih responsif terhadap BAP dalam membentuk tunas, cabang sehingga menghasilkan daun lebih banyak dibanding perlakuan lainnya.

Air kelapa mengandung berbagai macam senyawa biologis aktif seperti fitohormon yang meliputi sebagian besar, auksin, sitokinin, giberelin, dan inhibitor alami dan regulator yang meliputi etilen, asam absisat, fenol dan flavonol (Nazneen *et al.*, 2014). Hasil penelitian (Kristina & Syahid, 2012) yang melakukan analisis kandungan kimia pada air kelapa menunjukkan komposisi ZPT sitokinin dalam air kelapa muda adalah 273,62 mg/L kinetin dan 290,47 mg/L zeatin, sedangkan kandungan IAA (auksin) sebesar 198,55 mg/L.

Respons pertumbuhan daun peppermint terhadap penambahan air kelapa dalam penelitian ini sejalan dengan Astutik (2008) yang melaporkan bahwa penambahan 7,5% (v/v) air kelapa pada tunas *in vitro* pisang ambon dapat meningkatkan respons pembentukan daun. Peningkatan jumlah tunas dan cabang pada peppermint dan spearmint dalam penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, yaitu penambahan air kelapa sebanyak 10% (v/v) pada media *in vitro* mampu meningkatkan regenerasi tunas peppermint (Wang *et al.*, 2009) dan 25% (v/v) mampu meningkatkan regenerasi tunas adventif yang lebih tinggi pada spearmint (Li *et al.*, 1999). Konsentrasi air kelapa yang digunakan untuk propagasi peppermint secara *in vitro* merupakan salah satu faktor penting untuk mendapatkan regenerasi peppermint yang optimal. Pada jenis hortikultura lain, perlakuan air kelapa secara tunggal pada konsentrasi 25% (v/v) mampu menghasilkan pembentukan daun dan akar yang lebih cepat pada kultur *in vitro* anggrek *Phalaenopsis amabilis* dan memberikan hasil yang berbeda nyata bila dikombinasikan dengan BAP (Bey *et al.*, 2006), seperti halnya pada tanaman kiwi (Nasib *et al.*,

2008) dan brokoli (Manningolung *et al.*, 2018). Berbeda dengan hasil penelitian ini, kombinasi air kelapa dengan BAP cenderung menurunkan regenerasi biak mint *in vitro* dan hanya memberikan pengaruh pada parameter luas daun (Gambar 1H).

Beberapa penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa penambahan BAP pada eksplan mint dapat meningkatkan kemampuan regenerasi tunas biak *in vitro*, antara lain penambahan 1,0 mg/L BAP pada eksplan buku batang maupun pucuk (Ghanti *et al.*, 2004; Akter & Hoque, 2018), kemudian pada eksplan *M. longifolia* dengan 1,5 mg/L BAP (Heidari *et al.*, 2012) dan *M. spicata* dengan 1,0 mg/L BA (Poovaiah *et al.*, 2006). Sedangkan pada spearmint penambahan 2,5 mg/L BAP menghasilkan respons pembentukan tunas yang tinggi dari kalus embrionik (Samantaray *et al.*, 2012). Perbedaan respons pertumbuhan terhadap konsentrasi BAP ini diduga terjadi karena perbedaan spesies atau kondisi kultur eksplan saat dilakukan percobaan (Akter & Hoque, 2018). Lebih lanjut (Poovaiah *et al.*, 2006) melaporkan bahwa ukuran eksplan juga memengaruhi efisiensi regenerasi tunas spearmint. Eksplan ruas batang yang lebih panjang (5-7 mm) menghasilkan tingkat regenerasi yang lebih baik daripada eksplan yang lebih pendek (2-4 mm).

Pada penelitian ini penambahan air kelapa dan dan BAP baik secara tunggal maupun kombinasi menghasilkan respons yang lebih tinggi dalam sintesis klorofil pada daun planlet *in vitro* peppermint dan spearmint (Gambar 2A). Hasil ini serupa dengan penelitian (Nurchayani *et al.*, 2020) bahwa penambahan air kelapa pada media dapat meningkatkan kadar klorofil total pada daun biak *in vitro* *Glycine max* walaupun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kontrol.

Sitokinin eksogen yang ditambahkan dalam media kultur, baik sitokinin alami dari air kelapa maupun sitokinin sintetik BAP, tampak memainkan peranan penting dalam meningkatkan kehijauan daun planlet biak *in vitro* tanaman mint. Sitokinin mempercepat biosintesis klorofil dengan menginisiasi sintesis

5-aminolevulinic acid (ALA) dan memicu aktivitas POR. Sitokinin juga meregulasi ekspresi gen pada nukleus dan plastid dan mengubah kelimpahan protein untuk menjalankan perannya dalam perkembangan dan fungsi kloroplas (Cortleven & Schmölling, 2015).

Selain diukur secara kuantitatif pada parameter tumbuh tanaman, pertumbuhan juga dapat diukur melalui penghitungan berat kering total (tajuk dan akar). Dalam penelitian ini, penambahan air kelapa berpengaruh secara nyata pada biomassa biak peppermint *in vitro*, sedangkan pada biak spearmint tidak memberikan respons yang nyata walaupun menghasilkan berat kering dua kali lipat lebih tinggi daripada peppermint. Hal ini menunjukkan bahwa jenis tanaman yang berbeda menghasilkan respons yang berbeda pula walaupun dihadapkan pada kondisi lingkungan yang sama. Berat kering yang signifikan pada biak peppermint merupakan konsekuensi dari respons regenerasi yang lebih cepat yang ditandai dengan pembentukan tunas, cabang, daun dan akar yang lebih banyak dibandingkan perlakuan BAP dan kombinasi BAP dengan air kelapa.

KESIMPULAN

Biak *in vitro* peppermint dan spearmint menghasilkan respons pertumbuhan yang berbeda terhadap penambahan air kelapa dan BAP pada media tumbuh. Respons pertumbuhan biak *in vitro* peppermint terbaik pada media yang ditambah air kelapa, sementara pada biak spearmint penambahan air kelapa maupun BAP tidak memberikan pengaruh pada pertumbuhan. Air kelapa dan BAP meningkatkan kadar klorofil total daun biak peppermint maupun spearmint. Kombinasi penambahan air kelapa dan BAP secara simultan justru memberikan respons penghambatan pertumbuhan biak peppermint maupun spearmint secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

Akter, K. T., & Hoque, M. A. 2018. *In vitro* shoot regeneration of mint (*Mentha* sp. L.) using different types of explants and levels of

- benzylaminopurine. *Bangladesh J. Agril. Res.* vol. 43(4): 703–716.
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* vol 5(8): 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>.
- Astutik. 2008. Penggunaan air kelapa dalam media kultur jaringan pisang. *Journal Buana Sains.* vol. 8(1): 67–72.
- Bey, Y., Syafii, W., & Sutrisna. 2006. Pengaruh pemberian giberelin (GA3) dan air kelapa terhadap perkecambahan bahan biji anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* Bl.) secara *in vitro*. *Biogenesis.* vol. 2(2): 41–46.
- Chen, X. H., Zhang, F. Y., & Yao, L. 2012. Chloroplast DNA molecular characterization and leaf volatiles analysis of mint (*Mentha*; Lamiaceae) populations in China. *Industrial Crops and Products.* vol. 37(1): 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.011>.
- Cortleven, A., & Schmülling, T. 2015. Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany.* vol. 66(16): 4999–5013. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv132>.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines.* vol. 3(4): 1-16. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>.
- Fadel, D. 2011. Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (*Mentha spicata* L.). *The Open Horticulture Journal.* vol. 3(1): 31–35. <https://doi.org/10.2174/1874840601003010031>.
- Ghanti, K., Kaviraj, C. P., Venugopal, R. B., Jabeen, F. T. Z., & Rao, S. 2004. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. *Indian Journal of Biotechnology.* vol 3(4): 594–598.
- Heidari, F., Jahanbakhsh, S., Talebi, M., Ghobadi, C., & Shahverdi, M. A. 2012. Regeneration and *in vitro* cultivation of three Iranian *Mentha* species using meristem, node and leaf disk cultures. *International Journal of Farming and Allied Sciences.* vol. 1(2): 48–53.
- Herman, R. A., Ayepa, E., Shittu, S., Fometu, S. S., & Wang, J. 2019. Essential oils and their applications - a mini review. *Advances in Nutrition & Food Science.* vol 4(4): 1-13. <https://doi.org/10.33140/anfs.04.04.08>.
- Hwang, E., & Shin, S. 2015. The effects of aromatherapy on sleep improvement: A systematic literature review and meta-analysis. *Journal of Alternative and Complementary Medicine.* vol. 21(2): 61–68. <https://doi.org/10.1089/acm.2014.0113>.
- Islam, A. T. M. R., Islam, M. M., & Alam, M. F. 2017. Rapid *in vitro* clonal propagation of herbal spice, *Mentha piperita* L. using shoot tip and nodal explants. *Research in Plant Sciences.* vol. 5(1): 43–50. <https://doi.org/10.12691/plant-5-1-5>.
- Kalemba, D., & Synowiec, A. 2020. Agrobiological interactions of essential oils of two menthol mints: *Mentha piperita* and *Mentha arvensis*. *Molecules.* vol. 25(1): 1-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules25010059>.
- Kristina, N. N., & Syahid, S. F. 2012. Pengaruh air kelapa terhadap multiplikasi tunas *in vitro*, produksi rimpang, dan kandungan xanthorrhizol temulawak di lapangan. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri.* vol. 18(3): 125–134.
- Li, X., Niu, X., Bressan, R. A., Weller, S. C., & Hasegawa, P. M. 1999. Efficient plant regeneration of native spearmint (*Mentha spicata* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* vol. 35(4): 333–338. <https://doi.org/http://www.jstor.org/stable/4293261>.
- Łyczko, J., Piotrowski, K., Kolasa, K., Galek, R., & Szumny, A. 2020. *Mentha piperita* L. micropropagation and the potential influence of plant growth regulators on volatile organic compound composition. *Molecules.* vol. 25(11): 1-17. <https://doi.org/10.3390/molecules25112652>.
- Mahdavikia, F., & Saharkhiz, M. J. 2015. Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha × piperita* L. CV. Mitcham). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants.* 2(4): 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jarmp.2015.09.003>
- Maninggolang, A., Polii-Mandang, J. S., & Tilaar, W. 2018. Pengaruh BAP (*benzyl amino purine*) dan air kelapa terhadap pertumbuhan tunas pucuk dan kandungan sulforafan brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) secara in-vitro. *Agri-SosioEkonomi Unsrat.* vol. 14(1): 439–450.
- Marchand, L. 2014. Integrative and complementary therapies for patients with advanced cancer. *Annals of Palliative Medicine.* vol. 3(3): 160–171. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-5820.2014.07.01>.
- Mattjik, A. A., & Sumertajaya, I. M. 2013. *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab Jilid 1.* Bogor: IPB Press.
- Mehta, J., Naruka, R., Sain, M., Dwivedi, A., Sharma, D., & Mirza, J. 2012. An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L. (Peppermint). *Asian Journal of Plant Science and Research.* vol. 2(4): 518–523.
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* vol. 15: 473–497.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nasib, A., Ali, K., & Khan, S. 2008. An optimized and improved method for the *in vitro* propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. *Pakistan Journal of Botany*. 40(6): 2355–2360.
- Nazneen, F., Bukke, A. K. N., Shankar, P. C., & Reddy, A. M. 2014. Comparative studies of effect of some plant growth regulators and coconut water on callus induction in *Tinospora cordifolia* (willd)-a medicinal plant. *International Journal of Recent Scientific Research*. vol. 5(11): 2072–2077.
- Nurcahyani, E., Apriyanti, D., Wahyuningsih, S., & Mahfut, M. 2020. Analisis klorofil dan pertumbuhan eksplan kacang kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) kultivar anjasmoro secara *in vitro* dengan pemberian air kelapa (*Cocos nucifera* L.). *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*. vol. 5(2): 101–110. <https://doi.org/10.23960/aec.v5.i2.2020.p101-110>
- Ozdemir, F. A. 2017. Effects of 6-benzylaminopurine and α -naphthalene acetic acid on micropropagation from ten days old cotyledon nodes of *Mentha spicata* subsp. *spicata*. *Romanian Biotechnological Letters*. vol. 22(3): 12554–12559. https://www.rombio.eu/vol22nr3/---10_22_nr.3_2017_Ozdemir.pdf.
- Park, Y. J., Baek, S. A., Choi, Y., Kim, J. K., & Park, S. U. 2019. Metabolic profiling of nine *Mentha* species and prediction of their antioxidant properties using chemometrics. *Molecules*. vol. 24(2). <https://doi.org/10.3390/molecules24020258>.
- Poovaiah, C. R., Welter, S. C., & Jenks, M. A. 2006. *In vitro* adventitious shoot regeneration of native spearmint using internodal explants. *HortScience*. vol. 41(2): 414–417. <https://doi.org/10.21273/hortsci.41.2.414>.
- Samantaray, A., Sial, P., & Kar, M. 2012. Micropropagation and biochemical analysis of Spear Mint (*Mentha spicata*). *Indian J. Innovations Dev*. vol. 1(7): 489–493.
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. 2014. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*. vol. 79(7): R1231– R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>.
- Vaidya, B. N., Asanakunov, B., Shahin, L., Jernigan, H. L., Joshee, N., & Dhekney, S. A. 2019. Improving micropropagation of *Mentha × piperita* L. using a liquid culture system. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. vol. 55(1): 71–80. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-09952-4>.
- Wang, X., Gao, Z., Wang, Y., Bressan, R. A., Weller, S. C., & Li, X. 2009. Highly efficient *in vitro* adventitious shoot regeneration of peppermint (*Mentha x piperita* L.) using internodal explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. vol. 45(4): 435–440. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9170-x>.
- Wilson, L. 2015. Spices and Flavoring Crops: Leaf and Floral Structures. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., Vol. 9). Oxford: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00780-7>.
- Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., Cao, Z., & Ji, P. 2019. Chemical composition and antioxidant properties of essential oils from peppermint, native spearmint and scotch spearmint. *Molecules (Basel, Switzerland)*. vol. 24(15): 1-16. <https://doi.org/10.3390/molecules24152825>.