

Kultur Jaringan Tanaman

Buku 'Kultur Jaringan Tanaman' ini membahas secara ringkas dan jelas mengenai teknik kultur jaringan pada tanaman. Buku ini ditulis berdasarkan hasil penelitian serta pengalaman penulis di bidang kultur jaringan tanaman selama bertahun-tahun serta berdasarkan telaah literatur sejenis yang sudah dipublikasikan terdahulu. Buku ini mengulas secara ringkas mengenai teknik kultur jaringan tanaman, sehingga dapat digunakan sebagai bahan referensi oleh para peneliti maupun dapat dijadikan acuan oleh dosen yang mengajar dan mahasiswa yang mempelajari teknik kultur jaringan tanaman.



Penulis dilahirkan di Denpasar tahun 1962. Menyelesaikan Sekolah Dasar hingga SMA di Denpasar. Menyelesaikan S1 bidang Agronomi di Institut Pertanian Bogor pada tahun 1985. Menyelesaikan S2 di bidang hortikultura di Adelaide University, Australia pada tahun 1997 dan pendidikan S3 di Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tahun 2012 di bidang Bioteknologi Tanaman. Penulis banyak melakukan penelitian dalam bidang kultur jaringan dan rekayasa genetika khususnya

Rindang Dwiyani

Kultur Jaringan Tanaman



 **PELAWA SARI**
PERCETAKAN PENERBIT

ISBN 978-602-8409-44-5



9 786028 409445

KULTUR

JARINGAN TANAMAN

Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 19 Tahun 2002 Tentang Hak Cipta

Lingkup Hak Cipta

Pasal 2

1. Hak Cipta merupakan hak eksklusif bagi Pencipta atau Pemegang Hak Cipta untuk mengumumkan atau memperbanyak Ciptaannya, yang timbul secara otomatis setelah suatu ciptaan dilahirkan tanpa mengurangi pembatasan menurut peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Ketentuan Pidana

Pasal 72

1. Barang siapa dengan sengaja melanggar dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 Ayat (1) atau Pasal 49 Ayat (1) dan Ayat (2) dipidana dengan penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran hak cipta atau hak terbit sebagai dimaksud pada Ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

KULTUR

JARINGAN TANAMAN

RINDANG DWIYANI



**KULTUR
JARINGAN TANAMAN**

Penulis:

Rindang Dwiyani

Cover & Ilustrasi:

Repro

Diterbitkan oleh:

Pelawa Sari “Percetakan & Penerbit”
Jl. Antasura 33, Peguyangan, Denpasar Barat 80115, Bali

Cetakan Pertama:

2015, xi + 75 hlm, 15,5 x 23 cm

ISBN: 978-602-8409-44-5

Hak Cipta pada Penulis.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang :

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, Allah SWT atas selesainya penulisan buku yang berjudul ‘Kultur Jaringan Tanaman’. Buku ini ditulis berdasarkan hasil penelitian serta pengalaman penulis di bidang kultur jaringan tanaman selama bertahun-tahun serta berdasarkan telaah literatur sejenis yang sudah dipublikasikan terdahulu. Buku ini mengulas secara ringkas mengenai teknik kultur jaringan tanaman, sehingga dapat digunakan sebagai bahan referensi oleh para peneliti maupun dapat dijadikan acuan oleh dosen yang mengajar dan mahasiswa yang mempelajari teknik kultur jaringan tanaman.

Tak lupa penulis secara khusus menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Ir Cokorde Gede Alit Semarajaya, MS. atas bantuan dan supportnya dalam hal komputerisasi serta semua pihak yang sudah membantu untuk terwujudnya buku ini.

Tiada gading yang tak retak, begitulah penulis mengiaskan bahwa buku ini masih jauh dari sempurna, sehingga penulis mohon masukan dari para pembaca serta pakar terkait untuk penyempurnaan buku ini pada edisi berikutnya. Akhir kata, penulis berharap semoga isi buku ini dapat bermanfaat bagi banyak orang.

Juli 2015

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
BAB 1. PENDAHULUAN	1
A. Pengertian dan Pengenalan Beberapa Istilah	1
B. Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan	4
C. Sejarah Singkat.....	8
BAB 2. LABORATORIUM DAN PERALATAN	
KULTUR JARINGAN.....	11
A. Ruang Dalam Laboratorium Kultur Jaringan.....	11
B. Peralatan Kultur Jaringan.....	13
BAB 3. MEDIA KULTUR JARINGAN.....	21
A. Komponen Media.....	21
B. Jenis dan Pembuatan Media Kultur.....	25
BAB 4. TAHAPAN PEKERJAAN DALAM KULTUR	
JARINGAN	32
A. Isolasi Bahan Tanam (Eksplan).....	32
C. Penanaman Eksplan	34
D. Perbanyak (Proliferasi) Propagul	35
E. Pengakaran	37
F. Aklimatisasi dan Pindahan Tanaman ke Lapang.....	38

BAB 5. SISTEM REGENERASI TANAMAN PADA KULTUR JARINGAN	40
A. Embriogenesis Somatik.....	40
B. Organogenesis	42
C. Regenerasi Plantlet melalui Pembentukan Protocorm Like Bodies pada Tanaman Anggrek	44
BAB 6. TIPE KULTUR	46
A. Kultur meristem (meristem cultures)	46
B. Kultur ujung tunas (shoot-tip cultures)	48
C. Kultur embrio (Embrio cultures).....	49
D. Kultur dan fusi protoplas (Protoplast cultures and fussion)	50
E. Kultur mikrospora (microspore cultures).....	52
F. Kultur Kalus dan Kultur Suspensi (Callus Cultures and Suspension cultures)	54
G. Kultur Biji (Seed Cultures)	55
BAB 7. VARIASI SOMAKLONAL DAN PERMASALAHAN DALAM KULTUR JARINGAN.....	57
A. Variasi Somaklonal.....	57
B. Permasalahan dalam Kultur Jaringan.....	60
BAB 8. PENUTUP.....	65
DAFTAR PUSTAKA.....	67
GLOSSARIUM	70
INDEKS	74

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Perbandingan Perbanyak Tanaman secara Vegetatif Konvensional dan Mikropropagasi.....	2
Tabel 2	Sejarah singkat kultur jaringan tanaman	8
Tabel 3.	Beberapa Jenis Media dan Komponennya	26
Tabel 4.	Minimal waktu sterilisasi dengan autoklaf yang dibutuhkan media kultur.....	31
Tabel 5.	Pengaruh ukuran eksplan terhadap jumlah plantlet serta anakan bebas virus yang dihasilkan *).....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Timbangan digital.....	13
Gambar 2.	<i>Magnetic stirrer</i>	14
Gambar 3.	Autoklaf yang menggunakan daya kompor.....	15
Gambar 4.	Oven.....	16
Gambar 5.	Enkas.....	17
Gambar 6.	<i>Laminar air flow cabinet</i> yang diletakkan berjajar.....	18
Gambar 7.	Rak kultur.....	19
Gambar 8.	Media kemasan jadi MS (kiri) dan komponen MS yang dijual secara terpisah (kanan).....	31
Gambar 9.	Tanaman induk stroberi dan pengambilan bahan eksplan.....	33
Gambar 10.	Eksplan pada media setelah penanaman.....	35
Gambar 11.	Proliferasi kalus dari eksplan umbut kelapa sawit.....	36
Gambar 12.	Proliferasi tunas dari kalus yang terbentuk dari eksplan umbut kelapa sawit.....	36
Gambar 13.	Induksi akar secara in vitro pada kultur umbut kelapa sawit.....	37
Gambar 14.	Aklimatisasi bibit kelapa sawit hasil kultur.....	39
Gambar 15.	Skema Regenerasi Tanaman secara In Vitro.....	40
Gambar 16.	Tunas adventif dari eksplan irisan daun anggrek <i>V. tricolor</i> (a) serta plantlet yang dihasilkan (b).....	43
Gambar 17.	<i>Protocorm</i> anggrek <i>V. tricolor</i>	44
Gambar 18.	<i>Protorm like bodies</i> anggrek <i>P. amabilis</i> dari eksplan irisan pangkal akar.....	45

Kultur Jaringan Tanaman

Gambar 19. Dendrogram hasil analisis RAPD untuk deteksi variasi genetik hasil perbanyakan kultur in-vitro. ...	58
Gambar 20. Variasi somaklonal berupa daun ‘variegata’ pada bibit kelapa sawit yang diperbanyak secara in-vitro melalui jalur organogenesis secara tidak langsung.....	59

BAB 1

PENDAHULUAN

A. Pengertian dan Pengenalan Beberapa Istilah

Kultur jaringan tanaman adalah suatu teknik untuk menumbuhkan sel, jaringan ataupun irisan organ tanaman di laboratorium pada suatu media buatan yang mengandung nutrisi yang aseptik (steril) untuk menjadi tanaman secara utuh. Kondisi steril merupakan suatu syarat mutlak keberhasilan pelaksanaan kultur jaringan, sehingga kondisi ini harus tetap dijaga selama proses kultur berlangsung. Walaupun hanya satu spora jamur atau hanya satu sel bakteri yang masuk ke media kultur, maka pekerjaan kultur akan gagal dan tidak akan dihasilkan tanaman baru.

Kultur jaringan tanaman didasari oleh teori totipotensi sel (*cellular totipotency*) yang menyebutkan bahwa setiap sel tanaman memiliki kapasitas untuk beregenerasi membentuk tanaman secara utuh. Tanaman baru yang diperoleh dengan cara ini bersifat identik dengan induknya, dan disebut plantlet.

Jumlah tanaman baru yang dihasilkan tidak hanya satu, tapi bisa puluhan hingga ratusan (dari satu bahan tanam atau eksplan) sehingga teknik kultur jaringan digunakan sebagai metode perbanyakan tanaman. Metode perbanyakan tanaman yang dilakukan dengan teknik kultur jaringan tergolong perbanyakan vegetatif, artinya tidak melibatkan adanya fertilisasi antara sel telur dan sel kelamin jantan seperti halnya pembentukan biji pada tanaman, itu sebabnya plantlet yang dihasilkan identik dengan induknya. Perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan disebut juga mikropropagasi atau perbanyakan mikro. Kata 'mikro' mengacu pada bahan tanam awal yang digunakan yaitu eksplan yang berukuran kecil (micro=kecil), bahkan dapat mencapai ≤ 1 mm pada kultur meristem.

Kultur Jaringan Tanaman

Dibandingkan dengan perbanyakan vegetatif konvensional seperti dengan stek, cangkok, 'budding', 'layerage', dan sebagainya, mikropropagasi memiliki kelebihan dan kekurangan seperti terlihat pada Tabel 1. Jika melihat tabel tersebut, jelas terlihat bahwa mikropropagasi memiliki keunggulan dari segi bahan tanam awal yang sangat kecil namun menghasilkan anakan yang jauh lebih banyak. Dibandingkan dengan perbanyakan vegetatif konvensional, perbanyakan dengan mikropropagasi akan jauh menjadi lebih efisien untuk tanaman yang memiliki nilai ekonomi tinggi, karena biaya 'establishment' yang mahal akan tertutupi oleh harga jual tanaman yang tinggi.

Tabel 1.
Perbandingan Perbanyakan Tanaman secara Vegetatif Konvensional dan Mikropropagasi

	Perbanyakan vegetatif konvensional	Mikropropagasi
Biaya 'establishment'	Murah	Mahal
Keahlian/'Skill' pekerja	Dibutuhkan keahlian mengenai budding, grafting, okulasi, dll	Dibutuhkan keahlian bekerja secara aseptik di laboratorium
Ukuran bahan tanam awal	Besar (misalnya ukuran stek 10-20 cm)	Sangat kecil (misalnya bisa mencapai ≤ 1 mm untuk kultur meristem)
Jumlah anakan yang dihasilkan dari satu bahan tanam per satuan waktu	Hanya satu	Ratusan hingga ribuan
Sifat anakan yang dihasilkan	Identik dengan induknya	Identik dengan induknya

Kultur Jaringan Tanaman

Eksplan, merupakan istilah untuk bahan tanam awal yang digunakan dalam mikropropagasi. Eksplan dapat berupa sel (kultur sel), protoplas (kultur protoplas), epidermis, empulur (kultur jaringan), meristem apikal atau lateral (kultur meristem), tunas apikal maupun lateral (kultur tunas), serta irisan batang, daun maupun akar (kultur organ). Dengan melihat bahan tanam yang digunakan, maka istilah 'kultur in vitro' lebih tepat digunakan untuk mikropropagasi dibandingkan 'kultur jaringan' karena yang dikulturkan sangat beragam, bukan hanya jaringan. *In vitro* berasal dari bahasa Latin yang berarti 'di dalam gelas' (dalam bahasa Inggris '*in glass*'), untuk menggambarkan suatu proses biologi yang berlangsung di dalam tabung gelas atau botol kultur, di luar tubuh makhluk hidup.

Eksplan tersebut ditanam pada media tanam steril yang mengandung nutrisi. Adanya senyawa fenol pada jaringan tanaman, seringkali menyebabkan eksplan berubah warna menjadi coklat dan diakhiri dengan kematian jaringan eksplan. Warna coklat disebabkan oleh peran enzim polyfenoloksidase yang mengoksidasi senyawa fenol yang keluar dari irisan eksplan. Senyawa fenol merupakan metabolit sekunder dan tersimpan dalam vakuola sel tanamn. Ketika eksplan diiris, vakuola pecah sehingga terjadi eksudasi senyawa fenol dan teroksidasi. Istilah pencoklatan eksplan ini disebut *browning*. Efek oksidasi senyawa fenol ini juga bisa menyebabkan pencoklatan pada media kultur. Istilah pencoklatan pada media ini pada beberapa literatur disebut dengan istilah *staining*, namun kebanyakan masih menggunakan istilah *browning*.

Eksplan yang masih hijau pada media yang mengalami *browning* harus dipindah ke media baru. Pemindahan kultur ke media baru disebut dengan istilah subkultur. Ada beberapa alasan dilakukannya subkultur selain pencoklatan media, diantaranya adalah: media terkontaminasi oleh mikroorganisme, namun eksplan masih sehat; media kultur mengering; populasi kultur sudah terlalu padat; dilakukannya pengakaran (*rooting*) sehingga harus disubkultur ke 'media induksi akar'.

Eksplan yang ditanam akan membentuk bentukan baru sebelum menjadi plantlet. Bentukan baru yang terbentuk setelah eksplan ditanam pada media kultur disebut propagul. Propagul dapat berupa kalus, organ

(tunas, akar) ataupun embrio somatik. Kalus adalah kumpulan sel yang tidak terorganisir. Kalus terbentuk apabila eksplan ditanam pada media yang ditambah dengan zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk menginduksi kalus, misalnya ZPT golongan sitokinin dan auksin dengan konsentrasi yang sama atau ZPT 2,4-Dichloropenoxy acetic acid (2,4-D). Istilah dediferensiasi diberikan untuk eksplan berupa organ tanaman yang sudah terdiferensiasi seperti daun, batang, tunas, akar yang membentuk kalus. Organ tanaman tersebut yang sel-selnya sudah terdiferensiasi dikembalikan lagi menjadi tidak terdiferensiasi. Jika nanti kalus-kalus ini kembali membentuk tunas, disebut mengalami rediferensiasi.

B. Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan

Kultur jaringan dimanfaatkan untuk beberapa tujuan, diantaranya:

1. Transformasi Genetik/Rekayasa genetika

Teknik kultur jaringan kini tidak hanya digunakan sebagai teknik perbanyakan tanaman. Pekerjaan biologi molekuler seperti transformasi genetik / rekayasa genetika juga membutuhkan teknik kultur jaringan jika transfer gen dilakukan secara *in vitro*. Jadi teknologi menghasilkan tanaman transgenik secara *in vitro* mutlak membutuhkan kultur jaringan. Menumbuhkan target transformasi berupa ‘kalus’, ‘*protocorm like bodies*’ maupun ‘tunas *in vitro*’ untuk menjadi kandidat plantlet transgenik, membutuhkan keahlian kultur jaringan.

2. Memperbanyak GM (*Genetically Modified*) Plants atau yang dikenal sebagai tanaman transgenik.

Tanaman transgenik memiliki karakteristik agronomi yang spesifik sesuai dengan *gene of interest* yang disisipkan. Perbanyakan tanaman ini harus dilakukan secara vegetatif agar anakan yang dihasilkan secara genetis identik dengan induknya. Perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan akan mempercepat

Kultur Jaringan Tanaman

proses perbanyakan untuk dihasilkannya anakan yang seragam dan identik secara genetik dengan induknya.

3. Perbanyak tanaman hibrid yang memiliki sifat-sifat unggul.

Tanaman hibrid merupakan hasil persilangan antara dua tanaman yang masing-masing membawa karakter spesifik, sehingga karakter yang dimilikinya merupakan perpaduan atau kombinasi yang berasal dari dua tetua. Tanaman hibrid harus diperbanyak secara vegetatif untuk mempertahankan sifat unggul yang dimilikinya. Kultur jaringan merupakan metode perbanyakan vegetatif sehingga sangat tepat digunakan untuk perbanyakan tanaman hibrid.

4. Memperbanyak tanaman yang tidak memiliki biji

Tanaman tanpa biji seperti pisang harus diperbanyak secara vegetatif. Secara vegetatif konvensional pisang diperbanyak melalui anakan dan atau mata bonggol. Namun perbanyakan tanaman pisang dengan teknik kultur jaringan sudah umum dilakukan oleh pelaku agribisnis untuk komoditi pisang secara komersial. Selain diperoleh bibit dalam jumlah banyak dengan waktu yang relatif singkat, juga diperoleh bibit yang seragam dan sehat. Di Malaysia misalnya, agribisnis pisang mas dilakukan secara besar-besaran dengan bibit pisang yang diperoleh melalui kultur jaringan. Buah pisang ini diekspor ke negara tetangga seperti Singapura, Hongkong dan Indonesia.

5. Mempermudah pengiriman tanaman dalam *container* steril

Pengiriman tanaman jarak jauh dapat dipermudah jika tanaman yang dikirim tersebut berukuran relatif kecil serta bebas patogen. Bebas patogen diperlukan untuk mengatasi masalah karantina yang biasanya disyaratkan oleh negara tujuan. Ukuran tanaman yang relatif kecil serta kondisi steril hanya dimungkinkan jika tanaman tersebut dihasilkan melalui kultur jaringan.

6. Memperbanyak tanaman yang bijinya sulit berkecambah (Anggrek, Nepenthes)

Tanaman anggrek dan Nepenthes adalah jenis tanaman yang memiliki biji yang sulit berkecambah pada kondisi normal pada media tanah sebagaimana umumnya jenis tanaman angiospermae (tumbuhan berbiji) lainnya. Jenis tanaman ini memiliki biji sangat kecil, tanpa cadangan makanan (atau walaupun ada, sangat sedikit), sehingga biji tersebut membutuhkan cadangan makanan dari luar (eksternal) untuk berkecambah. Pada penanaman secara *in vitro* di laboratorium, biji-biji jenis tanaman ini ditanam pada media steril yang mengandung nutrisi dan sukrosa, yang digunakan oleh embrio biji untuk tumbuh dan berkecambah. Selain tidak tersedianya cadangan makanan eksternal, penanaman secara normal pada media tanah dapat menyebabkan biji-biji anggrek yang sangat kecil tersebut dimakan serangga seperti semut atau hanyut oleh siraman air.

7. Menghasilkan tanaman bebas virus dari kultur meristem

Meristem adalah bagian tanaman yang sel-selnya bersifat meristematik (aktif membelah). Meristem terletak di ujung tunas (apikal maupun aksilar) dan ujung akar. Jaringan pembuluh (xylem dan phloem) belum berkembang pada meristem dan virus umumnya ada pada jaringan pembuluh, sehingga meristem menjadi bebas virus. Kultur meristem yang menghasilkan tanaman bebas virus pertama diperkenalkan oleh George Morrell pada tahun 1960 an. Morrell kala itu mendapatkan anakan yang bebas virus dari kultur anggrek *Cymbidium* yang terserang virus. Hingga kini kultur meristem banyak dipergunakan untuk memperbanyak tanaman secara komersial.

8. Fusi Protoplas

Tujuan dari fusi protoplas adalah untuk menyilangkan (*crossing*) tanaman yang dilakukan secara *in vitro*. Yang pertama dilakukan adalah membuat kultur sel (dari organ dengan sel-sel somatik) dari

Kultur Jaringan Tanaman

tanaman yang akan disilangkan tersebut. Selanjutnya dilakukan isolasi protoplas yaitu dengan jalan mendegradasi dinding sel dengan enzim selulase dan pektinase sehingga yang tersisa hanya protoplasnya (sel tanpa dinding sel). Kemudian dilakukan kultur protoplas dan selanjutnya dilakukan fusi (peleburan) antara dua tipe protoplas tersebut secara *in vitro*. Hasil peleburan tersebut kemudian ditumbuhkan untuk jadi tanaman. Tanaman hasil perbanyakan melalui fusi protoplas ini akan membawa sifat-sifat yang diturunkan dari dua tanaman yang berbeda.

9. *Embryo Rescue*

Beberapa spesies tanaman embrionya tidak berkembang setelah terjadinya fertilisasi. Untuk kasus seperti ini maka dilakukan kultur embrio. Penyelamatan embrio melalui kultur embrio ini disebut *embryo rescue*. Misalnya para *breeder* (pemulia tanaman) jeruk keprok di Balai Penelitian Hortikultura di Indonesia melakukan kultur embrio setelah melakukan persilangan jeruk secara konvensional. Hal ini disebabkan oleh gugurnya bunga setelah fertilisasi terjadi sehingga para pemulia jeruk melakukan kultur embrio setelah melakukan persilangan buatan.

10. Menghasilkan tanaman *double haploid* melalui kultur mikrospora

Dihasilkannya tanaman *double haploid* yang homozigot melalui kultur mikrospora atau kultur anther memiliki arti yang sangat penting bagi bidang pemuliaan tanaman karena cara ini dapat mempersingkat waktu yang dibutuhkan pemulia tanaman secara konvensional.

C. Sejarah Singkat

Sejarah singkat perkembangan kultur jaringan tanaman secara kronologis dapat diringkas seperti pada Tabel 2:

Tabel 2.
Sejarah singkat kultur jaringan tanaman

Tahun	Tokoh/Peneliti	Kontribusi
1902	C.Haberlant	Orang pertama yang mengkulturkan sel tanaman secara in vitro pada medium buatan
1922	WJ Robbins dan W. Kotte	Kultur akar dalam jangka pendek (kultur organ)
1934	P R White	Demonstrasi kultur akar tomat
1939	R J Gautheret dan P Nobecourt	Pengkulturan kalus pertama dan dalam jangka waktu relatif lama menggunakan eksplan dari jaringan empulur pada wortel
1939	P R White	Kultur kalus dari jaringan tumor pada tembakau hibrid hasil persilangan antar spesies of <i>Nicotina glaucum X N.longsdorffi</i>
1941	J Van Overbeek	Penemuan penggunaan air kelapa untuk kultur embrio pada wortel.
1942	P R White dan A C Braun	Penelitian pada crown gall dan pembentukan tumor pada tanaman dan menumbuhkan jaringan tanaman yang bebas tumor.
1948	A Caplan dan F C Stewart	Penggunaan santan kelapa ditambah 2,4-D untuk proliferasi pada kultur jaringan wortel dan kentang.
1950	G Morel	Kultur jaringan tanaman monokotil menggunakan santan kelapa.

Kultur Jaringan Tanaman

1953	W H Muir	Penemuan teknik kultur sel dengan melakukan kultur sel yang berasal dari kalus .
1953	W Tulecke	Kultur haploid dari polen tanaman Gymnospermae (tumbuhan berbiji terbuka)
1955	C O Miller, F Skoog dan kawan-kawan	Penemuan sitokinin,yaitu Kinetin dan menemukan faktor-faktor yang menyebabkan pembelahan sel.
1955	E bal	Kultur jaringan tanaman Gimnospermae .
1957	F Skoog dan C O Miller	Hipotesis yang menyebutkan bahwa pembentukan akar atau tunas dari kultur kalus diregulasi oleh proporsi atau rasio auksin dan sitokinin dalam medium.
1960	E C Cocking	Isolasi protoplas menggunakan enzim serta kultur protoplas.
1960	G Morel	Pengembangan teknik kultur tunas apikal.
1964	G Morel	Morel mengembangkan teknik kultur meristem dan mendapatkan anakan tanaman anggrek yang bebas virus dari induk tanaman yang terjangkit virus.
1966	S G Guha and S C Maheshwari	Kultur anter dan kultur polen dan mendapatkan embrio haploid.
1974	J P Nitsch	Kultur mikrospora dari tanaman Datura dan Nicotiana untuk menggandakan jumlah kromosom dan panen biji dari tanaman <i>double haploid</i> yang homozigot dalam waktu 5 bulan.

Kultur Jaringan Tanaman

1978	G Melchers	Fusi protoplas untuk mendapatkan hibrid somatik
1983	K A Barton , W J Brill dan J H Dodds Bengochea	Inseri gen dengan menggunakan vector plasmid menggunakan target transformasi berupa protoplas tanaman.
1983	M D Chilton	Transformasi gen pada individu sel tanaman tembakau serta produksi tanaman tembakau transgenik.

Sumber : AgriInfo (2011)

BAB 2

LABORATORIUM DAN PERALATAN KULTUR JARINGAN

A. Ruang Dalam Laboratorium Kultur Jaringan

Laboratorium kultur jaringan minimal memiliki empat ruang, yakni dapur, ruang preparasi, ruang tanam dan ruang kultur (ruang inkubasi).

1. Dapur

Merupakan tempat pencucian alat-alat sebelum disterilisasi. Di dapur terdapat tempat pencucian (shink) dengan kran, bak sampah serta rak tempat menaruh alat-alat setelah dicuci.

2. Ruang preparasi

Merupakan tempat pembuatan media. Pada ruangan ini diletakkan rak yang berisi zat kimia, timbangan, *magnetic stirrer*, kulkas (tempat zat kimia yang harus disimpan pada suhu dingin, seperti zat pengatur tumbuh, media kemasan, vitamin, dan lain-lain) serta meja untuk melakukan pekerjaan pembuatan media. Jika autoklaf yang digunakan untuk sterilisasi memakai daya listrik, maka alat ini juga diletakkan di ruang preparasi. Namun jika autoklaf yang digunakan adalah jenis yang memakai kompor, maka sebaiknya diletakkan di dapur dan tidak di ruangan preparasi. Ruang preparasi harus dijauhkan dari nyala api karena terdapat banyak bahan kimia. Selain menghindarkan bahaya kebakaran karena adanya bahan kimia yang mudah terbakar, tetapi juga agar terhindar dari suhu tinggi yang mungkin dapat merusak bahan kimia yang ada di ruangan tersebut. Meja yang ada di ruang preparasi juga digunakan untuk melakukan preparasi eksplan sebelum dibawa ke ruang tanam.

3. Ruang tanam

Ruang tanam merupakan ruang untuk menanam kultur. Ruangan ini harus dijaga sterilitasnya agar pekerjaan kultur dapat terhindar dari kontaminasi dan berjalan dengan sukses. Untuk alasan sterilitas ini, ruang tanam juga dilengkapi dengan lampu pembunuh mikroorganisme. Lampu ini dinyalakan 30 menit sebelum pekerjaan dimulai dan dimatikan ketika sudah mulai menanam. Pada laboratorium kultur yang lebih modern, sebelum memasuki ruang tanam, setiap orang harus disterilisasi dengan memasuki ruang pembersih yang dilengkapi dengan sprayer otomatis yang menyemprotkan *safety disinfectant* ke tubuh orang. Di dalam ruang kultur terdapat meja kerja steril. Meja kerja steril ini dapat berupa enkas yaitu meja kerja yang sangat sederhana dan tidak menggunakan daya listrik atau yang lebih modern dan menggunakan daya listrik yaitu *laminar air flow cabinet*. Laminar ini banyak ragamnya dan akan dibahas secara lebih detail pada sub bab peralatan. Ruang tanam sebaiknya dilengkapi dengan pendingin (AC) untuk memberikan kenyamanan pada pekerja kultur.

4. Ruang kultur (inkubasi)

Ruang kultur merupakan ruang untuk meletakkan dan menumbuhkan hasil kultur yang kita tanam. Ruangan ini dilengkapi dengan pendingin yang bisa diatur suhunya. Umumnya suhu yang dibutuhkan berkisar 20-24°C karena morfogenesis dalam kultur umumnya terjadi pada kisaran suhu tersebut. Di dalam ruang kultur diletakkan rak-rak kultur yang digunakan untuk menaruh kultur. Ruang ini juga harus dijaga sterilitasnya untuk menghindarkan kultur dari kontaminan. Sterilitas dijaga dengan jalan menyemprotkan desinfectan secara berkala serta membersihkan ruangan serta menyingkirkan kultur yang sudah terkontaminasi. Kultur yang sudah terkontaminasi ini akan menjadi sumber kontaminan untuk kultur yang sehat.

B. Peralatan Kultur Jaringan

Berikut akan dibahas berapa peralatan penting yang umumnya digunakan dalam kultur jaringan. Peralatan ini meliputi:

1. Timbangan digital

Timbangan (*balance*) digital beragam jenisnya, gunanya secara umum adalah untuk menghitung satuan massa suatu benda dengan teknik digital. Dalam lab kultur, alat ini digunakan untuk menimbang bahan/zat yang digunakan dalam kultur, misalnya zat pengatur tumbuh, bahan untuk media, gula, agar, dan lain sebagainya. Berikut adalah contoh dari timbangan yang digunakan dalam kultur jaringan. Yang pertama adalah timbangan analitik dengan kapasitas timbang 210 g dan kemampuan baca hingga 4 digit di belakang koma atau 0,0001g (Gambar 1 a). Yang kedua adalah timbangan dengan kapasitas timbang 610 g dan kemampuan baca hingga 2 digit di belakang koma atau 0,01g (Gambar 1 b). Sebelum menimbang bahan, kita harus mengetahui kapasitas timbang dari suatu timbangan. Pilihan jenis timbangan yang akan digunakan disesuaikan dengan berat bahan yang akan ditimbang dan kapasitas timbangan.



a= kapasitas timbang 210g;



b=kapasitas timbang 610g

Gambar 1. Timbangan digital
(Dok. pribadi)

Secara umum, cara penggunaan timbangan adalah sebagai berikut. Timbangan dihubungkan dengan stop kontak listrik (*plug-in*), kemudian tekan tombol “on/off” untuk mengaktifkan. Sebelum digunakan timbangan dinolkan terlebih dahulu. Setelah alas timbang (untuk menaruh bahan yang akan ditimbang) diletakkan pada timbangan, timbangan kembali dinolkan. Kemudian bahan yang akan ditimbang ditaruh pada alas timbang yang sudah disiapkan. Selanjutnya, berat benda yang ditimbang akan terbaca pada layar. Setelah pekerjaan penimbangan selesai, timbangan harus dibersihkan, dinolkan dan stop kontak harus dicabut.

2. *Magnetic stirrer*

Magnetic stirrer digunakan untuk proses pembuatan media serta pembuatan larutan dari senyawa yang berbentuk padat. *Magnetic stirrer* memiliki dua fungsi yaitu untuk pemanasan (*heating*) dan pengadukan (*stirring*) (Gambar 2). Dengan fungsi tersebut maka alat ini dilengkapi dengan dua tombol putar, yakni tombol “stirrer” (pengaduk) dan tombol “heat” (untuk pemanasan). Alat ini dilengkapi dengan magnet sebagai pengaduk.



Gambar 2. *Magnetic stirrer*
(Dok. pribadi)

3. Autoklaf

Autoklaf adalah alat untuk sterilisasi dengan metode uap panas (*steam heating*). Ada dua jenis jika dilihat dari daya yang digunakan. Yang pertama adalah autoklaf yang menggunakan kompor (Gambar 3) dan yang kedua adalah autoklaf yang menggunakan daya listrik. Keduanya memiliki cara kerja yang sama dalam proses sterilisasi.



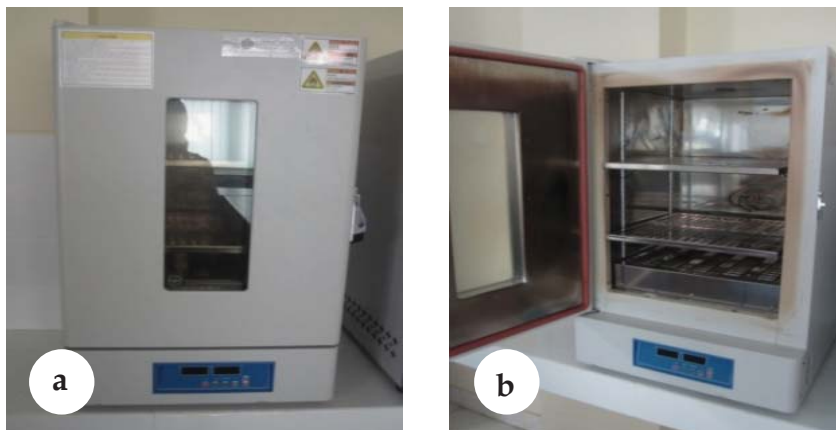
Gambar 3. Autoklaf yang menggunakan daya kompor
(Dok. pribadi)

Autoklaf dilengkapi dengan “sarangan” seperti pada dandang untuk mengukus. Pada sarangan ini diletakkan benda yang akan disteril. Sementara pada dandang (dibawah sarangan) diisi dengan air untuk menghasilkan uap, mirip seperti dandang pengukus. Setelah benda yang akan disterilisasi dimasukkan, autoklaf ditutup dengan jalan memutar ‘skrup’ hingga benar-benar kencang, sementara itu katup uap dibiarkan tetap terbuka. Setelah itu autoklaf diletakkan di atas kompor (untuk yang menggunakan daya kompor) dan dihubungkan stop kontak (yang menggunakan daya listrik). Katup uap ditutup jika sudah mengeluarkan uap agar suhu dan tekanan naik. Perlahan suhu dan tekanan akan naik. Jika sudah mencapai tekanan 17,5 Psi atau suhu 121°C, kompor harus segera dikecilkan. Kemudian suhu ini dijaga selama waktu yang dibutuhkan untuk sterilisasi. Misalnya untuk sterilisasi media selama

20-30 menit, peralatan kecil dan *glasswares* selama 1 jam. Untuk jenis autoklaf listrik, naiknya suhu sangat lambat dan tekanan 17,5 Psi dicapai dalam waktu yang lebih lama. Namun kemudian stabil dalam tekanan ini tanpa harus mencabut stop kontak seperti halnya mengecilkan kompor pada autoklaf kompor. Pada autoklaf daya listrik, besaran suhu akan berjalan secara otomatis sesuai pengaturan suhu yang kita lakukan. Autoklaf kompor lebih murah harganya dan lebih umum digunakan.

4. Oven

Sterilisasi juga bisa dilakukan dengan oven, namun hanya bisa untuk alat-alat kecil dan *glasswares* dan tidak bisa untuk sterilisasi media. Di dalam laboratorium, oven diletakkan di ruang preparasi. Metode sterilisasi dengan oven dikenal dengan *dry heating*, karena proses sterilisasi menggunakan udara kering yang panas. Ada banyak ragam oven, namun satu diantaranya dapat dilihat pada Gambar 4. Oven ini menggunakan daya listrik, dilengkapi dengan pengatur suhu dan waktu, sehingga proses sterilisasi bisa dilakukan dengan menekan tombol sesuai dengan kebutuhan. Angka yang menunjukkan suhu dan waktu pengovenan akan terbaca secara digital.



a= bagian luar ; b= bagian dalam

Gambar 4. Oven
(Dok. pribadi)

5. Meja Kerja (Enkas, laminar)

Meja kerja dalam kultur jaringan disebut juga meja tanam, adalah tempat yang digunakan untuk menanam. Meja kerja yang sederhana disebut enkas (Gambar 5). Enkas tidak menggunakan daya listrik. Di bagian depan terdapat dua lubang yang digunakan untuk memasukkan tangan penggunanya. Bagian dalam enkas dijaga sterilisasinya dengan jalan menyemprotnya dengan alkohol atau spiritus. Demikian pula alat/bahan yang akan digunakan serta tangan penggunanya juga disemprot dengan alkohol. Meja kerja lainnya adalah laminar air flow cabinet (LAFC) (Gambar 6). LAFC lebih modern dari enkas, menggunakan daya listrik dan dilengkapi dengan lampu ultra violet (UV) yang berguna untuk membunuh mikroorganisme serta lampu neon sebagai penerang. Lampu UV ini dinyalakan 30 menit sebelum LAFC digunakan dan dimatikan segera saat LAFC mulai digunakan. Prinsip kerja LAFC adalah dengan hembusan udara (*air flow*) yang steril. Pertama udara dari luar disaring oleh filter pertama yang letaknya umumnya di bagian atas laminar. Udara ini selanjutnya memasuki sistem filter yang kedua dalam laminar dan menjadi steril. Udara steril ini akhirnya dihembuskan pada areal meja kerja ke arah luar laminar, sehingga jika ada mikroorganisme yang masuk dari arah luar secara otomatis akan terhembus ke luar laminar.



Gambar 5. Enkas
(Dok. pribadi)



Gambar 6. *Laminar air flow cabinet* yang diletakkan berjajar
(Dok. pribadi)

Sama halnya seperti enkas, sebelum dan sesudah bekerja, laminar harus disemprot dengan alkohol. Semua benda yang akan dimasukkan ke dalam laminar, termasuk tangan pengguna juga disemprot dengan alkohol. Prinsip kerja steril merupakan syarat mutlak dalam pekerjaan kultur jaringan.

6. Rak kultur

Rak kultur merupakan tempat untuk meletakkan eksplan setelah ditanam pada media steril dan menumbuhkannya hingga menjadi plantlet. Rak kultur diletakkan dalam ruang kultur atau ruang inkubasi. Semua proses morfogenesis hingga terbentuknya plantlet berlangsung di ruang kultur pada rak kultur (Gambar 7).



Gambar 7. Rak kultur
(Dok. pribadi)

7. *Glasswares* dan Peralatan kecil lainnya

Glasswares adalah semua peralatan kecil yang terbuat dari bahan gelas seperti gelas ukur, gelas dan labu Erlenmeyer, serta botol kultur. Alat-alat ini dapat disterilisasi dengan oven maupun dengan autoklaf. Alat-alat ini harus dibungkus dengan kertas saat sterilisasi agar kondisi steril tetap terjaga sampai alat tersebut digunakan. Botol-botol bekas seperti botol selai, botol minuman dan botol infus yang terbuat dari bahan gelas dapat digunakan untuk botol kultur.

Peralatan kecil lainnya terdiri dari *dissecting kit* (perataan untuk memotong/mengiris), pinset, spatula dan lain-lain yang umumnya terbuat dari bahan logam (*stainless steel*). Spatula merupakan pengaduk atau digunakan untuk mengambil bahan berupa serbuk. Pinset digunakan untuk memegang / menjepit benda, umumnya digunakan pada saat penanaman eksplan. Scalpel adalah gagang pisau yang dalam penggunaannya berpasangan dengan *blade* (pisau). Gunanya adalah untuk mengiris/memotong, dalam hal ini bahan eksplan yang akan

Kultur Jaringan Tanaman

ditanam. Bagian pisau dijual secara terpisah dari scalpel (gagang) nya dan sudah dalam keadaan steril dan bersifat sekali pakai. Peralatan kecil dari bahan logam ini juga harus dibungkus dengan kertas saat sterilisasi. Sterilisasi dapat dilakukan dengan oven maupun dengan autoklaf.

BAB 3

MEDIA KULTUR JARINGAN

A. Komponen Media

Eksplan (berupa sel, jaringan atau irisan organ) yang ditumbuhkan secara *in vitro* pada media buatan, juga membutuhkan hara untuk terjadinya morfogenesis dan pertumbuhan. Secara umum media buatan tersebut mengandung komponen sebagai berikut (George & Sherington, 1984; Saad & Elshahed, 2012):

- **Hara makro (*macro nutrient*).**

Hara makro adalah unsur hara esensial yang dibutuhkan dalam jumlah banyak oleh tanaman, yaitu nitrogen (N), posfor (P), kalium (K), kalsium (Ca), magnesium (Mg), dan sulfur (S). **N** merupakan komponen dalam pembentukan protein dan asam amino dalam tubuh tanaman, juga merupakan elemen pada beberapa koenzim. **P** merupakan komponen pembentukan asam nukleat (DNA dan RNA) serta dibutuhkan sebagai sumber energi transfer. **K** dibutuhkan untuk mengatur potensial osmotik sel tanaman. **Ca** untuk sintesis dinding sel, fungsi membran dan berperan dalam aktifnya signal sel. **Mg** merupakan kofaktor enzim dan komponen klorofil. **S** adalah komponen beberapa asam amino dan beberapa kofaktor enzim.

- **Hara mikro (*micro nutrient*).**

Hara mikro adalah unsur hara esensial yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit oleh tanaman, yaitu ferum/zat besi(Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), cobalt (Co), copper (Cu) dan molybdenum (Mo). **Fe** merupakan komponen cytochrome yang berperan dalam

transfer electron. **Mn** adalah kofaktor enzim, **Zn** berperan dalam sintesis klorofil dan juga merupakan kofaktor enzim. **Co** adalah komponen beberapa vitamin. **Cu** merupakan kofaktor enzim dan berperan dalam reaksi transfer elektron. **Mo** juga merupakan kofaktor enzim dan komponen dari enzim nitrate reductase. Baik hara makro maupun hara mikro, keduanya diberikan dalam bentuk garam inorganik.

- **Gula**

Jenis gula yang umum digunakan dalam kultur in vitro adalah sukrosa, jumlahnya berkisar 2-3 % atau 20-30 gram/liter media. Selain sukrosa, beberapa jenis gula lainnya adalah laktosa, galaktosa, maltosa, glukosa dan fruktosa. Gula diberikan pada media kultur sebagai sumber karbohidrat untuk respirasi karena tanaman kultur bersifat heterotroph, tidak dapat melakukan fotosintesis untuk menghasilkan karbohidrat. Respirasi menghasilkan energi yang digunakan oleh sel tanaman untuk melakukan pembelahan sel. Dengan demikian gula ditambahkan pada media kultur sebagai sumber energi.

- **Vitamin**

Vitamin dibutuhkan tanaman sebagai katalisator dalam berbagai proses metabolisme. Vitamin digunakan untuk pertumbuhan sel serta proses diferensiasi sel dan jaringan yang ditanam secara in vitro. Beberapa jenis vitamin yang digunakan dalam kultur in vitro adalah thiamin, nicotinic acid dan pyridoxine. Diantara ketiganya, yang bersifat esensial adalah thiamin (vitamin B1) yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel tanaman. Nicotinic acid dan pyridoxine (vitamin B6) dibutuhkan hanya oleh spesies tanaman tertentu. Ada beberapa jenis vitamin lainnya yang digunakan dalam kultur in vitro namun bersifat tidak umum atau spesifik hanya untuk kultur tertentu, yakni biotin, folic acid, ascorbic acid, pantothenic acid, tocopherol (vitamin E), riboflavin, dan p-amino-benzoic acid.

- **Myo-inositol**
Myo-inositol adalah senyawa golongan karbohidrat yang ditambahkan pada media kultur dalam jumlah sedikit untuk menstimulasi pertumbuhan sel pada banyak spesies tanaman. Meskipun bukan tergolong vitamin, namun senyawa ini akan terpecah menjadi vitamin C dan pectin. Myo-inositol memiliki peran dalam pembelahan sel, digunakan dalam konsentrasi berkisar 50-5000 ppm. Pada kultur kalus tembakau, dibuktikan bahwa hanya thiamin (dari kelompok vitamin) dan myo-inositol yang dibutuhkan untuk pertumbuhan optimal kalus tembakau.

- **Zat pengatur tumbuh.**
Umumnya ada dua golongan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan dalam kultur in-vitro, yakni golongan auksin dan sitokinin. ZPT golongan auksin yang biasa digunakan dalam kultur in-vitro adalah: indole-3- acetic acid (IAA), indole-3-butiricacide (IBA), 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) dan naphthalene- acetic acid (NAA). ZPT dari golongan sitokinin adalah: BA (Benzyladenine), BAP (6-benzyloaminopurine), 2-iP (isopentenyl adenine), kinetin (6-furfurylaminopurine), Zeatin (6-4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylaminopurine) dan TDZ (thidiazuron). Rasio kedua golongan ZPT ini akan mempengaruhi arah morfogenesis yang terjadi pada kultur. Rasio auksin yang lebih tinggi dari sitokinin akan menstimulasi terbentuknya akar, sedangkan rasio sitokinin yang lebih tinggi dari auksin akan menginduksi terbentuknya tunas. Jika auksin dan sitokinin pada konsentrasi yang sama (rasio 1) maka akan terbentuk kalus. Untuk pembentukan kalus juga dapat digunakan 2,4-D. Ada beberapa jenis ZPT lainnya yang digunakan dalam kultur in vitro. ZPT tersebut yaitu gibberellin (GA3) untuk pembentukan tunas pada spesies tertentu, dan asam absisik (ABA) untuk pematangan embrio pada proses embriogenesis somatik. Dalam proses pembuatan larutan stok ZPT, untuk IAA, 2,4-D dan NAA dapat dilarutkan awal dengan beberapa tetes alkohol 95% atau NaOH

1N, sedangkan untuk golongan sitokinin umumnya digunakan beberapa tetes HCL 1N atau dimethylsulfoxide (DMSO). Jika bahan sudah terlarut oleh pelarut awal, maka baru kemudian ditambah DD water (*Double distilled water*) untuk mencapai volume yang diinginkan. Penggunaan pelarut awal ini diperlukan untuk menghindari terjadinya penggumpalan akibat tidak larutnya ZPT tersebut.

- **Pemadat media**

Penambahan senyawa pematik bertujuan untuk membuat media menjadi padat maupun semi padat. Pematik tersebut dapat berupa agar, agarose atau gellan gum. *Agar* dan *agarose* digunakan dalam konsentrasi 0.7-1.0% (7-10 gram per-liter media), sedangkan gellan gum 0.2-0.6% (2-6 gram per-liter media). Gellan gum dijual dengan nama dagang Gellrite, Phytigel dan Kelcogel. Media kultur sebaiknya tidak terlalu padat agar penyerapan nutrisi dapat berjalan baik. Demikian pula pada perkecambahan biji secara in-vitro, diperlukan media semi padat untuk mempermudah terjadinya perkecambahan.

- **Asam amino**

Asam amino tidak selalu harus ditambahkan pada media kultur, namun diperlukan untuk kultur sel dan kultur protoplas. Penggunaannya secara tunggal atau campuran dari beberapa asam amino. Asam amino menyediakan sumber nitrogen untuk pertumbuhan sel. Senyawa nitrogen ini lebih mudah diserap oleh sel tanaman dibandingkan sumber nitrogen dari garam inorganik. Asam amino yang biasa digunakan adalah casein hydrolysate, L-glutamine, L-asparagine, adenine, glycine, glutamine, asparagine, L-arginine, cysteine dan L-tyrosine.

- **Senyawa organik alami**

Senyawa organik alami seperti air kelapa, santan kelapa, jus/ekstrak tomat, ekstrak pisang, ekstrak kentang dan lain

sebagainya seringkali ditambahkan pada media kultur untuk menstimulasi pertumbuhan sel/jaringan kultur. Kebutuhan akan jenis dan jumlahnya tergantung spesies tanamannya. Misalnya, untuk menstimulasi perkecambahan biji anggrek *Vanda tricolor* dari Bali dibutuhkan 100-200 gram ekstrak tomat per-liter media, sedangkan anggrek *Phalaenopsis amabilis* membutuhkan 100 gram ekstrak tomat yang dicampur dengan 150 ml air kelapa (per-liter media) untuk menstimulasi perkecambahan bijinya. Selain itu, penambahan arang aktif/*active charcoal* kadang-kadang juga digunakan dalam kultur in vitro untuk tujuan tertentu, misalnya untuk mengatasi *browning* (pencoklatan) pada kultur organ tanaman yang banyak mengandung senyawa fenol. Arang aktif juga ditambahkan pada media kultur untuk merangsang perakaran, karena perakaran tumbuh lebih baik pada media yang berwarna gelap.

B. Jenis dan Pembuatan Media Kultur

Beberapa jenis media yang digunakan untuk kultur in vitro beserta komponennya dapat dilihat pada Tabel 3. Media tersebut (yang tercantum pada Tabel 3) ada yang dijual dalam 'kemasan jadi' sehingga pengguna hanya menimbang media dengan jumlah tertentu yang sudah tertera pada label media, kemudian menambahkan komponen lain seperti gula, pematat atau senyawa lain yang diperlukan. Komponen media dasar tersebut pada Tabel 3 juga dijual secara terpisah, sehingga pembuatannya melalui proses pencampuran komponen. Preparasi media dilakukan dengan pembuatan larutan stok terlebih dahulu. Tujuannya adalah untuk menghindarkan penimbangan banyak komponen secara berulang jika pembuatan media dilakukan berkali-kali. Selain itu, untuk mempermudah penimbangan hara mikro yang dibutuhkan dalam jumlah sangat sedikit. Berikut dijelaskan bagaimana pembuatan larutan stok dibuat untuk media dasar MS serta berapa volume yang harus dipipet untuk pembuatan 1 liter media MS. Cara pembuatan 500 ml larutan stok adalah sebagai berikut: tuang air destilasi sebanyak kurang lebih 200 ml

Kultur Jaringan Tanaman

ke dalam gelas beker ukuran 1000 ml. Timbang dan masukkan secara berurutan komponen satu persatu sambil dilakukan pengadukan dengan stirrer pada magnetic stirrer.

Tabel 3
Beberapa Jenis Media dan Komponennya

Komponen media (mg/liter)	Jenis Media				
	MS	G ₅	W	VW	NN
Hara makro:					
Ca ₃ (PO ₄) ₂				200.0	
NH ₄ NO ₃	1650.0				720.0
KNO ₃	1900.0	2500.0	80.0	525.0	950.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.0	150.0			166.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.0	250.0	720.0	250.0	185.0
KH ₂ PO ₄	170.0			250.0	68.0
(NH ₄) ₂ SO ₄		134.0		500.0	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		150.0	16.5		
CaNO ₃ .4H ₂ O			300.0		
Na ₂ SO ₄			200.0		
KCl			65.0		
K ₂ SO ₄					
Hara mikro:					
KI	0.83	0.75	0.75		
H ₃ BO ₃	6.20	3.0	1.5		10.0
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30		7.0	0.75	25.0
MnSO ₄ .H ₂ O		10.0			
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2.0	2.6		10.0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25			0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025			0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025			
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O					

Kultur Jaringan Tanaman

Na ₂ EDTA	37.3	37.3			37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8			27.8
MnCl ₂					
Fe(C ₄ H ₄ O ₆) ₃ .2H ₂ O				28.0	
Vitamin dan suplemen lainnya:					
Inositol	100.0	100.0			100.0
Glycine	2.0	2.0	3.0		2.0
Thiamine HCl	0.1	10.0	0.1		0.5
Pyridoxine HCl	0.5		0.1		0.5
Nicotinic acid	0.5		0.5		5.0
Ca-panthothenate			1.0		
Cysteine HCl			1.0		
Riboflavin					
Biotin					0.05
Folic acid					0.5

Keterangan:MS=Murashige & Skoog; G5=Gamborg; W=White; VW=Vacin & Went; Nitsch& Nitsch (Sumber : Saad & Elshahed, 2012).

Jika semua komponen sudah larut, terakhir ditambahkan air destilasi hingga volume mencapai 500 ml. Sebaiknya digunakan air destilasi steril untuk pembuatan larutan stok. Tujuannya adalah untuk memperkecil resiko kontaminasi. Selanjutnya larutan stok yang sudah homogen ini disimpan pada suhu 4 °C. Larutan stok Fe-EDTA disimpan dalam keadaan kedap cahaya dengan jalan membungkus botol dengan aluminium foil karena cahaya dapat merusak Fe.

Kultur Jaringan Tanaman

500 ml larutan stok hara makro (Stok A)

Komponen	Kebutuhan untuk 1 liter media (mg)	Stok 100 x konsentrasi (mg)	Stok 50 x konsentrasi (mg)
NH_4NO_3	1650	165000	82500
KNO_3	1900	190000	95000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	37000	18500
KH_2PO_4	170	17000	8500
Volume stok yang harus dipipet untuk 1 liter media		5 ml	10 ml

500 ml larutan stok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Stok B)

Komponen	Kebutuhan untuk 1 liter media (mg)	Stok 100 x konsentrasi (mg)	Stok 50 x konsentrasi (mg)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.0	44000	22000
Volume stok yang harus dipipet untuk 1 liter media		5 ml	10 ml

500 ml stok hara mikro (Stok C)

Komponen	Kebutuhan untuk 1 liter media (mg)	Stok 100 x konsentrasi (mg)	Stok 50 x konsentrasi (mg)
KI	0.83	83	41.5
H_3BO_3	6.20	620	310
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	2230	1115
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	860	430
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	25	12.5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	2.5	1.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	2.5	1.25
Volume stok yang harus dipipet untuk 1 liter media		5 ml	10 ml

Kultur Jaringan Tanaman

500 ml larutan stok Fe-EDTA (Stok D)

Komponen	Kebutuhan untuk 1 liter media (mg)	Stok 100 x konsentrasi (mg)	Stok 50 x konsentrasi (mg)
Na ₂ EDTA	37.3	3730	1865
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	2780	1390
Volume stok yang harus dipipet untuk 1 liter media		5 ml	10 ml

500 ml larutan stok vitamin (Stok E)

Komponen	Kebutuhan untuk 1 liter media (mg)	Stok 100 x konsentrasi (mg)	Stok 50 x konsentrasi (mg)
Inositol	100.0	10000	5000
Glycine	2.0	200	100
Thiamine HCl	0.1	10	5
Pyridoxine HCl	0.5	50	25
Nicotinic acid	0.5	50	25
Volume stok yang harus dipipet untuk 1 liter media		5 ml	10 ml

Cara pembuatan media dengan menggunakan *magnetic stirrer* adalah sebagai berikut. *Magnetic stirrer* dihubungkan dengan listrik. Gelas erlenmeyer yang akan digunakan sebagai wadah pembuatan media diletakkan diatas *magnetic stirrer*. Ukuran erlenmeyer biasanya lebih besar dari volume media yang dibuat untuk menghindari tumpahnya media pada saat media mendidih. Misalnya untuk pembuatan volume media satu liter, digunakan gelas erlenmeyer 2 liter. Pembuatan satu liter media MS dari larutan stok dilakukan dengan jalan menambahkan larutan stok A, B, C, D dan E secara berurutan pada erlenmeyer/gelas beker yang sudah berisi kurang lebih 400 ml air destilasi.

Kultur Jaringan Tanaman

Volume larutan stok yang dipipet tergantung dari konsentrasi stok yang dibuat dan volume larutan stok. Yang pertama harus dicari adalah konsentrasi larutan stok sesungguhnya. Misalnya diberikan contoh disini untuk volume 500 ml stok dengan “50 x konsentrasi”. Karena volume larutan stok adalah 500 ml, sementara yang ditimbang adalah 50 x konsentrasi (dari komponen untuk pembuatan 1000 ml media), berarti konsentrasi larutan stok adalah $(1000/500) \times 50 = 100$ kali. Untuk membuat 1000 ml media, maka yang dipipet didapat dengan rumus sebagai berikut:

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

$V_1=1000$ ml (media yang akan dibuat), N_1 =konsentrasi media yang akan dibuat (dalam hal ini 1 kali), V_2 = volume larutan stok yang harus dipipet, N_2 =konsentrasi larutan stok (dalam hal ini 100 kali). Maka akan didapat $V_2=(1000 \times 1)/100=10$ ml.

ZPT atau senyawa organik alami (jika diperlukan) ditambahkan sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan. Selanjutnya ditambahkan gula sebanyak 20-30 gram, diaduk terus dengan magnet stirrer hingga homogen. Air destilasi ditambahkan hingga volumenya 1000 ml dan dilakukan penyesuaian pH menjadi 5.6-5.8 dengan menambahkan NaOH (jika terlalu asam) atau HCl (jika terlalu basa). Setelah penyesuaian pH, ditambahkan pematat, diaduk terus sambil dipanaskan hingga suhu 80°C. Suhu ini adalah suhu maksimal untuk menjaga agar bahan aktif yang terkandung dalam zat kimia tidak rusak. Larutan media tersebut kemudian dituang dalam botol-botol kultur steril (volume media umumnya sekitar 25-30 ml per botol), ditutup dan disterilisasi dengan autoklaf. Lamanya sterilisasi tergantung volume media seperti terlihat pada Tabel 4. Gambar 8 memperlihatkan media kemasan MS dan senyawa komponen MS.

Kultur Jaringan Tanaman

Tabel 4
Minimal waktu sterilisasi dengan autoklaf
yang dibutuhkan media kultur

Volume media (ml)	Lama sterilisasi (menit)
25	20
50	25
100	28
250	31
500	35
1000	40
2000	48
4000	63

(Sumber: Burger, 1988)



Skala = 1 cm

Gambar 8. Media kemasan jadi MS (kiri) dan komponen MS yang dijual secara terpisah (kanan)
(Dok. pribadi)

BAB 4

TAHAPAN PEKERJAAN DALAM KULTUR JARINGAN

Pada dasarnya pekerjaan kultur jaringan meliputi tiga tahap sampai penanaman kultur (*culture establishment*) dan tiga tahap setelah itu sebelum dipindah ke lapang, yaitu:

- Isolasi bahan tanam (eksplan) dari tanaman induk
- Sterilisasi eksplan
- Penanaman eksplan pada media steril yang sesuai (*culture establishment*). Setelah eksplan ditanam, ada empat fase lagi yang diperlukan sampai tanaman siap ditanam di lapang, yaitu:
 - Perbanyak propagul
 - Pengakaran
 - Aklimatisasi
 - Pemindahan tanaman ke lapang

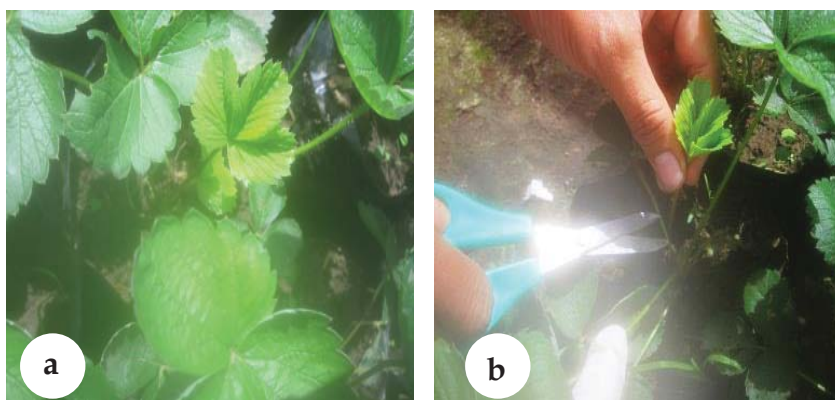
A. Isolasi Bahan Tanam (Eksplan)

Isolasi bahan tanam dimulai dari pemilihan dan pemeliharaan tanaman induk. Tanaman induk yang dipilih harus sehat, bebas penyakit dan memiliki pertumbuhan yang baik. Hal ini diperlukan agar bahan eksplan yang digunakan dalam kultur jaringan tidak menjadi sumber kontaminasi sehingga kondisi aseptik kultur tetap terjaga. Sebelum eksplan diambil, tanaman induk dapat diberi perlakuan, misalnya penyemprotan dengan pestisida untuk menjaga kesehatan tanaman serta diberi pupuk agar pertumbuhan vigor. Penyemprotan ZPT jenis sitokinin dan/atau pemangkasan tunas apikal dapat dilakukan pada tanaman induk jenis dikotil untuk merangsang pertumbuhan tunas lateral. Tunas lateral yang baru tumbuh ini baik digunakan sebagai bahan eksplan, karena

Kultur Jaringan Tanaman

bahan eksplan dengan sel-sel yang masih aktif membelah (tunas yang baru tumbuh) memiliki daya regenerasi yang tinggi.

Gambar 9 memperlihatkan tanaman induk stroberi yang digunakan sebagai sumber eksplan. Tampak daun muda stroberi yang digunakan sebagai eksplan.



Gambar 9. Tanaman induk stroberi (a) dan pengambilan bahan eksplan (b)
(Dok. pribadi)

B. Sterilisasi Eksplan

Berikut diberikan contoh sterilisasi eksplan yang paling sederhana. Bahan tanam yang dipilih (misalnya daun tanaman stroberi) diambil dari tanaman induk, kemudian dipotong menjadi lebih kecil dengan jalan menghilangkan bagian-bagian yang tidak diperlukan. Selanjutnya dicuci bersih dengan detergen (disikat dengan sikat gigi yang lembut) dibawah air kran yang mengalir. Selanjutnya bahan tanam direndam dengan fungisida (konsentrasi 2 gram per liter) selama 10 menit sambil digoyang. Setelah itu dibilas dengan air steril tiga kali kemudian dimasukkan dalam laminar. Dalam laminar, bahan tanam disterilisasi lagi dengan menggunakan sodium hipoklorida atau clorox. Pemutih pakaian dapat digunakan sebagai pengganti sodium hipoklorida karena bahan aktif ini terkandung di dalamnya meskipun ada pencampur lain (tidak murni). Perendaman dengan clorox dilakukan dua kali. Yang

pertama, direndam pada clorox dengan konsentrasi 10% selama 5 menit (sambil digoyang), kemudian dibilas air destilasi steril hingga tiga kali. Yang kedua, dengan clorox konsentrasi 5% selama 5-7 menit, selanjutnya dibilas lagi dengan air steril hingga 3-4 kali. Pada beberapa spesies tanaman juga digunakan antibiotik untuk mengeliminasi bakteri, misalnya penggunaan cefotaxime dengan konsentrasi 300 ppm. Selanjutnya juga dibilas dengan air steril hingga 3 kali.

Yang perlu diperhatikan dalam sterilisasi permukaan bahan eksplan adalah konsentrasi sterilan dan lamanya perendaman. Angka yang tepat biasanya diperoleh melalui penelitian awal (*trial and error*), karena sangat spesifik untuk masing-masing spesies tanaman serta jenis dan umur bahan eksplan. Konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan kematian pada sel-sel tanaman, sedangkan konsentrasi yang terlalu rendah tidak efektif karena tidak mampu membunuh mikroorganisme yang ada di permukaan eksplan.

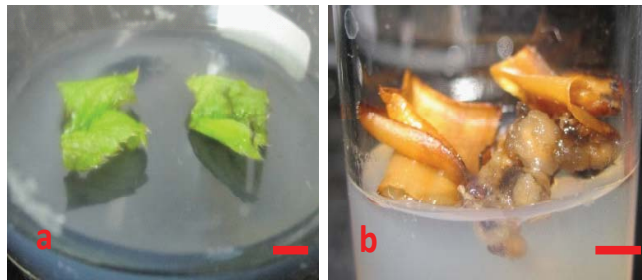
Jika tanaman induk sumber eksplan merupakan tanaman hasil kultur dan berada dalam botol kultur, maka prosedur sterilisasi ini tidak diperlukan. Misalnya jika bahan eksplan adalah *seedling* (bibit) anggrek dalam botol, maka sterilisasi bahan eksplan tidak diperlukan karena tanaman induk sumber eksplan sudah steril.

C. Penanaman Eksplan

Eksplan yang sudah steril selanjutnya dipotong menjadi bagian yang lebih kecil, misalnya menjadi pangkal dan ujung daun, selanjutnya ditanam pada media steril yang sudah disiapkan.

Media tanam yang digunakan mengandung ZPT tertentu tergantung dari tujuan kultur. Jika yang diinginkan adalah pembentukan kalus, maka bahan eksplan ditanam pada media induksi kalus, misalnya media dengan 2,4-D. Demikian pula jika tujuannya untuk menginduksi tunas maka ditanam pada media untuk induksi tunas, misalnya media yang mengandung sitokinin atau mengandung GA3. Gambar 10 memperlihatkan eksplan daun stroberi yang ditanam pada media yang mengandung 5 ppm GA3 untuk induksi tunas dan eksplan berupa

umbut kelapa sawit yang ditanam pada media MS dengan 3 ppm 2,4-D untuk induksi kalus. Umbut adalah istilah untuk tunas apikal yang meristematik pada kelompok tanaman palma (palem-paleman) termasuk kelapa sawit.



a= eksplan daun stoberi; b= eksplan umbut kelapa sawit; skala = 0.5 cm.

Gambar 10. Eksplan pada media setelah penanaman.
(Dok. pribadi)

Kondisi aseptik harus tetap dijaga selama proses penanaman, baik ruang tanam, pekerja dan juga alat-alat yang digunakan untuk menanam. Sukses pekerjaan kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh kemampuan pekerja menjaga kondisi aseptik.

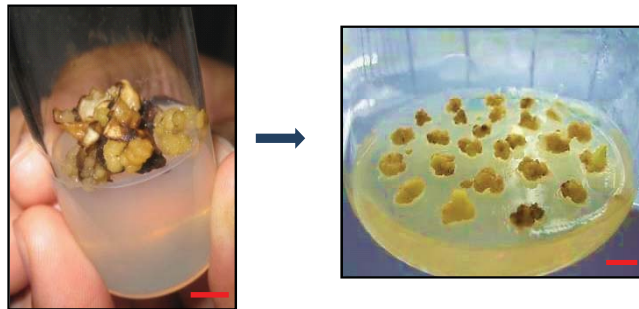
D. Perbanyak (Proliferasi) Propagul

Propagul adalah bentukan baru hasil morfogenesis yang terbentuk dari jaringan eksplan yang ditanam. Propagul dapat berupa kalus, tunas atau embrio somatik. Proliferasi tersebut dapat dilakukan dengan melakukan subkultur ke medium baru, dapat berupa medium induksi kalus untuk perbanyak kalus dan medium induksi tunas untuk perbanyak tunas. Proliferasi embrio somatik dilakukan dengan subkultur pada media tanpa hormon setelah sebelumnya diinisiasi pembentukannya dengan 2,4-D.

Gambar 11 memperlihatkan perbanyak propagul berupa kalus pada kultur umbut kelapa sawit. Tampak kalus yang terbentuk dari eksplan umbut kelapa sawit disubkultur ke media induksi kalus sehingga

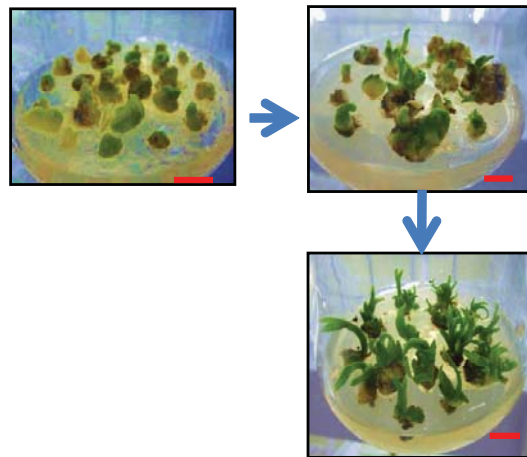
Kultur Jaringan Tanaman

diperoleh lebih banyak kalus. Sedangkan Gambar 12 memperlihatkan pada tahap berikutnya, dimana kalus-kalus tersebut kemudian diinduksi menjadi tunas dengan melakukan sub kultur ke media induksi tunas. Tunas-tunas ini kembali diperbanyak lagi sehingga diperoleh lebih banyak tunas. Tunas-tunas ini siap memasuki tahap / fase berikutnya yaitu pengakaran.



Skala = 1 cm.

Gambar 11. Proliferasi kalus dari eksplan umbut kelapa sawit.
(Dok. pribadi)



Skala= 1 cm

Gambar 12. Proliferasi tunas dari kalus yang terbentuk dari eksplan umbut kelapa sawit

(Dok. pribadi)

E. Pengakaran

Tahap pengakaran adalah tahap dimana tunas-tunas yang sudah tumbuh dipindahkan ke media induksi akar agar terbentuk plantlet. Pengakaran dapat dilakukan secara in-vitro (di laboratorium) atau eks-vitro (di luar laboratorium).

Induksi akar secara in-vitro dilakukan tetap di laboratorium dalam kondisi aseptik. Gambar 13 memperlihatkan induksi akar secara in-vitro pada kultur kelapa sawit. Untuk menstimulasi pertumbuhan akar, pada media kultur ditambahkan ZPT dari golongan auksin.



Skala= 1 cm

Gambar 13. Induksi akar secara in vitro pada kultur umbut kelapa sawit
(Dok. pribadi)

Induksi akar secara eks-vitro dilakukan dengan jalan melakukan transplanting tunas-tunas mini ke media semi steril di luar laboratorium. Pangkal-pangkal tunas ini biasanya dicelupkan dahulu ke larutan yang mengandung auksin untuk merangsang tumbuhnya akar sebelum akhirnya ditanam pada media semisteril yang sudah disiapkan. Pengakaran eks-vitro kini banyak dilakukan, dianggap lebih efisien karena menghindarkan pekerja dari pekerjaan in-vitro yang rumit dan hati-hati.

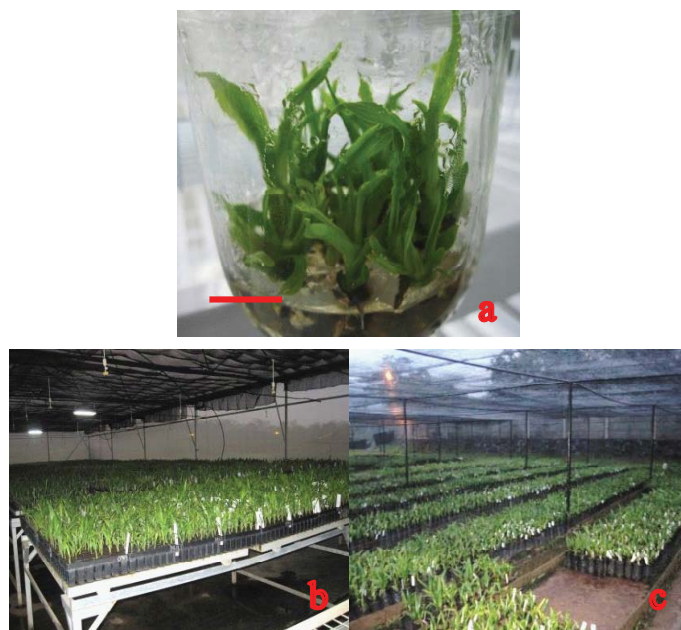
F. Aklimatisasi dan Pemindahan Tanaman ke Lapang

Tanaman hasil kultur jaringan tidak dapat ditanam langsung di lapang, namun memerlukan proses adaptasi bertahap terhadap lingkungan barunya yang disebut dengan aklimatisasi. Hal ini diperlukan karena kondisi tanaman hasil kultur jaringan berbeda dengan tanaman normal di lapang. Kondisi lingkungan mikro botol kultur menyebabkan tanaman hasil kultur jaringan tidak memiliki lapisan lilin dan stomata tidak berfungsi sehingga sangat riskan jika langsung ditanam di lapang. Aklimatisasi dalam kultur in-vitro adalah suatu proses adaptasi dari tanaman hasil kultur in-vitro (plantlet) terhadap cekaman lingkungan baru sebelum ditanam di lapang. Kondisi lingkungan baru tersebut meliputi suhu, cahaya dan kelembaban. Tahap aklimatisasi ini juga merupakan tahap yang krusial dalam kultur jaringan. Kematian plantlet setelah aklimatisasi seringkali terjadi sehingga tahap ini perlu dilakukan secara hati-hati.

Aklimatisasi, contoh misalnya untuk tanaman kelapa sawit dilakukan sebagai berikut. Jika kondisi suhu kultur 20°C, sementara kondisi lapang 35°C, maka suhu pada saat aklimatisasi ditingkatkan secara gradual diantara suhu tersebut. Misalnya aklimatisasi tahap 1, selama dua bulan pada suhu 25°C, kemudian masuk ke aklimatisasi tahap 2 yaitu selama satu bulan pada suhu 32°C, baru kemudian dipindahkan ke kondisi lapang. Demikian pula untuk cahaya ditingkatkan secara gradual, sampai akhirnya tercapai cahaya penuh di lapang. Perlakuan suhu dan cahaya saat aklimatisasi ini bisa dilakukan dengan pemberian atap paranet dengan tingkat pori-pori (lubang) paranet yang semakin renggang dari waktu ke waktu. Untuk perlakuan cahaya bisa ditambahkan lampu. Sedangkan untuk faktor kelembaban, dilakukan pengurangan kelembaban secara gradual. Hal ini dapat dilakukan dengan menyemprotkan air dengan *mist blower* sedemikian rupa sehingga keluar butir-butir air yang sangat lembut menyerupai kabut. Perlahan dengan mengatur tekanan *blower* jumlah kabut yang keluar bisa dikurangi sehingga kelembaban berkurang, sampai akhirnya tanaman siap dipindah ke lapang. Kelembaban pada lingkungan mikro tanaman kultur berkisar

Kultur Jaringan Tanaman

80-90%, sedangkan kelembaban lingkungan di lapang yang panas terik sekitar 50-70%, tergantung daerahnya. Gambar 14 memperlihatkan tanaman kelapa sawit hasil kultur jaringan saat aklimatisasi. Pada aklimatisasi tahap 2 tampak tanaman sudah ditransplanting ke individu polybag atau pot yang lebih besar agar pertumbuhan menjadi lebih cepat. Tanaman yang tumbuh sehat setelah melalui aklimatisasi tahap 2 ini kemudian dapat dipindahkan ke lapang.



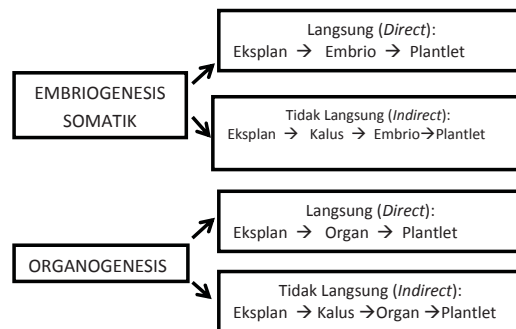
a = plantlet kelapa sawit yang siap diaklimatisasi; b = aklimatisasi tahap 1 dalam rumah kaca; c = aklimatisasi tahap 2 sebelum dipindah ke lapang; skala = 1 cm berlaku hanya untuk gambar a.

Gambar 14. Aklimatisasi bibit kelapa sawit hasil kultur
(Dok.pribadi)

BAB 5

SISTEM REGENERASI TANAMAN PADA KULTUR JARINGAN

Bagaimana eksplan beregenerasi, mengalami morfogenesis dan tumbuh menjadi plantlet dalam kultur jaringan meliputi dua jalur utama yakni embriogenesis somatik dan organogenesis. Masing-masing terbagi lagi menjadi dua cara, yakni secara langsung (*direct*) dan secara tidak langsung atau melalui fase kalus (*indirect*). Gambar 15 memperlihatkan skema regenerasi tanaman dalam kultur jaringan.



Gambar 15. Skema Regenerasi Tanaman secara In Vitro

A. Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik adalah proses terbentuknya struktur menyerupai embrio dari sel-sel somatik. Fase yang dilewati dalam embriogenesis somatik ini serupa dengan fase terbentuknya embrio zigotik hasil fertilisasi. Embriogenesis somatik terbentuk dari individu sel atau sekelompok sel, kemudian memasuki *globular stage* (fase bentuk bundar), *heart stage* (fase bentuk hati) dan *torpedo stage* (fase bentuk menyerupai torpedo) baru kemudian menjadi embrio. Pada fase torpedo, meristem ujung batang dan meristem ujung akar sudah dapat

terdeteksi. Meristem ujung batang nantinya akan berkembang menjadi tunas dan meristem ujung akar menjadi akar. Proses terbentuknya embrio somatik ini dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung (melalui kalus).

Pada banyak literatur mengenai embriogenesis somatik secara tidak langsung, contoh yang sering diberikan adalah tanaman wortel (*Daucus carota*). Eksplan yang berasal dari jaringan pada umbi wortel (misalnya empulur) disterilisasi dan ditanam pada media dasar MS padat yang mengandung 1mg/liter 2,4-D untuk menginduksi kalus. Kalus yang terbentuk kemudian disubkultur ke media MS cair tanpa hormon untuk menginduksi sel-sel (massa sel) yang embriogenik (sel-sel yang memiliki potensi membentuk embrio) yang selanjutnya membentuk embrio somatik. Kultur sel dalam media cair ini dilakukan dengan shaker (penggoyangan). Selanjutnya embrio somatik ini disubkultur ke media MS padat yang mengandung 0,025 mg/liter ABA (*abscisic acid*) untuk pematangan embrio (membentuk *mature embryos*). Dari embrio ini selanjutnya terbentuk plantlet.

Contoh lain dari embriogenesis somatik secara tidak langsung (melalui kalus) dikemukakan oleh Naing *et al* (2011) pada tanaman anggrek *Coelogyne cristata*. Kalus diinduksi dari irisan daun (panjang 3-5 mm) yang berasal dari seedling dalam botol dengan jalan menanam pada media MS (konsentrasi penuh) yang ditambah hormon 2,4-D dan Benzyladenine (BA). Konsentrasi 2 mgL⁻¹ 2,4-D dan 2 mgL⁻¹ BA memberikan hasil optimal untuk pembentukan kalus. Selanjutnya kalus tersebut disubkultur pada media ½ MS tanpa hormon dengan penambahan 2gL⁻¹ arang aktif untuk pembentukan embrio somatik. Selanjutnya terjadi pematangan embrio dan membentuk tanaman secara utuh (plantlet) setelah 30 hari subkultur.

Embriogenesis secara langsung jarang dilakukan dalam kebanyakan tanaman melalui kultur jaringan dibandingkan metode secara langsung. Contoh yang umum diberikan adalah untuk tanaman alfalfa (*Medicago falcata*). Eksplan yang berupa daun trifoliolate muda disterilisasi dan diiris menjadi potongan-potongan kecil dan diletakkan pada media dasar B5 cair yang mengandung 2,4-D (4 mg/liter), kinetin (0,2 mg/liter), adenin (1 mg/liter), glutathione (10 mg/liter) dan dishaker

selama 10-15 hari. Selanjutnya eksplan dicuci bersih dan dipindah ke media B5 cair tanpa hormon yang mengandung maltose dan polyethylene glycol untuk pembentukan embrio somatik. Pematangan embrio dilakukan dengan melakukan subkultur ke media dasar B5 padat yang mengandung ABA. Selanjutnya embrio ini membentuk plantlet.

Jika dilihat dari proses pembentukan embrio somatik, baik secara langsung maupun tidak langsung, sebenarnya melewati dua fase yang sama. Fase pertama adalah penggunaan 2,4-D konsentrasi tinggi untuk inisiasi embrio dan fase kedua adalah tanpa 2,4-D untuk produksi embrio. Jadi disini ditekankan bahwa untuk terbentuknya embrio somatik, media harus bebas dari 2,4-D karena 2,4-D menginduksi sel-sel untuk terus menerus berada pada fase tidak terdiferensiasi (*undeterminate state*) sehingga embrio tidak terbentuk. Pemindahan ke media tanpa hormon diperlukan untuk terjadinya diferensiasi sel menjadi embrio.

B. Organogenesis

Organogenesis dalam kultur jaringan adalah proses terbentuknya organ dari jaringan eksplan secara langsung, maupun secara tidak langsung (melalui fase kalus). Pada dasarnya, regenerasi tanaman melalui organogenesis dibedakan menjadi 3 tipe, yaitu:

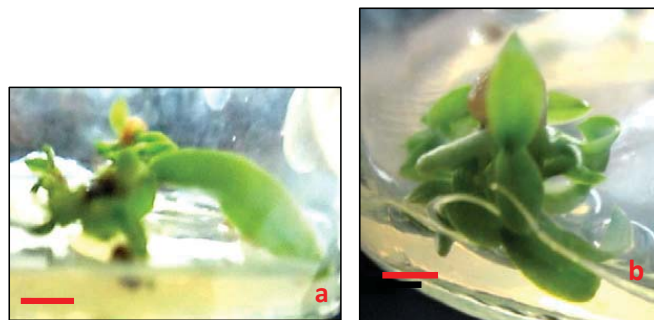
- Organogenesis secara langsung dari eksplan yang memiliki primordia tunas
- Organogenesis secara langsung dari eksplan yang tidak memiliki primordia tunas
- Organogenesis secara tidak langsung melalui fase kalus

Organogenesis secara langsung dari eksplan yang memiliki primordia tunas dapat terjadi jika jaringan eksplan yang digunakan memiliki bakal tunas (*pre-existing shoots*) yang belum muncul ke permukaan. Tunas apikal (*apical buds*), tunas lateral (*laterally buds*), dan irisan buku/ruas pada batang (*nodal segment*) dapat dijadikan bahan eksplan untuk pilihan tipe ini. Media kultur dimodifikasi dengan menambahkan hormon untuk induksi tunas sehingga bakal tunas tersebut dapat muncul ke permukaan. Adanya hormon jenis sitokinin

Kultur Jaringan Tanaman

dapat memunculkan tunas-tunas tersebut, tidak hanya satu tunas tapi terjadi proliferasi sehingga muncul tunas dalam jumlah banyak. Tunas yang muncul dari metode mikropropagasi dengan cara ini disebut tunas aksilar, sehingga seringkali metode ini disebut *axillary bud formation (abf)*. Khusus untuk anggrek dari genus *Phalaenopsis*, ruas tangkai bunganya berisi bakal tunas sehingga seringkali digunakan untuk bahan eksplan dalam mikropropagasi dengan metode *abf*.

Organogenesis secara langsung dari eksplan yang tidak memiliki bakal tunas dapat terjadi jika tunas muncul secara langsung misalnya dari irisan daun. Contohnya, tunas-tunas kecil dapat tumbuh secara langsung dari irisan daun anggrek *Vanda tricolor* yang ditanam pada media dasar MS tanpa hormon (Gambar 16). Selanjutnya tunas-tunas ini disubkultur ke media untuk induksi akar untuk menghasilkan plantlet. Tunas yang muncul dari jaringan tanaman yang tidak memiliki bakal tunas disebut tunas adventif. Istilah tunas adventif juga digunakan untuk perbanyakan tanaman secara vegetatif konvensional, misalnya untuk tunas yang muncul dari stek daun tanaman cocor bebek (*Coleus sp*).



Skala= 0.5 cm

Gambar 16. Tunas adventif dari eksplan irisan daun anggrek *V. tricolor* (a) serta plantlet yang dihasilkan (b)
(Dok. pribadi)

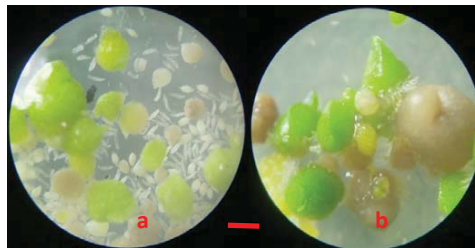
Organogenesis secara tidak langsung terjadi jika organ yang terbentuk (dalam hal ini tunas) terjadi melalui fase kalus. Contohnya adalah pada kultur umbut kelapa sawit seperti yang dicontohkan sebelumnya pada Gambar 12. Kalus yang awalnya terbentuk dari eksplan umbut kelapa sawit disubkultur ke media yang mengandung

hormon untuk induksi tunas. Selanjutnya tunas-tunas ini dipindahkan ke media pengakaran untuk membentuk plantlet secara utuh.

C. Regenerasi Plantlet melalui Pembentukan *Protocorm Like Bodies* pada Tanaman Anggrek

Protocorm adalah suatu struktur berbentuk bulat, berwarna kuning, hijau atau hijau kekuningan yang dihasilkan dari perkecambahan biji-biji anggrek. Biji-biji anggrek yang jumlahnya jutaan dalam sebuah kapsul (istilah untuk buah anggrek), jika berkecambah membentuk struktur bulat berwarna putih pada awalnya. Lama kelamaan struktur putih akan berubah menjadi kuning, kemudian hijau kekuningan dan hijau. *Protocorm* memiliki bakal akar dan bakal tunas seperti halnya embrio zigotik karena *protocorm* berasal dari biji. Pada anggrek *V. tricolor*, meristem ujung batang akan terdeteksi 12 minggu setelah penanaman. Gambar 17 memperlihatkan struktur *protocorm* anggrek *V. tricolor* pada 8 dan 12 minggu setelah semai.

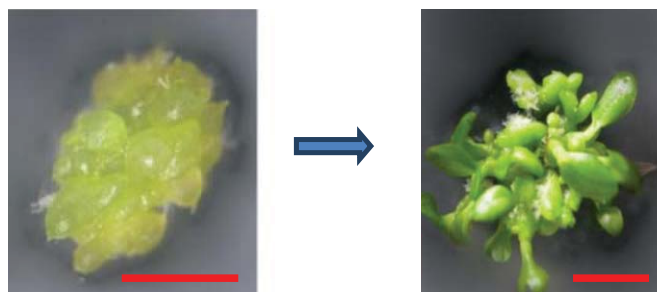
Protocorm like bodies (plb) adalah struktur menyerupai *protocorm* yang merupakan hasil morfogenesis dari eksplan yang berasal dari sel-sel somatik. Misalnya jika bahan eksplan adalah organ tanaman anggrek, seperti irisan daun atau irisan akar. *Plb* juga memiliki bakal akar dan bakal tunas seperti *protocorm*, sehingga *plb* sebenarnya menyerupai embrio somatik. Gambar 18 memperlihatkan *plb* anggrek *Phalaenopsis amabilis* 6 minggu setelah tanam dan plantlet yang dihasilkan.



a= 8 minggu setelah semai; b= 12 minggu setelah semai. Skala = 1 mm

Gambar 17. *Protocorm* anggrek *V. tricolor*
(Dok. pribadi)

Kultur Jaringan Tanaman



Plb umur 6 MST (kiri) dan plantlet yang dihasilkan setelah 12 MST (kanan)
MST = minggu setelah tanam; Skala = 1 mm.

Gambar 18. *Protorm like bodies* anggrek *P. amabilis* dari eksplan irisan pangkal akar
(Dok. pribadi)

Pada Gambar 18 tersebut, tampak *plb* umur 6 MST yang sudah menampakkan bakal tunas. Akar terbentuk dengan sendirinya tanpa melalui pemindahan ke media pengakaran, mengindikasikan bahwa *plb* memang memiliki bakal akar seperti halnya *protocorm* dari biji. Dengan demikian, *plb* yang terbentuk dari sel-sel somatik tersebut lebih menyerupai embrio somatik, sehingga prosesnya lebih kepada embriogenesis dibandingkan organogenesis. Jadi *plb* bersifat bipolar, artinya memiliki bakal tunas dan sekaligus bakal akar.

Sifat bipolar dan monopolar merupakan perbedaan yang paling mendasar antara organogenesis dan embriogenesis. Organogenesis dicirikan oleh sifat monopolar, atau pertumbuhan ke satu arah yakni pembentukan dan pertumbuhan tunas (ke arah atas) atau pembentukan dan pertumbuhan akar (ke arah bawah), sedangkan pada embriogenesis pertumbuhan terjadi ke dua arah. Pada organogenesis, pertumbuhan yang terjadi masih memiliki hubungan dengan jaringan eksplan asalnya, sedangkan pada embriogenesis pertumbuhan yang terjadi bersifat mandiri dan tidak berhubungan lagi dengan jaringan eksplan asalnya.

BAB 6

TIPE KULTUR

Ditinjau dari bahan eksplan yang digunakan, kultur jaringan tanaman dibedakan menjadi :

- Kultur meristem (*meristem cultures*)
- Kultur ujung tunas (*shoot-tip cultures*)
- Kultur embrio (*Embryo cultures*)
- Kultur dan Fusi protoplas (*Protoplast cultures*)
- Kultur anther/mikrospora (*Anthere/microspore cultures*)
- Kultur kalus dan kultur sel (*callus cultures and cell cultures*)
- Kultur biji (*seed cultures*)

A. Kultur meristem (*meristem cultures*)

Meristem adalah bagian tanaman yang sel-selnya bersifat meristematis dan aktif membelah. Pada tubuh tanaman posisi meristem ada pada ujung tunas (tunas apikal maupun aksilar) yang berfungsi menambah panjang tunas, pada ujung akar berfungsi menambah panjang akar serta pada kambium batang yang menyebabkan bertambah besarnya diameter tanaman. Pada tanaman suku gramineae (rumput-rumputan) terdapat meristem khusus yang disebut 'meristem interkalar' yang posisinya ada pada buku (node) batang yang menyebabkan bertambah panjangnya ruas (internode) batang.

Dalam kultur jaringan, meristem yang umum digunakan sebagai bahan eksplan adalah meristem ujung tunas (apikal maupun aksilar). Kultur meristem menggunakan bahan eksplan yang sangat kecil, berukuran ≤ 1 mm. Eksplan meristem harus diambil menggunakan mikroskop dalam laminar. Irisan meristem terdiri dari 'apical dome'

Kultur Jaringan Tanaman

(ujung tunas yang posisinya paling atas) serta dua primordia daun yang terkecil tanpa menyertakan jaringan pembuluh.

Kultur meristem menghasilkan progeni (anakan) tanaman yang bebas virus meskipun bahan eksplan berasal dari tanaman yang terserang virus. Beberapa alasan yang diduga menyebabkan dihasilkannya tanaman bebas virus dari kultur meristem adalah:

- Sistem jaringan pembuluh belum berkembang pada meristem, sementara virus bergerak dalam tubuh tanaman melalui jaringan pembuluh.
- Aktifitas metabolit yang sangat tinggi pada sel-sel meristem yang aktif membelah sehingga tidak memungkinkan virus bereplikasi.
- Tingginya kandungan auksin endogen pada meristem mungkin menghambat replikasi virus.

Kultur meristem merupakan sistem organogenesis secara langsung, sehingga memungkinkan diperoleh anakan yang secara genetik lebih stabil jika dibandingkan melalui fase kalus. Produksi tanaman bebas virus dengan kondisi genetik yang stabil melalui kultur meristem telah dilakukan oleh perusahaan hortikultura yang besar untuk tanaman kentang, tebu, pisang dan apel.

Makin besar ukuran eksplan akan mempermudah proses kultur dan menyebabkan lebih banyak plantlet yang dihasilkan, namun akan diperoleh anakan tanaman yang bebas virus makin sedikit seperti percobaan yang dilakukan Dale & Cheyene (1993) pada tanaman clover (*Trifolium patense*) (Tabel 5).

Ukuran eksplan yang semakin besar akan menyebabkan eksplan lebih kuat dalam proses sterilisasi sehingga memungkinkan persentase eksplan bertahan hidup paska sterilisasi lebih besar dan diperoleh jumlah plantlet yang lebih banyak. Namun semakin besar ukuran eksplan menyebabkan keikutsertaan jaringan pembuluh pada eksplan yang digunakan sehingga kemungkinan adanya virus pada plantlet yang dihasilkan akan menjadi lebih besar. Jika tujuan dari perbanyakan melalui kultur jaringan bukan untuk tujuannya tanaman bebas virus, maka lebih baik digunakan kultur ujung tunas (*shoot-tip culture*)

yang menggunakan ukuran eksplan lebih besar karena pengerjaannya menjadi lebih mudah.

Tabel 5.
Pengaruh ukuran eksplan terhadap jumlah plantlet serta anakan bebas virus yang dihasilkan *)

Ukuran eksplan (mm)	Jumlah eksplan yang digunakan	Jumlah plantlet yang dihasilkan	Jumlah tanaman bebas virus yang dihasilkan
< 0,6	90	18 (20%)	18 (100%)
0,6-1,2	113	45 (40%)	19 (42%)
1,3-1,8	190	102 (54%)	25 (25%)
1,9-2,4	158	88 (56%)	11 (13%)
2,5-3,0	174	92 (53%)	11 (12%)
		Persentase dihitung dari jumlah eksplan yang digunakan	Persentase dihitung dari jumlah plantlet yang dihasilkan

*)Dikutip dari Dale & Cheyene (1993) dan dimodifikasi dengan menambahkan persentase

B. Kultur ujung tunas (*shoot-tip cultures*)

Kultur ujung tunas menggunakan eksplan bakal tunas apikal atau tunas aksilar, berukuran 3-20 mm, menyertakan beberapa primordia daun dan jaringan pembuluh. Eksplan bakal tunas aksilar dapat berupa ‘nodal segment’ (irisian buku) karena pada irisan buku (buku merupakan bekas tempat daun tumbuh) terdapat bakal tunas aksilar. Eksplan ditanam pada media induksi tunas (media dengan kandungan sitokinin) untuk memunculkan ‘pre-existing’ tunas yang ada dalam eksplan.

Tunas dalam jumlah banyak bisa muncul (multiplikasi tunas), namun bisa juga hanya dihasilkannya satu tunas dari satu eksplan. Jika dihasilkannya banyak tunas, tunas-tunas tersebut disubkultur ke media

Kultur Jaringan Tanaman

perakaran (media dengan auksin) untuk dihasilkannya plantlet. Namun jika yang muncul hanya satu tunas, maka dilakukan kultur 'nodal segment' kembali dari satu tunas yang dihasilkan tersebut. Caranya yaitu dengan jalan menanam kembali irisan buku (node) yang dihasilkan oleh tunas tersebut. Penanaman 'nodal segment' umumnya dilakukan dengan posisi irisan buku 'tidur'. Tunas yang muncul kemudian bisa disubkultur ke media perakaran untuk dihasilkannya plantlet. Proses ini bisa diulang kembali untuk diperoleh lebih banyak plantlet. Munculnya bakal tunas aksilar sebagai bahan eksplan pada tanaman induk dapat dilakukan dengan menstimulasinya. Contohnya pada tanaman *Aglaonema sp.* Buku (node) pada batang disuntik dengan 30 µl BAP (konsentrasi 30ppm) untuk memunculkan benjolan yang berupa bakal tunas aksilar (Mariani *et al.*, 2011). Bakal tunas aksilar ini kemudian diambil untuk dijadikan bahan eksplan. Perlakuan ini mempercepat pertumbuhan tunas aksilar secara *in vitro* dibandingkan dengan menanam irisan buku secara *in vitro* tanpa perlakuan.

Perbanyakan tanaman dengan kultur ujung tunas ini sukses dilakukan untuk tanaman pisang. Metode ini disebutkan superior (dibandingkan perbanyakan pisang secara konvensional dengan *sucker*) dalam hal hasil optimal yang diperoleh, keseragaman bibit, kebersihan bibit karena bebas penyakit serta sifat *true to type* yang diturunkan (Ngomuo *et al.* 2014).

C. Kultur embrio (*Embryo cultures*)

Yang dimaksud dengan kultur embrio adalah mengkulturkan embrio zigotik secara *in vitro*. Embrio zigotik adalah hasil fertilisasi antara sel telur dengan inti sel sperma yang terjadi pada proses fertilisasi ganda tanaman angiospermae.

Embrio zigotik dapat digunakan sebagai bahan eksplan namun untuk kondisi tertentu atau alasan tertentu sebagai berikut:

- Embrio tidak bisa ditumbuhkan dalam kondisi biasa secara *in vitro* karena tidak memiliki cadangan makanan. Misalnya pada tanaman anggrek. Biji-biji anggrek yang berukuran sangat

kecil dan berjumlah sangat banyak (mencapai ribuan sampai jutaan) dari sebuah kapsul tidak memiliki endosperm (cadangan makanan) yang diperlukan oleh biji untuk perkecambahan. Biji-biji ini harus ditumbuhkan secara *in vitro* dengan memberi nutrisi buatan untuk dapat berkecambah dan tumbuh menjadi seedling (tanaman).

- Embrio hasil fertilisasi tidak berkembang dan mati. Contohnya adalah ‘embryo rescue’ pada embrio zigotik hasil persilangan buatan yang dilakukan para pemulia tanaman jeruk keprok. Setelah melakukan persilangan buatan, embrio muda diambil dari tanaman induk dan ditumbuhkan secara *in vitro* karena pada tanaman induknya embrio tersebut tidak berkembang dan mati.

D. Kultur dan fusi protoplas (*Protoplast cultures and fusion*)

Istilah protoplas mengacu pada sel tanaman tanpa dinding sel atau isi sel yang terbungkus hanya oleh membran plasma. Protoplas dari sebuah sel dapat dipisahkan dari dinding selnya secara enzimatik maupun secara mekanik. Protoplas yang sudah terpisah dari dinding selnya ini dapat diregenerasikan menjadi tanaman secara utuh.

Isolasi protoplas secara enzimatik pertama kali dilakukan oleh E.C. Cocking awal tahun 1960. Sedangkan regenerasi protoplas menjadi tanaman secara utuh pertama dilakukan pada protoplas daun tembakau melalui kultur protoplas yang dilakukan oleh Takebe *et al.* pada tahun 1970 (Tomar & Dantu, 2010).

Isolasi protoplas dan kultur protoplas menjadi dasar dilakukannya fusi protoplas atau hibridisasi *in vitro* dari dua tetua tanaman dengan sifat-sifat yang unggul. Fusi protoplas atau hibridisasi *in-vitro* ini dilakukan karena adanya inkompatibilitas (ketidakcocokan) yang terjadi pada persilangan buatan yang dilakukan secara konvensional di lapangan sehingga gagal terbentuk embrio. Hasil fusi protoplas ini bisa ditumbuhkan menjadi tanaman secara utuh yang membawa sifat dari dua tetua dari mana protoplas tersebut berasal. Fusi protoplas ini juga memungkinkan dilakukannya persilangan antar dua tanaman yang

secara taksonomi memiliki hubungan kekerabatan yang jauh, dimana secara konvensional persilangan tersebut sulit dilakukan.

Metode isolasi protoplas yang umum dilakukan adalah secara enzimatik, meskipun secara mekanik juga bisa dilakukan. Secara enzimatik, dinding sel dapat didegradasi dan dihilangkan dengan menggunakan enzim selulase dan pektinase karena komponen utama dari dinding sel tanaman adalah senyawa selulosa dan pektin. Reagen atau larutan untuk mengisolasi protoplas, selain mengandung enzim selulase dan pektinase juga mengandung larutan osmotik untuk menjaga stabilitas dari membran plasma atau menjaga membran plasma agar terhindar dari kerusakan. Gula dan garam seperti CaCl_2 dapat digunakan sebagai larutan osmotik.

Bahan tanaman, jenis enzim dan pH reagen yang digunakan untuk isolasi protoplas sangat berpengaruh terhadap jumlah protoplas yang diperoleh dalam proses isolasi tersebut. Selain itu spesies tanaman juga berpengaruh terhadap reagen yang dibutuhkan. Hasil penelitian Tudses *et al.* (2014) pada tanaman *Jatropha curcas* L. dan *Ricinus communis* L. mendapatkan bahwa jaringan daun yang ditumbuhkan secara *in vitro* menghasilkan jumlah protoplas terisolasi lebih banyak dibandingkan jika menggunakan kalus *in vitro*. Selain itu, hasil penelitian ini juga mendapatkan bahwa untuk *J. curcas* L. protoplas terbanyak diperoleh pada penggunaan reagen berupa campuran enzim cellulose Onuzuka R10, pectolyase Y23, mannitol, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid (MES) buffer (pH 5,6), sedangkan untuk *R. communis* L. jumlah protoplas terbanyak diperoleh dari penggunaan campuran enzim cellulose Onuzuka R10, pektinase, mannitol, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan MES buffer (pH 5).

Sebelum dilakukan fusi protoplas, hasil isolasi protoplas selanjutnya dipurifikasi untuk memisahkannya dari kotoran sel (*cell debris*), sisa enzim dan dari protoplas yang rusak. Ada banyak cara untuk melakukan hal ini, salah satunya adalah yang dikemukakan oleh Tomar dan Dantu (2010) sebagai berikut. Untuk memisahkan kotoran sel digunakan saringan yang terbuat dari *steel* atau nilon berukuran mesh sekitar 100μ pore, sedangkan untuk memisahkan dari sisa

enzim dilakukan sentrifugasi 600 rpm selama 5 menit. Protoplas akan berada di dasar tabung, supernatan yang berisi enzim dibuang dengan pipet. Selanjutnya protoplas dicuci untuk memisahkannya dari sisa-sisa enzim dengan larutan pencuci yang terdiri dari larutan osmotik dan nutrisi. Caranya diresuspensi kemudian disentrifugasi kembali. Hal ini dilakukan 2 hingga 3 kali. Protoplas utuh dipisahkan dari protoplas rusak dengan jalan menambahkan larutan sukrosa 20-40%, disentrifugasi 350 rpm selama 5 menit. Protoplas utuh akan berada di bagian atas larutan sukrosa dan kemudian dipipet dengan hati-hati. Selanjutnya protoplas yang murni kemudian diuji daya viabilitasnya.

Fusi protoplas dilakukan setelah diperoleh protoplas yang benar-benar murni dan *viable*. Terjadinya fusi protoplas memerlukan kondisi ion Ca^{++} yang tinggi dan pH larutan yang tinggi. Pengerjaan isolasi, purifikasi dan fusi protoplas semua dilakukan dalam kondisi aseptik.

E. Kultur mikrospora (*microspore cultures*)

Mikrospora merupakan sel kelamin (gamet) jantan pada tanaman angiospermae dan dapat dijumpai pada bunga tanaman yang masih kuncup. Mikrospora dapat dikatakan sebagai *immature pollen* (polen yang belum masak fisiologis). Secara alamiah, mikrospora akan berkembang menjadi polen atau serbuk sari. Polen ini nantinya akan berkembang menjadi inti sperma 1 dan inti sperma 2 pada penyerbukan ganda tanaman angiospermae. Namun pada kultur mikrospora, mikrospora diblokkan arah perkembangannya menjadi embrio, bukan menjadi polen.

Embriogenesis mikrospora atau juga disebut androgenesis ini akan menghasilkan plantlet (tanaman) yang bersifat haploid atau *double haploid* (DH) (Ferrie & Caswell, 2011). Dihasilkannya tanaman DH melalui kultur spora merupakan teknik penting dalam pemuliaan tanaman dan juga riset-riset dasar. Dihasilkannya tanaman DH ini akan mempersingkat waktu yang dibutuhkan oleh pemulia tanaman secara konvensional untuk menghasilkan tanaman homozigot. Namun

kultur mikrospora juga memiliki kekurangan yakni seringkali terjadinya albinisme pada plantlet yang dihasilkan.

Mikrospora dan anther (wadah mikrospora), keduanya dapat digunakan sebagai bahan eksplan, namun lebih baik digunakan mikrospora yang sudah diisolasi dari anther (Ferrie & Caswell, 2011). Jaringan anther dapat memberikan dampak negatif dan bisa menjadi kalus diploid yang nantinya berkembang menjadi tanaman diploid yang tidak homozigot atau heterozigot, sedangkan jika murni mikrospora maka akan dihasilkan tanaman haploid. Selanjutnya melalui teknik 'doubling chromosome' akan dihasilkan tanaman DH yang homozigot.

Ada banyak variasi pelaksanaan teknik mikrospora dari satu laboratorium dengan laboratorium lainnya atau dari satu literatur dengan literatur lainnya. Namun pada dasarnya, teknik tersebut secara umum memiliki beberapa langkah sebagai berikut:

- Menumbuhkan tanaman donor/tanaman induk penghasil mikrospora
- Panen organ bunga yang masih kuncup
- Isolasi mikrospora
- Menumbuhkan mikrospora menjadi embrio (induksi embriogenesis)
- Melakukan *doubling chromosome* jika diperlukan.

Embriogenesis mikrospora memerlukan perlakuan *stress* untuk menginduksi terbentuknya embrio dari mikrospora. Perlakuan tersebut dapat berupa perlakuan secara *in vivo* maupun *in vitro* berupa perlakuan fisik, fisiologi maupun secara kimia. Secara *in vivo* misalnya, perlakuan *stress* terhadap tanaman donor berupa kekurangan nitrogen, kekurangan air dan perlakuan temperatur rendah dapat meningkatkan jumlah embrio yang dihasilkan dari kultur mikrospora. Perlakuan secara *in vitro* misalnya kondisi anaerob, radiasi dan perlakuan senyawa kimia dapat menjadi stimulus untuk terbentuknya embrio dari mikrospora. Semua perlakuan *stress* tersebut dapat merubah atau membelokkan program perkembangan mikrospora yang seharusnya menjadi polen untuk menjadi embrio.

F. Kultur Kalus dan Kultur Suspensi (*Callus Cultures and Suspension cultures*)

Kalus adalah kumpulan sel yang belum terdiferensiasi. Kalus terbentuk pada bekas luka atau irisan pada organ tanaman. Secara *in vitro* kalus akan terbentuk pada bagian irisan/luka dari organ yang dikulturkan, namun pada beberapa spesies tanaman, kalus dapat terbentuk pada bagian sebelah dalam (*interior*).

Secara teori, semua organ/jaringan tanaman yang sel-selnya masih hidup dapat membentuk kalus secara *in vitro*. Akan tetapi jaringan tanaman yang masih muda (belum ada lignifikasi pada dinding selnya), atau jaringan muda yang bersifat meristematik akan lebih mudah menghasilkan kalus. *Seedling* (kecambah) yang dibuat secara *in vitro* dari biji (yang sudah disterilkan) sangat baik digunakan sebagai bahan eksplan untuk pembuatan kalus. Kalus akan terbentuk jika eksplan ditanam pada media kultur yang mengandung auksin dan sitokinin dengan rasio yang sama atau media yang mengandung 2,4-D.

Kalus merupakan bentuk ‘antara’ sebelum terbentuknya embrio dalam proses *indirect* embriogenesis somatik maupun sebelum terbentuknya organ pada *indirect* organogenesis. Kalus juga merupakan bahan *stock* untuk kultur suspensi.

Pada kultur suspensi, kalus yang terbentuk akan diambil dan dikulturkan pada media cair membentuk kultur cair atau kultur suspensi. Kalus yang remah dengan mudah lepas membentuk kultur sel. Kultur sel dilakukan dengan agitasi atau shaker (penggoyangan) untuk suplai oksigen. Pada kebanyakan tanaman melalui kultur *in-vitro*, kultur sel (melalui kalus) digunakan dalam embriogenesis secara tidak langsung (*indirect embryogenesis*), tetapi beberapa riset menunjukkan bahwa anakan yang dihasilkan melalui kultur sel secara genetik bersifat tidak stabil sehingga metode ini jarang digunakan. Kultur sel umumnya dibuat untuk produksi senyawa kimia tertentu, untuk riset-riset yang terkait dengan investigasi jalur biosintesis senyawa tertentu ataupun riset yang terkait dengan fisiologi sel.

G. Kultur Biji (*Seed Cultures*)

Kultur biji dilakukan untuk biji tanaman yang tidak dapat dikecambahkan secara eks vitro ataupun kalau dapat berkecambah secara eks vitro maka persentase perkecambahannya sangat rendah. Hal ini disebabkan karena biji-biji tersebut berukuran sangat kecil dan sedikit atau tidak sama sekali memiliki endosperm (cadangan makanan). Beberapa literatur menyebutkan kultur biji tanpa cadangan makanan ini juga disebut sebagai kultur embrio. Cadangan makanan pada biji diperlukan oleh embrio biji untuk proses respirasi sehingga menghasilkan energi untuk berkecambah. Alasan ini menyebabkan biji-biji tanaman ini harus dikecambahkan secara in vitro dengan memberikan sumber karbohidrat eksternal untuk respirasi. Selain itu, pada media juga ditambahkan nutrisi untuk pertumbuhan lanjutan dari biji yang sudah berkecambah. Salah satu contoh tipe biji seperti ini adalah biji tanaman anggrek.

Buah anggrek biasanya berbentuk kapsul. Di dalam satu buah anggrek terdapat ribuan hingga jutaan biji anggrek. Biji anggrek ini dikecambahkan secara in vitro pada media kultur yang aseptik. Kandungan nutrisi pada media sama dengan media kultur pada umumnya, namun pada media kultur biji anggrek biasanya ditambahkan senyawa organik alami seperti ekstrak tomat, air kelapa, jus pisang, jus kentang, dan lain sebagainya.

Perkecambahan biji anggrek tergantung dari umur buah, kultivar (atau takson yang lebih rendah, forma), serta jenis dan konsentrasi senyawa ekstrak alami yang ditambahkan. Dwiyani (2013) mendapatkan bahwa pada media kultur NP (*New Phalaenopsis*) yang diperkaya dengan ekstrak tomat, biji-biji anggrek *Vanda tricolor* dari buah umur 5 bulan (setelah polinasi) memberikan lebih banyak jumlah protokorm berwarna dibandingkan buah umur 7 bulan. Terkait dengan perbedaan forma, Dwiyani dkk (2012) mendapatkan bahwa perkecambahan serta pertumbuhan biji *V. tricolor* var. *suavis* forma Bali (tumbuh alami di daerah Bedugul, Bali) lebih responsif terhadap pemberian ekstrak tomat dibandingkan forma Merapi (tumbuh alami di lereng Merapi).

Sementara itu Dwiyani *et al.* (2015) menemukan bahwa senyawa organik alami berupa ekstrak tomat memberikan pertumbuhan yang lebih baik untuk perkecambah dan pertumbuhan lanjutan biji anggrek *V. tricolor* forma Bali dibandingkan dengan air kelapa, dan konsentrasi 100-200 gram ekstrak tomat per liter media memberikan hasil optimal untuk pertumbuhan protokorm *V. tricolor*.

Secara ringkas, cara menanam biji anggrek adalah sebagai berikut. Buah anggrek dicuci bersih, disikat dengan detergen dan dibilas dengan air kran hingga bersih. Selanjutnya buah anggrek tersebut dicelup ke dalam spiritus dan diekspose ke arah api, diulang hingga tiga kali, kemudian dimasukkan ke dalam laminar. Di dalam laminar, buah tersebut kembali diekspose ke arah api satu kali, kemudian diletakkan pada cawan petri steril. Buah ini dibelah dengan pisau steril dan bijinya ditabur pada media steril yang sudah disiapkan. Proses penaburan biji anggrek ini semua berlangsung dalam laminar.

Biji anggrek yang berkecambah akan membentuk protokorm. Protokorm ini berkembang menjadi plantlet. Prosedur penanaman biji anggrek ini merupakan prosedur dalam pembuatan bibit anggrek botol. Plantlet yang sudah memiliki 3 atau 4 daun dan memiliki akar yang kuat sudah siap diaklimatisasi (dikeluarkan dari botol) untuk ditanam dalam *comunity pot* (compot), dimana dalam satu pot ada 10-20 plantlet, tergantung ukuran potnya. Jika tanaman sudah mencapai kurang lebih tinggi 5 cm, tanaman anggrek dapat dipindah ke individu pot (1 pot untuk 1 tanaman).

BAB 7

VARIASI SOMAKLONAL DAN PERMASALAHAN DALAM KULTUR JARINGAN

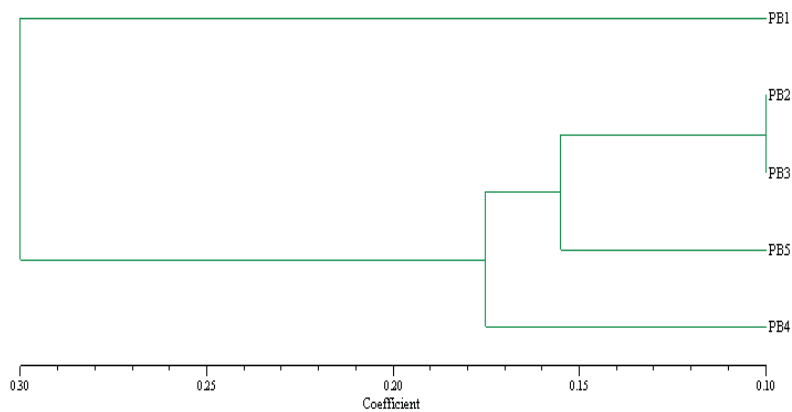
A. Variasi Somaklonal

Variasi somaklonal didefinisikan sebagai variasi genetik dan/atau fenotip yang terjadi diantara populasi tanaman yang diperbanyak secara vegetatif dari satu tanaman donor/tanaman induk (Kaeppler *et al.*, 1998; Kaeppler *et al.*, 2000; Olhoft & Phillips, 1999). Variasi somaklonal dapat diinduksi oleh proses in-vitro atau oleh lingkungan in-vitro.

Variasi somaklonal dapat bersifat genetik ataupun epigenetik. Variasi somaklonal yang bersifat genetik misalnya perubahan jumlah kromosom (poliploidi, euploidi), perubahan struktur kromosom (translokasi, inversi, duplikasi), mutasi gen (transisi, transversasi, insersi, dileksi) serta terjadinya perubahan pada urutan (sekuens) basa-basa DNA. Variasi somaklonal yang bersifat genetik bersifat diturunkan (*heritable*) pada regenerasi berikutnya. Variasi somaklonal yang bersifat epigenetik lebih disebabkan oleh faktor lingkungan yang mempengaruhi ekspresi gen. Kemungkinan bisa terjadi *gene silencing* (*gen off*) atau *gene activation* (*gen on*) dan tidak melibatkan perubahan pada struktur ataupun sekuens DNA. Variasi somaklonal yang bersifat epigenetik ini bersifat tidak permanen atau dapat balik (*reversible*) dan tidak diturunkan pada generasi berikutnya (Kaeppler *et al.* 2000). Perubahan faktor lingkungan akan menyebabkan perubahan pada aktivasi/non-aktivasi gen tertentu yang menyebabkan adanya perubahan fenotip.

Deteksi variasi somaklonal pada hasil perbanyakan melalui kultur in-vitro (misalnya kultur organ) dapat dideteksi sejak dini secara genetik melalui *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD, dibaca Rapid).

RAPD menggunakan beberapa primernon-spesifik yang mengamplifikasi sepenggal DNA secara random dari DNA genom tanaman. Hasil amplifikasi menghasilkan data biner yang nantinya dengan suatu program (misalnya NTSYSpc Version 2.10q) akan menghasilkan suatu dendrogram dengan *similarity coefficient* yang menunjukkan adanya kesamaan/perbedaan secara genetik. Semakin tinggi koefisien, jarak dalam dendrogram akan semakin jauh, menunjukkan adanya perbedaan secara genetik antar dua individu tersebut semakin besar. Gambar 19 melukiskan dendrogram hasil analisis RAPD dari populasi tanaman anggrek *Vanda tricolor* Lindl. yang diperbanyak melalui kultur pangkal batang. Berdasarkan teori, hasil perbanyakan tanaman secara kultur in-vitro akan bersifat seragam secara genetik. Namun hasil penelitian ini (Dwiyani *et al.*, 2014) menunjukkan bahwa variasi genetik terjadi pada populasi tanaman yang diperoleh dari kultur organ dari satu donor tanaman. Diperlukan riset lebih jauh untuk mengidentifikasi tentang variasi genetik ini.



PB 1, PB2, PB3, PB4, PB5 = individu hasil perbanyakan

Gambar 19. Dendrogram hasil analisis RAPD untuk deteksi variasi genetik hasil perbanyakan kultur in-vitro.
(Dwiyani, 2014).

Kultur Jaringan Tanaman

Variasi somaklonal terdeteksi secara fenotipik pada tanaman kelapa sawit yang diperbanyak melalui jalur organogenesis secara tidak langsung atau melalui fase kalus (Gambar 20). Tampak bahwa daun bibit kelapa sawit tersebut memunculkan sifat ‘variegata’ yang seharusnya tidak ada pada daun kelapa sawit yang normal. Kalus sebagai bentuk ‘antara’ dalam organogenesis secara tidak langsung serta subkultur yang dilakukan secara berulang diduga sebagai penyebab terjadinya abnormalitas pada daun kelapa sawit ini.



Skala = 5 cm.

Gambar 20. Variasi somaklonal berupa daun ‘variegata’ pada bibit kelapa sawit yang diperbanyak secara in-vitro melalui jalur organogenesis secara tidak langsung (Dok. pribadi)

Variasi somaklonal tidak selalu bersifat buruk. Kadangkala tanaman yang memiliki karakter unggul muncul secara tidak sengaja pada perbanyakan in-vitro. Hal ini merupakan salah satu bentuk keuntungan dari adanya variasi somaklonal, namun tidak demikian untuk perbanyakan tanaman yang bertujuan menghasilkan klon yang seragam, maka munculnya variasi somaklonal ini tidak diharapkan.

B. Permasalahan dalam Kultur Jaringan

Beberapa permasalahan yang timbul pada kultur tanaman secara in-vitro dapat diringkas sebagai berikut:

Kontaminasi oleh mikroorganisme

Kontaminasi oleh mikroorganisme merupakan permasalahan yang paling utama dalam kultur jaringan dan menyebabkan kegagalan, sehingga kondisi aseptik merupakan persyaratan yang paling utama dalam pekerjaan kultur in-vitro. Hal ini disebabkan karena media kultur mengandung gula dan nutrisi lainnya yang tujuannya untuk pertumbuhan eksplan, namun disisi lain hal ini bisa dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai sumber makanan untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme yang umumnya menjadi sumber kontaminan pada kultur jaringan adalah bakteri dan fungi.

Sumber kontaminasi dapat berasal secara internal dari jaringan eksplan maupun secara eksternal dari luar jaringan eksplan. Secara internal dari jaringan eksplan bisa disebabkan oleh prosedur sterilisasi permukaan (*surface sterilization*) eksplan yang kurang sempurna sehingga eksplan tidak benar-benar bebas dari mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut kemudian tumbuh ketika eksplan ditanam pada media kultur. Prosedur sterilisasi, penggunaan jenis serta konsentrasi bahan sterilan secara tepat merupakan hal yang harus diperhatikan. Hal ini memerlukan *trial* dan *error* karena berbeda untuk jenis spesies dan macam bahan eksplan yang digunakan. Sterilan tidak hanya dapat membunuh mikroorganisme, namun konsentrasi yang terlalu tinggi dapat membunuh jaringan eksplan. Sebaliknya jika konsentrasi terlalu rendah maka proses sterilisasi tidak efektif.

Kontaminan internal juga dapat bersifat *endogenous*, berada di dalam jaringan eksplan sehingga tidak dapat dihilangkan hanya dengan sterilisasi permukaan. Penggunaan tanaman donor yang sehat, pemeliharaan tanaman donor dalam rumah kaca dengan perlakuan penyemprotan pestisida dapat mencegah kontaminan endogen dari

Kultur Jaringan Tanaman

jaringan eksplan. Secara *in vitro*, perendaman eksplan pada larutan antibiotik dapat menghambat pertumbuhan bakteri endogen.

Sumber kontaminan eksternal dapat berasal dari lingkungan kultur seperti media kultur, meja kerja serta pekerja kultur. Proses sterilisasi media yang kurang sempurna menyebabkan adanya bibit mikroorganisme dalam media kultur (misalnya spora jamur) yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang dan kemudian dapat tumbuh dengan waktu. Media kultur sebaiknya digunakan minimal satu minggu setelah dibuat untuk memberikan peluang tumbuhnya bibit-bibit mikroorganisme yang tidak kasat mata, dengan demikian kontaminasi karena sumber kontaminan dari media dapat dihindarkan. Sterilisasi meja kerja (laminar) dengan penyemprotan alkohol dan penggunaan UV diperlukan untuk meminimalisir sumber kontaminan eksternal. Beberapa hal juga harus diperhatikan oleh pekerja kultur untuk mencegah terjadinya kontaminasi, diantaranya: penggunaan masker dan sarung tangan oleh pekerja; penyemprotan tangan dengan alkohol sebelum pekerjaan dimulai; mencelupkan dan membakar *dissecting kit* sebelum digunakan untuk mengiris/mengambil eksplan dalam laminar; membakar (pada api lampu bunsen) bibir botol kultur sebelum dan setelah eksplan ditanam. Penggunaan masker dan sarung tangan juga untuk keselamatan pekerja selain untuk mencegah kontaminasi.

Pencoklatan (*Browning*)

Pencoklatan (*browning*) yang terjadi pada media kultur merupakan permasalahan dalam kultur jaringan karena menyebabkan kematian jaringan eksplan. *Browning* disebabkan oleh eksudasi senyawa fenolik dari jaringan eksplan. Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder terbanyak yang terdapat pada jaringan tanaman. Senyawa fenolik tersebut terekudasi dari jaringan tanaman akibat luka irisan baik ketika eksplan diambil dari tanaman donor maupun ketika preparasi jaringan eksplan.

Eksudasi senyawa fenolik ini menyebabkan aktivasi enzim Polyphenol oxidase (PPO) yang merupakan enzim oksidatif (Litz & Vijayakumar, 1988) sehingga terjadi oksidasi senyawa fenolik yang

menyebabkan kematian jaringan eksplan. Oksidasi senyawa fenolik ini menghasilkan senyawa kuinon yang sangat reaktif dan beracun bagi tanaman sehingga menyebabkan sel-sel tanaman mengalami nekrosis dan mati (Titov *et al.* 2006; Ozyigit, 2008).

Selain enzim PPO, enzim oksidatif lainnya adalah enzim Phenylalanine ammonia lyase (PAL) dan enzim peroxidase (POD), kedua enzim ini merupakan katalisator untuk biosintesis polifenol (Andersone & Ievinsh, 2002; Tabiyeh *et al.* 2002). Selanjutnya Ahmad *et al.* (2013) menyebutkan bahwa PPO dan POD bekerja secara kolektif dalam oksidasi senyawa fenolik, diduga PPO bekerja menstimulasi POD dalam oksidasi senyawa fenolik.

Upaya pencegahan *browning* dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya : Penggunaan arang aktif (*activated charcoal*); penggunaan polyvinylpyrrolidone (PVP); penggunaan antioksidan seperti *ascorbic acid* (asam askorbat) atau *citric acid* (asam sitrat); kultur dalam gelap; dan sub-kultur 2-3 kali dalam periode yang singkat. Pilihan terhadap cara mengatasi *browning* sangat tergantung pada spesies tanaman serta macam eksplan yang digunakan.

Umumnya penggunaan arang aktif dilakukan dengan menambahkan sebanyak 2-3 gram per liter pada media kultur, namun pada spesies tertentu penggunaan arang aktif sebanyak 10 gram per liter baru memberikan hasil dalam mengatasi *browning*. Arang aktif menyerap senyawa fenolik yang tereksudasi dari jaringan eksplan sehingga *browning* pada media dapat dicegah. Arang aktif juga memiliki efek lain pada kultur, yakni merangsang pertumbuhan akar.

PVP mencegah *browning* dengan menyerap senyawa fenolik yang tereksudasi dari jaringan eksplan melalui ikatan hydrogen, mencegah terjadinya oksidasi dan polimerisasi. PVP juga berkombinasi dengan fenolik yang sudah teroksidasi dan mencegah oksidasi lanjutan. Penggunaan PVP dapat dilakukan dengan dua cara, yakni dengan perlakuan pada eksplan maupun ditambahkan pada media. Perlakuan eksplan dilakukan dengan jalan merendam eksplan dengan PVP atau merendam eksplan pada larutan PVP disertai agitasi selama kurang

lebih satu jam. Penggunaan PVP pada media, ditambahkan dengan konsentrasi 0,05% sampai dengan 1%.

Penggunaan antioksidan seperti asam askorbat dilaporkan paling tinggi tingkat keberhasilannya dalam mengatasi *browning* dalam perbanyakan secara *in vitro* terutama untuk tanaman yang mengandung senyawa fenol tinggi seperti pisang (Ko *et al.* 2009). Asam askorbat juga berperan mengatasi kematian eksplan paska infeksi dengan *Agrobacterium tumefaciens* pada transformasi genetik secara *in-vitro* (Dwiyani, 2012). Asam askorbat dikenal sebagai antioksidan yang sangat kuat, pemakan radikal bebas yang dihasilkan jaringan tanaman ketika dilukai, dengan demikian mencegah terjadinya oksidasi. Asam askorbat juga mencegah *browning* dengan jalan menghambat proses oksidasi. Ahmad *et al.* (2013) menyebutkan bahwa asam askorbat tidak berinteraksi secara langsung dengan enzim PPO, tetapi pencegahan *browning* melalui mekanisme penurunan substrat yang teroksidasi, dengan demikian memutus rantai oksidasi.

Subkultur secara cepat (interval pendek) 2-3 kali merupakan metode yang paling mudah untuk mengatasi *browning*. Ahmad *et al.* (2013) menyebutkan bahwa selama proses ini diduga luka irisan tertutup dan menghentikan eksudasi senyawa fenol.

Inkubasi awal kultur dalam gelap juga dapat mengatasi *browning*. George & Sherrington (1984) menyebutkan bahwa penyimpanan kultur dalam gelap dapat mencegah atau menurunkan aktifitas enzim yang terkait dengan biosintesis dan oksidasi fenol.

Vitrifikasi

Vitrifikasi disebabkan oleh kerusakan secara fisiologis pada tanaman sehingga menampilkan fenotip daun atau batang tanaman 'glassy' (bening, seperti gelas). Tanaman hasil perbanyakan secara *in-vitro* seringkali menunjukkan fenotip seperti ini. Keadaan ini akan diikuti oleh nekrosis dan kematian jaringan eksplan atau tanaman..

Vitrifikasi terjadi karena sel-sel tanaman mengandung air yang berlebihan (*hyperhydricity*), defisiensi klorofil, dan kurangnya lignifikasi pada dinding sel. Beberapa faktor yang mempengaruhi

Kultur Jaringan Tanaman

terjadinya vitrifikasi pada tanaman hasil perbanyakan in vitro adalah : jenis pemat, hormon, senyawa organik dan inorganik, temperatur ruang kultur, cahaya dan lingkungan botol kultur (Pasqualetto, 1990). Pada kultur tanaman *Chlorophytum borivilianum* (jenis tanaman obat), Sharma & Mohan (2006) mendapatkan bahwa beberapa hal yang dapat mengurangi vitrifikasi adalah penggunaan botol kultur yang memiliki aerasi; penurunan konsentrasi BAP dari 2 mg/L menjadi 0 mg/L pada saat subkultur; penggunaan sitokinin jenis kinetin dibandingkan jenis BAP.

Uap air yang berlebihan pada botol kultur dapat menyebabkan vitrifikasi. Kondisi ini dapat disebabkan misalnya oleh matinya AC (*Air conditioning*) ruang kultur (misalnya karena daya listrik yang tidak mencukupi) sehingga memicu adanya uap air yang berlebih dalam botol kultur. Dengan demikian ketersediaan daya listrik yang cukup merupakan persyaratan mutlak untuk sebuah laboratorium kultur jaringan.

BAB 8

PENUTUP

Teknik kultur jaringan atau kultur in-vitro adalah teknik menumbuhkan organ, jaringan, sel (atau protoplas) tanaman secara in vitro pada media yang mengandung nutrisi di laboratorium dalam kondisi aseptik. Teknik ini didasari oleh teori totipotensi sel, yaitu teori yang menyebutkan bahwa sel tanaman memiliki potensi untuk tumbuh menjadi tanaman secara utuh.

Teknik ini digunakan untuk berbagai tujuan, yang utamanya adalah untuk memperbanyak tanaman. Perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan ini tergolong perbanyak secara vegetatif dan anakan yang dihasilkan akan sama dengan induknya (*true-to type*). Selain sifat *true to type* pada anakannya, teknik perbanyak dengan cara ini lebih efisien karena dari bahan tanam yang berukuran kecil akan dihasilkan anakan dalam jumlah banyak. Selain itu, area yang dibutuhkan untuk proses perbanyak juga jauh lebih sedikit dibandingkan perbanyak vegetatif konvensional. Bibit tanaman yang dihasilkan dengan kultur jaringan juga lebih bersih dan sehat, sehingga untuk tujuan perdagangan bibit, maka bibit hasil kultur jaringan akan lebih baik.

Teknik perbanyak ini sangat penting artinya terutama untuk memperbanyak tanaman unggul hibrida, tanaman hasil persilangan, tanaman unggul transgenik, tanaman yang tidak memiliki biji, dan tanaman yang bijinya tidak memiliki cadangan makanan. Selain itu melalui kultur meristem (bagian ujung tunas yang meristematik dan tanpa jaringan pembuluh) dapat dihasilkan tanaman bebas virus. Persilangan secara in-vitro melalui kultur dan fusi protoplas juga sudah berhasil dilakukan orang. Hal ini sangat penting untuk mengatasi persilangan antar spesies/kultivar yang inkompatibel jika dilakukan di

lapang. *Embryo rescue* melalui kultur embrio juga dilakukan melalui teknik kultur jaringan. Tujuannya adalah untuk menyelamatkan embrio zigotik hasil persilangan di lapang yang tidak dapat berkembang secara normal atau gugur sebelum menjadi biji.

Pekerjaan rekayasa genetika juga membutuhkan pengetahuan dan keahlian teknik kultur jaringan. Target transformasi yang berupa sel, kalus, protokorm maupun *protocorm like bodies* diproduksi, kemudian ditumbuhkan menjadi tanaman secara utuh untuk menghasilkan tanaman transgenik. Semua proses tersebut harus dilakukan *in vitro*. Oleh karena itu, pengetahuan mengenai sistem regenerasi pada kultur jaringan serta tahap-tahap perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan perlu diketahui dan dipahami oleh mereka yang bekerja pada rekayasa genetika.

Permasalahan yang sering timbul dalam perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan adalah kontaminasi oleh mikroorganisme, browning pada media dan vitrifikasi, yang kesemuanya menyebabkan kematian pada jaringan eksplan. Permasalahan tersebut dapat dicegah dengan melakukan proses kultur dengan benar serta pemeliharaan dan perlakuan terhadap tanaman donor eksplan.

Masalah lainnya yaitu variasi somaklonal yang seringkali menghasilkan fenotip menyimpang dari induknya. Penyimpangan ini dapat bersifat genetik (merubah struktur dan sekuen DNA) maupun epigenetik (disebabkan oleh aktivasi/in-aktivasi gen tertentu karena faktor lingkungan). Namun kadangkala variasi somaklonal dapat bersifat menguntungkan jika penyimpangan tersebut secara tidak sengaja menghasilkan kultivar baru yang unggul.

Penyediaan bibit unggul yang seragam, bersih dan sehat menjadi tantangan dalam bisnis hortikultura ataupun bibit komoditas lainnya di bidang perbenihan di Indonesia. Tantangan ini bisa terjawab melalui perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan sebagaimana yang sudah dilakukan di negara lain. Kebutuhannya akan luas lahan yang relatif sedikit juga memberikan solusi terhadap menyempitnya luas kepemilikan lahan sehingga bisnis bibit dengan perbanyakan *in vitro* akan lebih mudah dikerjakan.

DAFTAR PUSTAKA

- AgriInfo. 2011. Brief history of plant tissue culture (<http://agriinfo.in/default.aspx?page=topic&superid=3&topicid=1881>;diunduh 10 Juli 2015)
- Ahmad I, Hussain T, Ashraf I, Nafees M, Maryami, Raffay M & Iqbal M. 2013. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am-Eurasian J. Agric.* 13 (4): 539-547
- Anderson U & Ievinsh. 2002. Changes of Morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds in vitro. *Ann. Bot.* 90: 293-298
- Burger DW. 1988. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. *Hort. Sci.* 23: 1066-1068
- Dale PJ & Cheyne VA. 1993. The elimination of clover diseases by shoot tip culture. *Ann. Appl. Biol.* 123: 25-32
- Dwiyani R, Purwanto A, Indrianto A & Semiarti E. 2012. Konservasi angrek alam Indonesia *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* melalui kultur embrio. *Bumi Lestari* 12 (1) : 93-98
- Dwiyani R, Yuswanti H & Darmawati IAP. 2014. Detection of genetic variation in micropropagation of *Vanda tricolor* orchid. Makalah disampaikan pada Internatioanal Conference on Bioscience and Biotechnology ke 5 di Denpasar pada 20 September 2014.
- Dwiyani R, Yuswanti H, Darmawati IAP, Suada K & Mayadewi NNA. 2015. In vitro germination and its subsequent growth of an orchid of *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* from Bali on complex additives enriched medium. *Agrivita* 37 (2) : 144-150
- Dwiyani R. 2013. Perkecambahan Biji dan Pertumbuhan Protokorm Angrek dari Buah dengan umur yang berbeda pada media kultur

- yang diperkaya dengan dengan ekstrak tomat. *Jurnal Hortikultura Indonesia* 4(2): 90-93
- Dwiyani R. 2012. Mikropropagasi *Vanda tricolor* Lindl.var. *suavis* yang membawa Gen *KNOTTED1-LIKE Arabidopsis thaliana* (*KNATI*). Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ferrie AMR & Caswell KL. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant cell tissue organ culture* 104: 301-309
- George EF& SherringtonPD. 1984. Plant propagation by tissue culture. Hand book and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd, England.
- Kaeppler SM, Kaeppler HC & Rhee Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 179-188
- Kaeppler SM, Philips RL & Olhoft PM. 1998. Molecular basis of heritable tissue-induced variation in plants. In Jain et al. (Eds) *Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement. Current plant Science & Biotechnology in Agriculture* vol 32. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Netherlands pp 465-484
- Ko WH, Su CC, Chen CL & Chao CP. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 96: 137-141
- Litz RE & Vijayakumar N. 1988. In vitro somatic embryogenesis from the nucellus of mango. *Acta Hort.* 231: 473-475
- Mariani TS, Fitriani A, Teixeira de Silva JA, Wicaksono A& Chia TF. 2011. Micropropagation of *Aglaonema* using Axillary shoot explants. *International J. Basic & Appl. Sci.* 11(1): 27-30
- Naing AH, Chung JD & Lim KB. 2011. Plant Regeneration through Indirect Somatic Embryogenesis in *Coelogyne cristata* Orchid. *Am.J. of Plant Sci* 2: 262-267
- Ngomuo M, Mneney E & Ndakidemi PA. 2014. The in vitro propagation techniques for producing banana using shoot tip culture. *Am. J. of Plant Sci.* 5: 1614-1622

- Olhoft PM & Philips RL. 1999. Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies. *In* HR Lemer (Ed). Plant Responses to Environmental stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization. Marcel Dekker, New York, pp 111-148
- Ozygit II. 2008. Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. *Afr.J. Biotechnol.* 7 (8): 1145-1150
- Pasquolletto PL. 1990. Vitrification in Plant Tissue Culture. *In* Rodriguez *et al.* (Eds) Plant Aging vol. 186, pp 133-137.
- Saad AIM & Elshahed AM. 2012. Plant tissue culture media. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0> (download 03/01/2015)
- Sharma U & Mohan JSS. 2006. Reduction of vitrification in in vitro raised shoots of *Chlorophytum borivilianum* Sant & Fernand, a rare potent medicinal herb. *Indian J. of Experimental Biol.* 44: 499-505
- Tabiyeh DT, Bernard F & Shacker H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on growing in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Hort.* 726: 201-204
- Titov S, Bhowmik SK, Mandal A, Alam MdS & Uddin SN. 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. Kanthali floral bud explant. *Am.J. Biochem. & Biotechnol.* 2 (3): 97-104.
- Tomar UK & Dantu PK. 2010. Protoplast culture and somatic hybridization. *In* Tripathi (Ed) Cellular & Biochemical Science. International Publishing House Pvt Ltd, New Delhi, pp 876-891
- Tudses N, Premjet S & Premjet D. 2014. Optimal condition for high-yield protoplast isolation of *Jatropha curcas* L. and *Ricinus communis* L. *Am. Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 14 (3) : 221-230

GLOSSARIUM

- Aklimatisasi : masa adaptasi tanaman hasil kultur jaringan yang semula kondisinya terkendali menjadi lingkungan yang tidak terkendali (mengubah pola hidupnya dari tanaman heterotrof ke tanaman ototrof). Tujuan dari aklimatisasi adalah untuk mengkondisikan tanaman agar tidak terjadi stress pada waktu ditanam di lapangan.
- Antioksidan : zat yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi.
- Arang aktif : Arang Aktif merupakan arang yang diproses sedemikian rupa sehingga mempunyai daya serap/adsorpsi yang tinggi terhadap bahan yang berbentuk larutan atau uap. Dalam kultur jaringan arang aktif ditambahkan sebagai penyerap senyawa fenol yang tereksudasi dari jaringan eksplan
- Aseptik: Bebas dari mikroorganisme
- Auksin: Kelompok hormon yang dalam kultur jaringan berfungsi menstimulasi pertumbuhan dan pemanjangan akar. Auksin ada yang alami (fitohormon) maupun sintetik. Secara alami dihasilkan pada ujung tunas dan ujung akar.
- Autoklaf: Alat untuk sterilisasi dengan metode *steam heating*.

Kultur Jaringan Tanaman

Bipolar :	Istilah dalam kultur jaringan untuk pertumbuhan ke dua arah (arah tunas/ ke atas dan arah akar / ke bawah) yang dialami sel/jaringan dalam embriogenesis.
Browning :	Istilah pencoklatan yang terjadi pada media akibat oksidasi senyawa fenolik yang menyebabkan kematian jaringan eksplan.
Dediferensiasi :	Istilah terbentuknya sel-sel yang tidak terorganisir (kalus) dari suatu jaringan tanaman yang sudah terdiferensiasi.
DNA :	<i>Deoxyribose Nucleic Acid</i> adalah polynukleotida, berbentukrantai ganda(<i>double stranded</i>) yang mengandung informasi genetik yang menentukan perkembangan biologis dari seluruh bentuk kehidupan sel.
Eksplan :	Bahan tanam awal dalam kultur jaringan / in vitro
Embriogenesis somatik:	Proses terbentuknya embrio dari sel-sel somatik.
<i>Embryo resque</i> :	Istilah dalam kultur jaringan untuk menyelamatkan embrio zigotik yang baru terbentuk melalui kultur embrio.
Fenolik :	Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jaringan tanaman.
In vitro :	Di dalam botol (gelas bening).
Kalus :	Se-sel hidup yang tidak terorganisir.
Kontaminasi :	Terserang oleh mikroorganisme.
Mikropropagasi :	Perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan.
Mikrospora :	Sel kelamin jantan/gamet jantan pada tanaman yang nantinya berkembang menjadi polen atau butir-butir serbuk sari

Kultur Jaringan Tanaman

Monopolar :	Istilah dalam kultur jaringan untuk pertumbuhan ke satu arah (tunas atau akar) dalam organogenesis.
Organogenesis :	Proses terbentuknya organ dari sel/jaringan eksplan yang ditanam.
Pengakaran :	Tahap menumbuhkan akar dalam kultur jaringan dari tunas yang sudah terbentuk.
Plantlet :	Tanaman yang dihasilkan dari perbanyakan melalui kultur jaringan / in vitro.
Ploriferasi :	Perbanyakan bentuk yang sama secara cepat. Misalnya dalam kultur jaringan terjadi proliferasi kalus atau proliferasi tunas.
Polyphenol oxidase(PPO):	Enzim yang bersifat oksidatif dan berperan dalam terjadinya browning dalam kultur jaringan akibat teroksidasinya senyawa fenolik oleh enzim PPO
Propagul :	Istilah dalam kultur jaringan yang berarti bentukan baru yang muncul dari jaringan eksplan, dapat berupa tunas maupun kalus.
Protokorm :	Struktur yang muncul dari biji tanaman anggrek yang berkecambah, berwarna kuning, hijau atau kuning kehijauan.
<i>Protocorm Like Bodies (Plb) :</i>	Struktur yang menyerupai protocorm yang muncul dari kultur sel/jaringan somatik
Protoplas :	Sel tanpa dinding sel
Rekayasa genetika :	Perekayasa terhadap genom tanaman sehingga dihasilkan tanaman transgenik.
<i>Root Apical Meristem :</i>	Meristem ujung akar
<i>Shoot Apical Meristem :</i>	Meristem ujung batang

Kultur Jaringan Tanaman

- Sitokinin : Kelompok hormon tumbuhan yang secara umum berfungsi untuk pembelahan sel (sitokinesis), sedangkan dalam kultur jaringan berfungsi untuk menstimulasi pertumbuhan tunas. Ada yang bersifat sintetik maupun alami. Sitokinin alami dihasilkan di bagian akar tanaman,
- Subkultur : Memindahkan kultur ke media baru untuk tujuan tertentu.
- Kultur Suspensi : Kultur cair
- Totipotensi sel : Kemampuan setiap sel tanaman untuk beregenerasi membentuk tanaman secara utuh.
- Variasi somaklonal: Variasi fenotip menyimpang yang muncul pada anakan hasil perbanyakan melalui teknik kultur jaringan.
- Vitrifikasi : Kondisi tanaman yang sel-selnya mengandung air berlebihan sehingga terjadi kerusakan secara fisiologis, ditandai dengan fenotip organ yang bening (*glassy*).

INDEKS

A

- Aklimatisasi
 - aklimatisasi 32, 38, 39, 70
- Antioksidan
 - antioksidan 70
- Arang aktif
 - arang aktif 25, 62, 70
- Aseptik
 - aseptik 70
- Auksin
 - auksin 70
- Autoklaf
 - autoklaf 70

B

- Bipolar
 - bipolar 71
- Browning
 - browning 61, 71

D

- Dediferensiasi
 - dediferensiasi 71
- DNA
 - DNA 21, 57, 58, 66, 71

E

- Eksplan
 - eksplan 3, 21, 32, 33, 34, 41, 46, 48, 71
- Embriogenesis somatik
 - embriogenesis somatik 40, 71
- Embryo resque
 - embryo resque 71

F

- Fenolik
 - fenolik 71

I

- In vitro
 - in vitro 67, 68, 71

K

- Kalus
 - kalus 4, 41, 43, 54, 59, 71
- Kontaminasi
 - kontaminasi 60, 71
- Kultur Suspensi
 - kultur suspensi 54, 73

Kultur Jaringan Tanaman

M

- Mikropropagasi
 - mikropropagasi 2, 68, 71
- Mikrospora
 - mikrospora 52, 53, 71
- Monopolar
 - monopolar 72

O

- Organogenesis
 - organogenesis 42, 43, 45, 72

P

- Pengakaran
 - pengakaran 32, 37, 72
- Plantlet
 - plantlet 44, 56, 72
- Polyphenol oxidase
 - Polyphenol oxidase 61, 72
- Propagul
 - propagul 4, 35, 72
- Protocorm Like Bodies
 - Protocorm Like Bodies 44, 72
- Protokorm
 - protokorm 56, 67, 72
- Protoplas
 - protoplas 6, 50, 52, 72

R

- Rekayasa genetika
 - rekayasa genetika 4, 72
- Root Apical Meristem
 - Root Apical Meristem 72

S

- Sitokinin
 - sitokinin 73
- Subkultur
 - subkultur 63, 73

T

- Totipotensi sel
 - totipotensi sel 73

V

- Variasi somaklonal
 - variasi somaklonal 57, 59, 73
- Vitrifikasi
 - vitifikasi 63, 73