

# Kultur Jaringan

Teori dan Praktik

- Sejarah, Manfaat & Teori Dasar
- Pola Regenerasi pada Kultur Tanaman *In Vitro*

Buku *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik* ini ditulis berdasarkan pengalaman lebih dari 15 tahun penulis dalam meneliti dan mengajar bidang kultur jaringan tanaman. Buku ini dikhususkan agar bisa dinikmati beragam pembaca, seperti mahasiswa, pelajar, guru, pengusaha, praktisi bidang pertanian, pengambil keputusan, dan siapa saja yang menaruh perhatian pada bidang kultur jaringan tanaman. Penekanan utama dari materi buku ini adalah penjelasan mengenai konsep maupun metode kultur jaringan yang merupakan salah satu ilmu untuk mempelajari aspek fisiologi, bioteknologi, dan perbanyakan tanaman.

**Penerbit ANDI**  
Jl. Beo 38-40 Yogyakarta  
Telp.(0274) 561881 Fax.(0274) 588282  
e-mail : penerbitan@andipublisher.com  
andi.publishing@gmail.com



AGRICULTURE  
ISBN : 978-979-29-7189-7



Harga di Rukay: Jawa: Rp28.000,00



# Kultur Jaringan

Teori dan Praktik

- Sejarah, Manfaat & Teori Dasar
- Pola Regenerasi pada Kultur Tanaman *In Vitro*

## KULTUR JARINGAN - Teori dan Praktik

Oleh : Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc. dan Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.

Hak Cipta ©2018 pada Penulis.

Editor : Arie Pramesta

Desain Cover : Dany Nofiyanto

Setter : Aditya K.

Korektor : Bella Belinda

Hak Cipta dilindungi undang-undang.

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apa pun, baik secara elektronis maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam atau dengan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari Penulis.

Penerbit oleh Penerbit ANDI (Anggota IKAPI)

Jl. Beo 38-40, Telp. (0274) 561881 (Hunting), Fax. (0274) 588282 Yogyakarta 55281

Percetakan: CV ANDI OFFSET

Jl. Beo 38-40, Telp. (0274) 561881 (Hunting), Fax. (0274) 588282 Yogyakarta 55281

**Hapsoro, Dwi**

**KULTUR JARINGAN - Teori dan Praktik / Dwi Hapsoro dan Yusnita**

– Ed. I. – Yogyakarta: ANDI;

27 – 26 – 25 – 24 – 23 – 22 – 21 – 20 – 19 – 18

hlm viii + 168; 16 x 23 Cm.

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

ISBN: 978 - 979 - 29 - 7189 - 7

I. Judul

1. Plant Propagation/Agriculture

2. Yusnita

DDC'23 : 631.53

## Prakata



Alhamdulillahirobbil'alamin. Berkat karunia-Nya, buku ini dapat disajikan ke hadapan para pembaca yang budiman. Buku ini diberi judul "Kultur Jaringan: Teori dan Praktik", yang ditulis berdasarkan pengalaman lebih dari 15 tahun penulis dalam meneliti dan mengajar bidang kultur jaringan tanaman. Isi buku disajikan sedemikian rupa sehingga bisa dinikmati beragam pembaca, seperti mahasiswa, pelajar, guru, pengusaha, praktisi bidang pertanian, pengambil keputusan, dan siapa saja yang menaruh perhatian pada kultur jaringan tanaman.

Buku ini terdiri atas 11 bab. Dua bab pertama (Bab 1. Status Terkini dan Sejarah Kultur Jaringan Tanaman; Bab 2. Manfaat Kultur Jaringan Tanaman untuk Perbanyak Bibit) memperkenalkan kepada pembaca apa itu kultur jaringan tanaman, apa manfaatnya, dan statusnya kini dalam konteks perkembangan keilmuannya. Lalu disajikan sejumlah teori yang melandasi kultur jaringan tanaman (Bab 3. Teori Dasar Kultur Jaringan Tanaman). Kemudian, dari tiga bab ini diharapkan gambaran umum yang utuh mengenai kultur jaringan tanaman sudah diperoleh. Dua bab berikutnya mengantarkan pembaca menuju praktik yang meliputi masalah laboratorium dan bekerja di laboratorium (Bab 4. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman: Fasilitas dan Ruangan; Bab 5. Prosedur Standar Bekerja di

Laboratorium). Bagi yang tidak begitu tertarik dengan aspek teknis, kedua bab tersebut cukup dibaca sekilas, kemudian bisa langsung menuju dua bab berikutnya yang menyajikan aspek teori lebih dalam (Bab 6. Pola Regenerasi pada Kultur Tanaman *In Vitro*; Bab 7. Tahapan Perbanyakkan Tanaman *In Vitro*). Bab 8 dan 9 mengajak pembaca untuk menuju aspek teknis lagi (Bab 8. Teknik Bekerja Aseptik; Bab 9. Formulasi Media Kultur) sehingga bagi pembaca yang kurang tertarik pada aspek teknis, bisa langsung *skip* dua bab ini atau cukup membacanya sekilas. Dua bab terakhir diperuntukkan secara khusus kepada pembaca yang serius ingin mendalami aspek teori untuk mempertajam pisau analisa terhadap aspek regenerasi dari kultur jaringan tanaman (Bab 10. Organogenesis pada Kultur *In Vitro* Tanaman; Bab 11. Embriogenesis Somatik pada Kultur *In Vitro* Tanaman).

Mudah-mudahan buku ini bermanfaat. Tiada gading yang tak retak. Saran dan kritik sangat penulis harapkan untuk perbaikan buku ini.

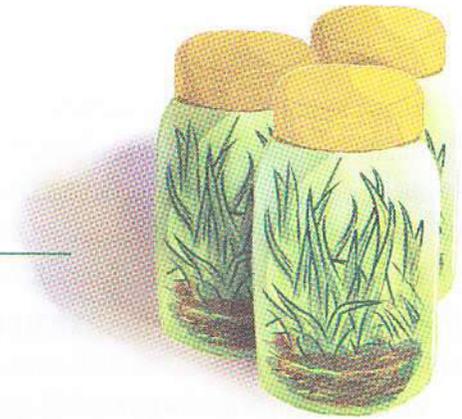
Gedong Meneng, Oktober 2018

Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.

Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.



## Daftar Isi



<b>PRAKATA</b> .....	iii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	v
<b>BAB 1   STATUS TERKINI DAN SEJARAH KULTUR JARINGAN TANAMAN</b> .....	1
Status Terkini Kultur Jaringan Tanaman .....	1
Sejarah Kultur Jaringan Tanaman.....	3
<b>BAB 2   MANFAAT KULTUR JARINGAN TANAMAN UNTUK PERBANYAKAN BIBIT</b> .....	17
Pembiasaan Tanaman dan Produksi Benih atau Bibit.....	17
Karakteristik Kultur Jaringan Tanaman.....	22
Keuntungan Perbanyakkan Tanaman dengan Teknik Kultur Jaringan.....	24
<b>BAB 3   TEORI DASAR KULTUR JARINGAN TANAMAN</b> .....	27
Sel Tanaman Bersifat Totipoten dan Mempunyai Kelenturan Morfogenetik.....	27
Morfogenesis sebagai Suatu Proses Perkembangan, Terdiri dari Beberapa Fase Seluler yang Berurutan.....	31
Sinyal Hormonal pada Morfogenesis .....	32
Morfogenesis Tanaman <i>In Vitro</i> Mensyaratkan Ketersediaan Hara Esensial, Suplai Energi, dan ZPT yang Sesuai.....	34
<b>BAB 4   LABORATORIUM KULTUR JARINGAN TANAMAN: FASILITAS DAN RUANGAN</b> .....	37
Ruang Persiapan Media .....	38
Ruang Transfer .....	40

Ruang Kultur.....	40
Ruang Diskusi .....	41
Ruang Kantor .....	42
Ruang Simpan .....	42
Ruang Cuci .....	43
<b>BAB 5   PROSEDUR STANDAR BEKERJA DI LABORATORIUM .....</b>	<b>45</b>
Penimbangan Senyawa Kimia .....	45
Pembuatan dan Pengukuran Volume Larutan .....	47
Konsentrasi Larutan dan Satuannya .....	48
Larutan dalam Konsentrasi Molar.....	49
Konversi Konsentrasi Molar menjadi mg/l atau Sebaliknya.....	51
Cara Melarutkan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) .....	52
<b>BAB 6   POLA REGENERASI PADA KULTUR TANAMAN IN VITRO .....</b>	<b>55</b>
Pola Regenerasi Tanaman <i>In Vitro</i> .....	55
Percabangan Tunas Aksilar dan Kultur Tunas Tunggal .....	55
Organogenesis.....	59
Embriogenesis Somatik .....	59
<b>BAB 7   TAHAPAN PERBANYAKAN TANAMAN IN VITRO .....</b>	<b>61</b>
Tahap 0: Pemilihan dan Penanganan Tanaman Induk .....	61
Tahap I: Pembuatan Kultur Awal yang Aseptik .....	67
Tahap II: Perbanyak Propagul .....	71
Tahap III: Pemanjangan dan Pengakaran Tunas .....	74
Tahap IV: Aklimatisasi Planlet ke Lingkungan <i>Ex Vitro</i> .....	75
<b>BAB 8   TEKNIK BEKERJA ASEPTIK.....</b>	<b>81</b>
Permukaan Eksplan dalam Keadaan Septik.....	81
Kebersihan Pakaian dan Anggota Badan Operator.....	83
Sterilisasi Eksplan .....	84
Disinfektan untuk Sterilisasi Eksplan.....	85
Sterilisasi Alat-Alat Tanam .....	86

Sterilisasi Akuades dan Media Kultur.....	88
Prosedur Penanaman Eksplan dan Subkultur secara Aseptik.....	88

## **BAB 9 | FORMULASI MEDIA KULTUR .....**

Formulasi dan Komponen Media untuk Kultur Jaringan Tanaman ..	93
Formulasi Media Dasar untuk Kultur <i>In Vitro</i> Tanaman .....	100
Cara Membuat Media Kultur Jaringan .....	102
Perlunya Membuat Larutan Baku (Larutan Stok) .....	103
Pembuatan Larutan Stok Hara Makro Murashige dan Skoog (1962) dengan Konsentrasi 10x Formulasi MS .....	104
Pembuatan Larutan Stok $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100x Formulasi MS.....	106
Pembuatan 1000 Mililiter Larutan Stok Hara Mikro 1000x MS .....	106
Pembuatan 1 Liter Stok Sumber Besi ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) pada Konsentrasi 100x Formulasi MS.....	109
Pembuatan 1 Liter atau 1000 Mililiter Stok Vitamin (Tiamin-HCl, Asam Nikotinat, Piridoksin-HCl, dan Glisin) 100x MS.....	110
Pembuatan 1 Liter Larutan Stok Mioinositol 10x MS .....	111
Pembuatan Larutan Stok ZPT.....	112
Peracikan Media Kultur Jaringan dari Berbagai Larutan Stok.....	113

## **BAB 10 | ORGANOGENESIS PADA KULTUR IN VITRO TANAMAN .....**

Organogenesis sebagai Proses Perkembangan Tanaman .....	118
Dediferensiasi, Kompetensi, Induksi, Determinasi, dan Diferensiasi .....	119
Aplikasi Organogenesis dalam Bioteknologi Tanaman .....	124
Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Organogenesis .....	124

## **BAB 11 | EMBRIOGENESIS SOMATIK PADA KULTUR IN VITRO TANAMAN .....**

Embriogenesis Somatik Langsung dan Tidak Langsung.....	134
Pada Embriogenesis Terjadi Perubahan Ekspresi Gen.....	134
Konsep Induksi-Ekspresi pada Embriogenesis Somatik .....	135
Peranan Auksin pada Embriogenesis Somatik .....	136
Maturasi Embrio Somatik dan Perkecambahan.....	142

DAFTAR PUSTAKA .....	143
DAFTAR ISTILAH ( <i>GLOSSARY</i> ) .....	153
TENTANG PENULIS.....	163
INDEKS .....	165

## Bab 1

### *Status Terkini dan Sejarah Kultur Jaringan Tanaman*



#### **Status Terkini Kultur Jaringan Tanaman**

Teknik kultur jaringan tanaman (*plant tissue culture technique*) tidak dapat dipisahkan dari berbagai teknologi terkini yang mewarnai kemajuan bidang pertanian. Kultur jaringan tanaman berasal dari kata “kultur” (*to culture* atau *to cultivate*) yang berarti membudidayakan atau mengondisikan agar dapat tumbuh dan berkembang; serta “jaringan tanaman” (*plant tissue*) yang berarti kumpulan sel tanaman yang mempunyai fungsi tertentu. Jadi, secara harfiah, kultur jaringan tanaman adalah membudidayakan jaringan tanaman. Namun demikian, kultur jaringan tanaman yang kini merupakan terminologi populer di dunia dapat dikatakan sebagai terminologi salah kaprah atau sesuatu yang kurang tepat, tetapi sudah terlanjur diterima masyarakat luas. Kultur jaringan tanaman bukan hanya berarti pengulturan jaringan tanaman, melainkan didefinisikan sebagai pengulturan secara aseptik bagian tanaman. Hal tersebut bisa berupa sel, jaringan, organ, embrio, biji, atau tanaman utuh di dalam tabung (secara *in vitro*) dengan media buatan berisi nutrisi lengkap, sumber energi, dan bahan lain yang diperlukan tanaman (hampir selalu memerlukan zat pengatur tumbuh) dalam kondisi lingkungan fisik maupun kimia yang terkontrol.



Saat ini, kultur jaringan merupakan teknik penting, baik dalam keilmuan, seperti biokimia, biologi molekuler, pemuliaan tanaman, bioteknologi pertanian, maupun dalam aplikasi komersial pada industri bibit tanaman (Thorpe, 2006; Rout *et. al.*, 2006; Singh and Shetty, 2011). Hingga kini, penggunaan teknik kultur jaringan tanaman di bidang pertanian meliputi (Yusnita, 2015):

1. Perbanyak vegetatif tanaman secara cepat dalam skala besar.
2. Produksi tanaman bebas penyakit, terutama yang disebabkan oleh virus melalui kultur meristem.
3. Produksi tanaman haploid maupun *double haploid* melalui kultur mikrospora, polen, dan ovul untuk *mem-by pass* silang dalam berkali-kali sebagai upaya mendapatkan galur-galur murni berbagai tanaman.
4. Produksi metabolit sekunder dalam kultur *in vitro* untuk bahan farmasi.
5. Memfasilitasi metode regenerasi tanaman yang efisien untuk rekayasa genetika tanaman.
6. Induksi mutasi maupun keragaman somaklonal untuk mendapatkan tanaman mutan sekaligus somaklon dengan karakter unggul, misalnya ketahanan terhadap penyakit, ketahanan terhadap salinitas tinggi, warna bunga yang unik, dan sebagainya.
7. Induksi pembungaan dan pembuahan (*in vitro fertilization*), serta *embryo rescue* untuk mempercepat program pemuliaan tanaman.
8. Kultur jaringan sebagai sistem terkontrol untuk studi fisiologi pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

9. Produksi benih sintetik dengan enkapsulasi embrio somatik atau mata tunas mikro.
10. Pertukaran plasma nutfah, penyimpanan, dan konservasinya.
11. Mendapatkan varietas baru melalui kultur dan penggabungan (fusi) protoplas.

---

### Sejarah Kultur Jaringan Tanaman

**Teori totipotensi sel.** Penggunaan sistem kultur *in vitro* atau kultur jaringan tanaman berawal dari hampir dua abad yang lalu sejak 1838-1839 ketika Mathias Jacob Schleiden (1804-1881) dan Theodor Schwann (1810-1882) mempostulatkan teori sel. Artinya, bahwa setiap tanaman dan hewan merupakan agregat atau kumpulan dari entitas individu terpisah yang bersifat autonomi, yaitu sel-sel. Sel merupakan satuan struktur dasar bagi semua organisme hidup (Vasil, 2008). Schleiden dan Schwann menghipotesiskan bahwa sel tanaman serta hewan mempunyai sifat autonomi, baik secara fisiologi maupun biokimia. Oleh sebab itu, jika dikondisikan pada lingkungan yang sesuai, sel-sel itu akan dapat tumbuh dan berkembang menjadi organisme utuh. Sebagian pernyataan Schwann yang penting sehubungan dengan teori sel yang dikemukakan adalah sebagai berikut:

*“Terdapat dua hipotesis berkenaan dengan asal muasal fenomena dalam organisme hidup, misalnya pada pertumbuhan, yaitu pertumbuhan merupakan fungsi dari organisme tersebut secara utuh. Selain itu, pertumbuhan tidak terjadi karena suatu kekuatan yang berada dalam organisme tersebut secara utuh, namun setiap bagian dari organisme tersebut memiliki kekuatan tersendiri sebagai faktor pengontrolnya.”*

Sebagai contoh, pada tanaman tingkat rendah, sel-selnya dapat dipisahkan dari induknya dan tetap tumbuh. Jadi, tanaman tersebut mungkin terdiri dari sel-sel yang mempunyai kapasitas secara individu untuk dapat hidup secara mandiri. Kenyataan bahwa tidak semua sel apabila dipisahkan dari organisme tersebut dapat tumbuh, tidak dapat dipandang sebagai sebuah argumentasi yang bertentangan dengan teori ini. Namun demikian, dapat dianalogikan dengan kenyataan bahwa seekor lebah akan segera mati jika terpisah dari kelompoknya, yaitu fenomena valid tentang kehidupan individu seekor lebah.

Berdasarkan pernyataan di atas, Schwann mengemukakan bahwa pengontrolan suatu fenomena yang terjadi pada organisme (termasuk tanaman), misalnya pertumbuhan, mungkin terjadi pada dua level, yaitu:

1. Pertumbuhan merupakan fungsi yang dikontrol pada level organisme utuh.
2. Pertumbuhan ditentukan oleh setiap bagian tanaman (sel, jaringan, atau organ), di mana masing-masing memiliki pengaruh secara individu, bagaikan suatu kehidupan yang terpisah.

Pertanyaan berikutnya yang menjadi begitu penting untuk dijawab oleh para ahli biologi tanaman lebih dari seabad kemudian adalah:

*"Apakah sel-sel tanaman memang dapat dipandang sebagai agen independen yang dapat tumbuh maupun berkembang menjadi organisme dewasa atau sel-sel tersebut adalah produk eksternal dari sebuah kekuatan terorganisasi dari suatu tahapan dalam kehidupan organisme utuh?"*

Melalui berbagai studi dan bukti empiris terhadap pertanyaan atau yang menjawab hipotesis dari teori sel tersebut, dapat disimpulkan bahwa sel tidak hanya merupakan komponen struktural, fisiologi, maupun perkembangan (*developmental*), namun juga merupakan unit reproduksi dari kehidupan suatu organisme (Muller-Wille, 2010).

Berdasarkan postulat ini maka pada tahun 1902 seorang ahli fisiologi tanaman berkebangsaan Jerman, Gottlieb Haberlandt, untuk pertama kali melakukan eksperimen pengulturan sel palisade daun pada larutan garam mineral Knop's yang diperkaya dengan sukrosa. Setelah satu bulan dalam kultur, sel tersebut masih hidup dan ukurannya membesar, namun gagal membelah. Pekerjaan Haberlandt memang belum berhasil pada saat itu, namun oleh para ahli fisiologi tanaman, Haberlandt dianggap telah meletakkan konsep dasar teori totipotensi. Selain itu, membuka peluang besar dilakukannya pendekatan baru dalam eksperimen mengisolasi sel tanaman dalam larutan hara mineral serta meneliti berbagai faktor yang memengaruhi pertumbuhan maupun perkembangan tanaman. Penelitian Haberlandt juga telah membuka pandangan sekaligus keingintahuan yang mendalam dari para ahli ilmu tanaman tentang hubungan antarsel, jaringan, dan organ tanaman dalam tanaman utuh pada proses pertumbuhan maupun perkembangannya. Atas penelitiannya tersebut, Haberlandt dianggap sebagai pionir dalam sejarah kultur jaringan sehingga dinobatkan sebagai Bapak Kultur Jaringan Tanaman (Thorpe, 2006).

Setelah percobaan Haberlandt, berbagai temuan penting telah berperan dalam mengukir tahap demi tahap perkembangan kultur jaringan tanaman dan bioteknologi pertanian. Berikut adalah tonggak-tonggak bersejarah terpenting dalam

perkembangan teknik kultur jaringan dan bioteknologi tanaman (Murashige, 1988; Thorpe, 2006; Staba, 1985; dan de Maagd *et al.*, 1999):

- 1838- Dikemukakannya teori sel oleh **Schwann & Schleiden**  
1839 bahwa pada prinsipnya sel-sel tanaman bersifat autonomi.
- 1892 **Von-Sachs** mendapatkan bahwa tanaman menyintesis senyawa-senyawa pembentuk organ yang terdistribusi di dalam sel-sel secara polar.
- 1902 **Haberlandt** melakukan upaya pertama kultur jaringan tanaman.
- 1904 **Hannig** melakukan upaya kultur embrio tanaman dari famili *Cruciferae* untuk pertama kali.
- 1909 **Kuster** melakukan penelitian fusi protoplas, namun tanaman hasil fusi tidak dapat bertahan hidup.
- 1922 **Knudson** melakukan pengecambahan biji anggrek asimbiotik *in vitro*.
- 1922 **Robbins & Kotte** mengisolasi maupun mengkulturkan ujung akar *in vitro*.
- 1925- **Laibach** melakukan penyelamatan embrio untuk  
1929 mengatasi inkompatibilitas persilangan interspesies dari *Linum*.
- 1934 **White** berhasil mengkulturkan akar tomat yang meristematik di media yang mengandung garam-garam mineral, *yeast extract*, sukrosa, dan vitamin B (piridoksin, tiamin, serta asam nikotinat).

**Gautheret** pertama kali berhasil mengkulturkan jaringan kambial *Acer pseudoplatanus* maupun *Ulmus campestre* di media agar yang mengandung garam-garam Knop's, glukosa, dan cistein-HCl untuk mempelajari pembentukan tunas adventif.

1936 **La-Rue** berhasil mengkulturkan embrio beberapa Gymnosperm.

1939 **Gautheret & Nobecourt** berhasil mengkulturkan jaringan tumor *Nicotiana glauca* dan *Nicotiana langsdorfii* hibrida yang tanpa diberi auksin dapat tumbuh secara terus-menerus serta terdiferensiasi menjadi akar maupun tunas.

Berikutnya, dengan telah ditemukannya IAA dan penambahan media dengan vitamin B, **Gautheret & Noubecort** berhasil mengkulturkan jaringan akar wortel.

1940 Penemuan HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) oleh Firma Riset dan Pengembangan **Arthur D. Little**, USA. HEPA filter bekerja dengan menyaring udara melalui saringan yang sangat halus, yaitu sekitar 0,3 mikron. Dengan demikian, memungkinkan udara yang dihembuskan melalui filter ini bebas dari kontaminasi mikroorganisme atau partikel berbahaya lainnya. Penemuan filter HEPA memberikan kemajuan signifikan pada teknik kultur jaringan yang mensyaratkan kondisi kultur aseptik.

- 1941 **Van-Overbeek** beserta stafnya pertama kali menggunakan air kelapa yang mengandung faktor perangsang pertumbuhan dan perkembangan untuk mengkulturkan embrio *Datura* serta jaringan kanker batang.
- 1944 **Skoog** pertama kali menggunakan jaringan tembakau untuk studi pembentukan tunas adventif *in vitro*.
- 1945 **Loo** melaporkan keberhasilan pengulturkan potongan ujung tunas asparagus *in vitro*.
- 1946 **Ball** pertama kali mendapatkan tanaman *Lupinus* dan *Tropaeolum* dari eksplan pucuk tunas.
- 1948 **Skoog & Tsui** melaporkan bahwa pembentukan tunas dan akar adventif tembakau ditentukan oleh nisbah auksin maupun adenin di dalam media.
- 1950 **Ball** melaporkan bahwa kalus *Sequoia sempervirens* dapat berregenerasi menjadi organ.
- 1952 **Morel & Martin** berhasil mendapatkan tanaman dahlia bebas virus dari eksplan meristem.  
Morel dan Martin berhasil mengaplikasikan *micrografting*.
- 1953 **Tulecke** berhasil mendapatkan kalus haploid dari pollen *Ginkgo biloba*.
- 1954 **Strauss** berhasil memonitor perubahan jumlah dan perilaku kromosom pada kultur endosperm jagung.
- 1955 **Miller dkk.**, menemukan kinetin, hormon sitokinin perangsang pembelahan sel.
- 1956 **Tulecke & Nickell** merealisasikan kultur sel suspensi untuk menghasilkan produk sekunder (Staba, 1985).
- 1957 **Skoog & Miller** memublikasi pengaturan hormonal terhadap pembentukan organ (tunas dan akar) pada kultur tembakau oleh perubahan nisbah sitokinin/auksin.
- 1958 **Maheshwari & Rangaswamy** berhasil meregenerasikan embrio somatik *Citrus ovules in vitro* dari nucellus.  
**Reinert & Steward** berhasil meregenerasikan proembrio dari kultur kalus maupun kultur sel suspensi wortel (*Daucus carota*).
- 1959 *Handbook* kultur jaringan tanaman yang lengkap dipublikasi pertama kali oleh **Gautheret**.
- 1960 **Kanta** pertama kali melakukan fertilisasi *in vitro* pada *Papavar rhoeas*.  
**Cocking** berhasil melakukan *enzymatic degradation* untuk mendapatkan sejumlah besar protoplas. Isolasi protoplas merupakan langkah awal dari kultur protoplas.  
Morel berhasil melakukan perbanyakan vegetatif anggrek *in vitro* melalui kultur meristem.  
**Bergmann** berhasil melakukan filtrasi pada kultur sel suspensi dan mengisolasi sel-sel tunggal melalui *plating*.

- 1962 **Murashige & Skoog** memublikasi formulasi media MS yang hingga kini terbukti sesuai untuk pengulturan *in vitro* berbagai jenis tanaman.
- 1962 **Whitfield**, ahli fisika dari Sandia National Laboratories, USA, menemukan *laminar-flow cleanroom/cabinet*. Penemuan ini memberikan dampak yang signifikan terhadap kemajuan bioteknologi, nanoteknologi, dan bidang kesehatan.
- 1964 **Guha & Maheshwari** berhasil meregenerasi tanaman dari pollen *Datura* spp.  
**Mathes** berhasil meregenerasi tunas dan akar dari kalus *Populus tremuloides*.
- 1965 **Aghion-Prat** berhasil menginduksi pembungaan *in vitro* pada kultur tembakau.  
**Vasil & Hildebrant** berhasil meregenerasi tanaman tembakau dari kultur sel tunggal.
- 1967 **Pierik** berhasil menginduksi pembungaan pada *Lunaria annua* dengan vernalisasi *in vitro*.  
**Bourgin & Nitsch** mendapatkan tanaman-tanaman tembakau haploid dari kultur pollen.
- 1969 **Acristan & Melchers** melakukan analisis karyologi (penghitungan kromosom) pada tanaman tembakau yang diregenerasi dari kalus *in vitro*.  
**Eriksson & Jonassen** pertama kali berhasil mengisolasi protoplas dari kultur suspensi *Hapopappus gracilis*.

- 1970 **Carlson** pertama kali menyeleksi tanaman mutan dari kultur *in vitro*.  
**Kasha & Kao** menggunakan kultur embrio untuk mendapatkan tanaman barley monoploid.  
**Power dan rekan** pertama kali berhasil melakukan fusi protoplas.
- 1971 **Takebe dkk.**, pertama kali meregenerasi tanaman dari kultur protoplas.
- 1972 **Carlson dkk.**, berhasil melakukan hibridisasi interspesifik pada *Nicotiana* melalui fusi protoplas.
- 1973 **Murashige dkk.**, mendapatkan bahwa sitokinin dapat memecahkan dormansi pada eksplan *Capitulum gerbera*.
- 1974 **Murashige dkk.**, berhasil menginduksi percabangan tunas aksilar pada eksplan pucuk tunas *Gerbera*.  
**Binding** berhasil meregenerasikan tanaman *Petunia* hibrida haploid dari kultur protoplas.  
**Melchers & Labib** mendapatkan tanaman hibrida dari hasil fusi protoplas haploid.  
**Reinhard** melaporkan biotransformasi dalam kultur jaringan tanaman.  
**Zaenen dkk.; Larebeke dkk.**, menemukan bahwa *Ti-plasmid* adalah penginduksi tumor pada *Agrobacterium*.
- 1975 **Gengenbach & Green** melakukan seleksi positif pada kultur kalus jagung yang resisten terhadap *Helminthosporium maydis*.

1976 **Seibert** berhasil menginisiasi tunas dari pucuk tunas Carnation yang disimpan dalam suhu sangat rendah dengan cara *Cryopreservation*.

**Power dkk.**, berhasil mendapatkan hibrida interspesifik dari fusi protoplas *Petunia hybrid* dengan *Petunia parodii*.

**Bomhoff dkk.**, menemukan bahwa sintesis, *breakdown* oktopin, dan nopalinn dikontrol secara genetik oleh *Ti-plasmid* pada *Agrobacterium tumefaciens*.

**Chilton dkk.**, berhasil mengintegrasikan DNA *Ti-plasmid* *Agrobacterium tumefaciens* di dalam tanaman.

1978 **Melchers dkk.**, berhasil mendapatkan tanaman hibrida somatik kentang dengan tomat dari fusi protoplas.

1979 **Martons dkk.**, menemukan prosedur kokultivasi untuk transformasi protoplas tanaman dengan *Agrobacterium*.

1981 **Larkin & Scowcroft** mengenalkan terminologi keragaman somaklonal pada tanaman.

**Siderov dkk.**, isolasi auxotrophs dengan cara skrining berskala besar pada koloni-koloni sel yang berasal dari protoplas haploid *Nicotiana plumbaginifolia*, di mana diperlakukan dengan agensia mutagen.

1982 **Krens dkk.**, mendapatkan bahwa protoplas dapat menerima (berinkorporasi dengan) DNA hasil isolasi sehingga memungkinkan dilakukannya transformasi dengan DNA.

**Zimmermann** menemukan fusi protoplas dengan stimulus elektrik.

1983 **Pelletier dkk.**, berhasil melakukan hibridisasi sitoplasmik intergenerik melalui fusi protoplas *radish* dengan *rape*.

1984 **Paszowski dkk.**, berhasil melakukan transformasi sel tanaman dengan DNA plasmid.

**Jeffreys** berhasil mengembangkan teknik sidik jari DNA untuk mengidentifikasi individu tanaman dengan menganalisis polimorfisme pada level sekuens DNA.

1985 **Horsch dkk.**, berhasil mentransformasi gen melalui infeksi maupun transformasi potongan daun (*leaf disc*) dengan *Agrobacterium tumefaciens* dan regenerasi tanaman transgenik.

1986 **Powell-Abel dkk.**, berhasil mengembangkan tanaman tembakau dan tomat transgenik resisten virus menggunakan gen penyandi *coat protein* TMV.

1987 **Sanford dkk.; Klein dkk.**, mengembangkan transfer gen menggunakan biolistik (*gene-gun*) dengan *particle bombardment* untuk transformasi gen pada tanaman.

**Barton dkk.**, berhasil mengisolasi gen *Bt* dari bakteri *Bacillus thuringiensis* dan mendapatkan tanaman tembakau transgenik yang mengekspresikan delta-endotoksin sehingga resisten terhadap serangga Lepidoptera.

**Fischhoff dkk.**, mendapatkan tanaman tomat transgenik toleran serangga.

- 1995 **Monsanto**, USA, pertama kali melepaskan kentang-*Bt* transgenik New Leaf™, yang mengekspresikan protein Cry3A untuk perlindungan tanaman terhadap kumbang kentang Colorado. Artinya, dengan penanaman kentang -*Bt* ini penggunaan insektisida berkurang sebesar 40%.
- 1996 **Monsanto** (USA) melepas varietas kapas-*Bt* (Bollgard™) untuk perlindungan terhadap hama kapas, seperti *tobacco budworm*, *cotton bollworm*, dan *pink bollworm*. Beberapa perusahaan mengembangkan jagung -*Bt* dan mengomersialkan penggunaannya dengan memberikan lisensi kepada perusahaan benih, misalnya Novartis, Basel, Switzerland, dengan nama dagang YieldGard™, Knockout™, dan BiteGard™; Monsanto dengan nama dagang YieldGard™; serta DEKALB Genetics, IL, USA dengan nama dagang Bt-Xtra™. Kemudian, kecuali Bt-Xtra™, semua jagung transgenik tersebut memproduksi protein Cry1Ab. Artinya, dari hasil percobaan di lapangan ditunjukkan bahwa jagung-*Bt* transgenik tersebut mampu mengendalikan 99% hama generasi pertama larva penggerek batang jagung European.
- 1997 Tanaman transgenik kentang-*Bt* mendapat izin untuk dikembangkan di Kanada, Jepang, Meksiko, dan Georgia (dulunya Republik Soviet). Tanaman kapas-*Bt* mendapat izin untuk ditanam di Australia, Cina, Meksiko, Afrika Selatan, dan Amerika Serikat (AS). Tanaman jagung Bt-transgenik mendapat izin untuk dikembangkan di Argentina, Kanada, Jepang, AS, dan di Masyarakat Ekonomi Eropa (MEE).

Saat ini, penggunaan teknik kultur jaringan yang secara langsung berhubungan dengan hajat orang banyak di Indonesia adalah untuk perbanyakan bibit secara massal, misalnya produksi bibit pisang, kentang, jati, tebu, anggrek, dan berbagai jenis tanaman hias lain. Di samping itu, di perusahaan perbenihan teknik kultur jaringan digunakan untuk menghasilkan berbagai jenis sayuran, tanaman hias haploid, dan *double-haploid* terutama melalui kultur mikrospora maupun kultur ovul. Pada skala riset, teknik kultur jaringan banyak dilakukan di laboratorium berbagai universitas untuk mencari protokol regenerasi, perbanyakan *in vitro* berbagai tanaman, studi fisiologi tanaman, untuk memfasilitasi rekayasa genetika dan sebagai sarana implementasi tridarma perguruan tinggi (pada aspek pendidikan, penelitian, serta pengabdian kepada masyarakat).



## Bab 2

### *Manfaat Kultur Jaringan Tanaman untuk Perbanyak Bibit*



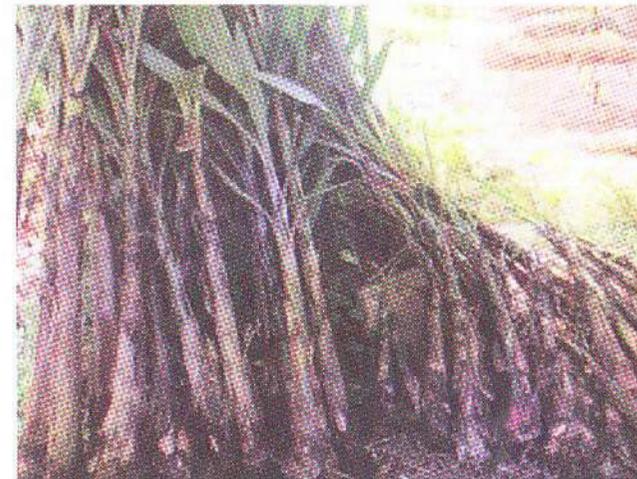
#### **Pembiakan Tanaman dan Produksi Benih atau Bibit**

Sebagai makhluk hidup, tanaman berkembang biak. Apabila berbiak secara seksual atau kawin maka dibutuhkan pertemuan antara gamet jantan dan betina. Setelah kedua sel gamet itu menyatu, terjadilah zigot lalu zigot berkembang melalui tahapan tertentu menjadi embrio dan tanaman utuh. Apabila berbiak secara tak kawin maka tidak dibutuhkan bertemunya gamet jantan dan betina. Artinya, yang dibutuhkan adalah sel tubuh, disebut juga sel somatik, berkembang melalui tahapan tertentu sampai menjadi tanaman utuh. Pemahaman mengenai kedua jalur perkembangan itu bermuara pada pemanfaatannya untuk bidang perbenihan dan pemuliaan. Perbenihan berurusan dengan bagaimana memproduksi benih berkualitas tinggi. Pemuliaan berurusan dengan bagaimana menghasilkan varietas-varietas unggul.

Pada budi daya tanaman, ketersediaan benih adalah masalah penting. Menurut Undang-Undang Republik Indonesia No. 12 Tahun 1992 tentang Sistem Budi Daya Tanaman, Bab I ayat 4, benih tanaman, selanjutnya disebut **benih** adalah tanaman atau bagiannya yang digunakan untuk memperbanyak dan/atau mengembangbiakkan tanaman.

Benih dapat berwujud biji (*seed*) atau material tanaman lainnya yang lazim disebut bibit, misalnya tanaman kecil hasil kultur jaringan, penyetekan, cangkok, penyambungan, dan okulasi. Dalam agrobisnis, benih atau bibit harus tersedia cukup pada waktu dibutuhkan. Mutunya harus tinggi agar dihasilkan panen yang tinggi dari segi kuantitas maupun kualitasnya. Untuk memenuhi kebutuhan benih yang berwujud biji, pada banyak kasus lebih mudah daripada jika benih itu berupa bukan biji, misalnya berupa tanaman kecil. Kemudian, untuk selanjutnya, dalam tulisan ini, benih yang bukan biji disebut bibit.

Masalahnya adalah banyak tanaman penting, seperti pisang, nanas, tebu, jati, nilam, dan sebagainya, benihnya berupa bibit sehingga penyediaannya relatif lebih sulit, terutama jika budi dayanya dilakukan dalam skala besar. Sebagai contoh adalah tanaman pisang dan nanas. Secara tradisional bibit pisang adalah anakan (*suckers*) (Gambar 2.1) yang tumbuh di sekitar tanaman induknya atau tunas dari belahan bonggol. Anakan-anakan ini tumbuh dari mata-mata tunas yang berada di bonggol atau batang induknya. Beberapa jenis pisang tidak banyak menghasilkan anakan per rumpun sehingga untuk penanaman dalam skala luas sangat sulit untuk dilakukan. Problem lainnya adalah anakan-anakan ini sering kali tidak seragam ukurannya, yang berarti tidak seragam tingkat kedewasaannya, berarti pula tidak seragam masa panennya. Masalah ketidakseragaman ini menyebabkan praktik agrobisnis tidak bisa diterapkan secara optimal. Di samping itu, penggunaan anakan pisang untuk bibit berpotensi membawa inokulum patogen jika rumpun tanaman induk sudah terkena penyakit. Masalah ini dapat diatasi dengan penerapan teknik kultur jaringan tanaman, sebab teknik ini dapat digunakan untuk memproduksi bibit sehat yang seragam dalam jumlah besar (Gambar 2.2) dalam waktu relatif singkat.



**Gambar 2.1** Bibit pisang dari anakan, ukurannya sering kali tidak seragam dan berpotensi membawa inokulum patogen



**Gambar 2.2** Bibit pisang asal kultur jaringan, seragam, lebih sehat, dan dapat diproduksi dalam jumlah besar

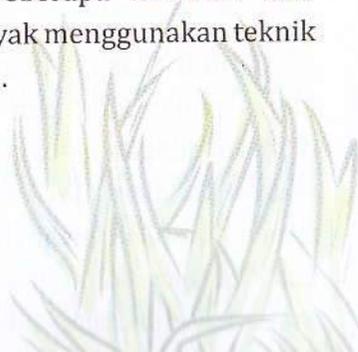
Contoh kasus pembibitan lainnya adalah penanaman nanas pada skala perkebunan besar. Nanas pada umumnya ditanam dengan menggunakan bibit yang berupa mahkota buah (*crown*), anakan (*suckers*), *slip*, atau setek mikro dari potongan *crown*. Apabila pertanaman nanas berskala perkebunan sudah ada dan akan dilakukan penanaman pada musim berikutnya maka ketersediaan bibit umumnya tidak bermasalah, baik

dari segi jumlah maupun keseragamannya. Penyediaan bibit menjadi bermasalah jika pertanaman pada musim berikutnya menggunakan bibit dengan varietas baru. Bibit varietas baru sering tidak tersedia dalam jumlah banyak maka harus diperbanyak. Apabila skala agrobisnisnya relatif besar maka jumlah bibit yang dibutuhkan juga besar. Hal ini bisa dipenuhi dengan suatu teknologi yang mampu menghasilkan bibit tanaman berjumlah besar dalam waktu relatif singkat, yaitu *microsection* dan kultur jaringan.

Selain pisang maupun nanas, komoditas lain yang penyediaan bibitnya ada yang menggunakan teknik kultur jaringan adalah kentang, jati, bambu, kelapa sawit, kelapa kopyor, kurma, kopi, kakao, tebu, dan berbagai jenis tanaman hias.

Dalam tiga dekade terakhir ini, perkembangan pesat terjadi pada industri hortikultura di dunia. Hal tersebut khususnya pada komoditas tanaman hias sangat terbantu oleh penggunaan teknik kultur jaringan, baik untuk memperbanyak tanaman (*micropropagation*) maupun pemuliaan melalui seleksi karakter-karakter unggul tanaman hasil dari keragaman somaklonal (Rout *et al.*, 2006).

Permintaan akan bibit tanaman hias berkualitas untuk produksi tanaman hias pot, taman-taman domestik, maupun lanskap perkotaan sangat besar sehingga diperlukan aplikasi bioteknologi untuk penyediaannya. Beberapa tanaman hias penting yang secara luas telah diperbanyak menggunakan teknik kultur jaringan disajikan pada Tabel 2.1.



**Tabel 2.1** Tanaman hias pot yang dalam perdagangan global perbanyakannya banyak dilakukan menggunakan kultur jaringan

Spesies & Kultivar
<i>Alocasia micholitziana</i> 'Green Velvet'
<i>Anthurium andreanum</i>
<i>Anthurium scherzerianum</i>
<i>Begonia tuber hybrida</i>
<i>Begonia x hiemalis</i>
<i>Begonia x elatior</i>
<i>Begonia x cheimantha</i>
<i>Cyclamen persicum</i>
<i>Dendranthema grandiflora</i> (krisan)
<i>Dendrobium</i> hibrida dan spesies
<i>Dracaena deremensis</i> 'Wameckii'
<i>Dracaena marginata</i> 'Tricolour'
<i>Ficus benjamina</i>
<i>Ficus religiosa</i>
<i>Rosa hybrida</i>
<i>Rosa damascena</i>
<i>Saintpaulia ionantha</i>
<i>Yucca alooifolia</i>
<i>Pelargonium x hortorum</i>
<i>Pelargonium zonale</i> hybrid
<i>Petunia hybrida</i>
<i>Phalaenopsis</i> hibrida
<i>Rhododendron</i> spp.
<i>Spathiphyllum floribundum</i>

Di samping untuk memproduksi berbagai jenis tanaman hias tersebut, teknik kultur jaringan juga digunakan untuk memproduksi bibit dan pemuliaan anggrek. Pemuliaan anggrek dilakukan dengan mengoleksi tetua-tetua terpilih lalu dilakukan hibridisasi dan menyeleksi progeninya (Yusnita, 2010). Oleh karena ukuran biji anggrek yang sangat kecil dan tidak mempunyai cadangan makanan maka pengecambahan biji *in vitro* yang aseptik dengan suplai nutrisi maupun energi memungkinkan keberhasilan tinggi, sedangkan pengecambahan biji *ex vitro* sangat sulit apabila tanpa simbiosis dengan jenis jamur tertentu (*mycorrhiza*) yang hidup di kulit pepohonan (Yusnita, 2010). Perbanyak klonal berbagai jenis anggrek jumlah besar dalam waktu singkat juga mengandalkan sistem kultur jaringan (Arditti & Ernst, 1993).

### Karakteristik Kultur Jaringan Tanaman

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik untuk mengkulturkan bagian tanaman *in vitro* di media buatan yang mengandung energi sekaligus bernutrisi lengkap pada kondisi aseptik dengan suhu dan pencahayaan terkontrol agar tumbuh dan berkembang ke arah tertentu, misalnya menjadi tanaman utuh, organ, atau lainnya. Istilah *in vitro* secara harfiah berarti dalam tabung. Pengkulturkan tanaman *in vitro* dapat dilakukan dalam suatu wadah kultur yang terbuat dari kaca atau plastik transparan. Wujud wadah itu bisa suatu tabung, botol, cawan petri, atau suatu toples dengan struktur khusus. Kondisi aseptik artinya bebas dari mikroorganisme, bersih, dan steril. Media kultur mengandung gula sebagai sumber energi dan nutrisi esensial yang lengkap pada konsentrasi tertentu. Kondisi lingkungan terkontrol artinya suhu dan pencahayaan di ruang kultur juga sudah ditetapkan. Perkembangan ke arah tertentu

artinya eksplan yang dikulturkan itu tumbuh dan berkembang ke arah yang dikehendaki.

Misalnya, eksplan diarahkan agar membentuk kalus dengan berkembang biak secara cepat lalu kalus dipindahkan ke media baru yang mengarahkannya membentuk tunas-tunas atau embrio. Selain itu, dapat juga eksplan itu diarahkan untuk membentuk tunas-tunas atau embrio secara langsung lalu terbentuk organ tunas atau embrio yang selanjutnya diarahkan untuk menjadi tanaman utuh. Bisa juga eksplan itu diarahkan agar membentuk akar saja dalam jumlah banyak. Jadi, arah perkembangan eksplan yang dituju tidak hanya pada pembentukan tanaman utuh. Oleh karena itu, teknik kultur jaringan tanaman tidak hanya bermanfaat guna memperbanyak tanaman dengan cepat, tetapi bisa juga untuk tujuan lain. Namun demikian, pada buku ini pokok bahasan dibatasi pada penggunaan kultur jaringan untuk perbanyak bibit tanaman. Jadi, eksplan yang ditanam diarahkan pada tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh untuk bibit.

Proses mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan sangat penting dalam kultur jaringan tanaman. Banyak hasil penelitian menunjukkan arah pertumbuhan dan perkembangan eksplan sangat tergantung pada Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Itu sebabnya keberadaan ZPT merupakan salah satu ciri dari kultur jaringan tanaman. Ciri kultur jaringan tanaman yang lain adalah aseptik, *in vitro*, media mengandung hara lengkap, dan kondisi lingkungannya terkontrol.

Oleh karena teknik kultur jaringan mensyaratkan kondisi *in vitro* yang steril atau aseptik maka bibit yang dihasilkan pun lebih sehat sebab setidaknya terbebas dari kontaminasi bakteri dan jamur. Banyak lagi contoh-contoh yang bisa

dikemukakan mengenai dibutuhkannya teknik kultur jaringan untuk memperbanyak bibit dalam jumlah besar, terutama bibit tanaman yang diperbanyak secara vegetatif atau bibit dari biji yang perkecambahannya memerlukan sistem kultur jaringan.

### Keuntungan Perbanyak Tanaman dengan Teknik Kultur Jaringan

Beberapa keuntungan penggunaan kultur jaringan untuk memperbanyak bibit dibandingkan dengan cara perbanyak konvensional adalah bahwa teknik ini:

1. Dapat digunakan untuk memperbanyak tanaman *true-to-type* dalam jumlah besar dengan waktu relatif singkat. Hal ini karena multiplikasi propagul dapat terjadi dalam interval 2-6 minggu dengan penggandaan secara deret ukur, misalnya dengan rasio perbanyak 1:4 per periode pengulturan maka diperkirakan akan didapat: 1-4-6-64-256-1024 bibit dalam lima periode kultur. Melalui faktor koreksi tertentu, dapat diprediksi jumlah bibit yang dihasilkan dalam lima hingga enam periode pengulturan atau per tahun.
2. Pelaksanaan produksi bibit tidak tergantung musim.
3. Tidak memerlukan tempat yang luas.
4. Dapat menghasilkan bibit lebih sehat karena berasal dari kultur *in vitro* yang steril.
5. Dapat digunakan untuk mengeliminasi patogen yang sistemik dari tanaman induk, yaitu dengan cara *shoot-tip grafting* atau kultur meristem *in vitro*.
6. Dapat digunakan untuk mengoleksi dan memelihara plasma nutfah.

7. Dapat digunakan untuk mengecambahkan benih yang sulit berkecambah secara konvensional atau penyelamatan embrio, misalnya pada biji anggrek dan kelapa kopyor.
8. Dapat digunakan untuk perbanyak klonal tanaman yang secara konvensional tidak dapat atau sulit diperbanyak secara vegetatif, misalnya kelapa sawit.

Namun demikian, teknik ini juga sering dianggap sebagai proses produksi bibit yang mahal karena memerlukan laboratorium dengan peralatan dan bahan kimia yang mahal. Di samping itu, pelaksanaan kultur jaringan memerlukan keahlian khusus. Keahlian dan keterampilan khusus, terutama untuk mengondisikan kultur menjadi aseptik, pembuatan media dengan konsentrasi hara mineral sekaligus ZPT secara akurat, dan dikuasainya protokol perbanyak *in vitro* tanaman yang mantap (*established*) dari hasil riset (setiap tahapan pengulturan maupun tanaman umumnya memerlukan resep media berbeda).

Mahal atau tidaknya suatu proses produksi bibit tergantung dari beberapa faktor, di antaranya kebutuhan/permintaan/pasar yang akan menentukan skala produksi bibit, kemantapan (*reproducibility*) prosedur yang digunakan, ketersediaan maupun jenis bahan-bahan kimia, dan fasilitas laboratorium yang digunakan. Makin banyak bibit yang harus diproduksi, makin murah biaya produksinya. Penggunaan beberapa bahan dengan harga murah, misalnya bubuk agar, gula, dan ZPT, dapat memangkas ongkos produksi bibit dengan teknik kultur jaringan. Di samping itu, komponen biaya produksi tinggi adalah pada listrik yang digunakan untuk AC, autoklaf, distilator, dan ruang kultur. Penempatan laboratorium di daerah yang sejuk dengan udara segar dan bersih dapat memangkas kebutuhan listrik untuk AC.



## Bab 3

### Teori Dasar Kultur Jaringan Tanaman



Dalam kultur jaringan tanaman, sepotong kecil bagian tanaman (sel, jaringan, atau organ) yang dikondisikan (*in vitro*, aseptik), dikulturkan di media (dengan suplai semua hara mineral esensial, energi sekaligus Zat Pengatur Tumbuh (ZPT), dan dikontrol pencahayaan maupun suhu ruangnya, dimungkinkan untuk diarahkan pertumbuhan ataupun perkembangannya menjadi tanaman utuh. Fenomena ini sulit atau tidak dapat terjadi pada kondisi umum budi daya tanaman tanpa sistem kultur *in vitro*. Sepotong bagian kecil tanaman tersebut dapat diarahkan untuk mengalami pertumbuhan dan perkembangan menjadi tanaman utuh. Bagaimana fenomena yang luar biasa ini bisa terjadi?

#### Sel Tanaman Bersifat Totipoten dan Mempunyai Kelenturan Morfogenetik

Ada beberapa teori yang mendasari kultur jaringan tanaman. *Pertama*, teori sel yang dikemukakan oleh Matthias Schleiden dan Theodor Schwann (1838-1839) menyatakan bahwa sel tanaman bersifat totipoten, yaitu dapat tumbuh sekaligus berkembang menjadi tanaman utuh apabila berada pada kondisi sesuai. Upaya untuk membuktikan teori totipotensi sel telah mengarahkan pada penemuan-penemuan penting dalam kultur jaringan tanaman. Pada tahun 1902, seorang botanis

Austria, Godlieb Haberland, merupakan ilmuwan di *German Academic of Science* mencoba mengisolasi dan mengkulturkan sel pefotosintesis menggunakan larutan hara yang diformulasikan oleh Johann Knop pada tahun 1865 dengan menambah sukrosa serta asparagin. Namun demikian, sel-sel tersebut hanya dapat bertahan selama 20 hari. Sel-sel tersebut bertambah ukurannya, namun tidak mengalami pembelahan sel. Pada saat Haberlandt mengkulturkan irisan tuber kentang yang mengandung pembuluh vaskuler, beliau mengamati adanya pembelahan sel. Oleh karena itu, disimpulkannya bahwa di dalam irisan tuber kentang terdapat senyawa yang menginduksi pembelahan sel dan menyebutnya dengan hormon luka (*wound hormone*). Temuan Haberlandt ini selanjutnya menjadi pemicu yang menginspirasi banyak ahli biologi tanaman untuk membuktikan teori totipotensi sel. Melalui penemuan hormon auksin sekaligus vitamin B1 atau tiamin (tahun 1930-an), penemuan filter HEPA pada tahun 1940-an, penemuan hormon sitokinin (tahun 1950-an), penemuan berbagai formulasi media kultur, serta serangkaian percobaan menggunakan sistem kultur jaringan yang sudah dilakukan oleh banyak ahli biologi tanaman (lihat sejarah kultur jaringan di Bab 1) telah dibuktikan bahwa sel tanaman benar bersifat totipoten. George (2008) menyatakan bahwa totipotensi merupakan karakter spesifik sel-sel pada jaringan tanaman masih muda yang meristematik, seperti sel-sel kambium dan sel palisade daun. Namun demikian, totipotensi tidak terdapat pada sel-sel yang sudah terdiferensiasi menjadi struktur khusus, seperti sel-sel *tracheid* dan sel-sel tapis (*sieve tubes*) pada jaringan vaskuler.

Di samping sifat totipotensi, kenyataan bahwa sel tanaman mempunyai plastisitas atau kelenturan morfogenetik merupakan suatu kondisi yang memungkinkan keberhasilan kultur jaringan tanaman. Sepotong jaringan tanaman berukuran

sangat kecil yang dikulturkan dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh. Dalam tubuh tanaman, perkembangan (*development*) adalah fenomena kompleks yang menunjukkan gabungan dari perubahan bertahap pada karakter kualitatif maupun kuantitatif pada transformasi zigot menjadi tanaman dewasa. Perkembangan tanaman dicirikan oleh penambahan ukuran, bobot, terbentuknya struktur atau fungsi baru, dan/atau hilangnya struktur dan fungsi lama pada sel, jaringan, atau organ tanaman. Dengan demikian, perkembangan tanaman dapat dipandang sebagai proses yang merupakan resultan dari pertumbuhan, diferensiasi, dan morfogenesis (Taji *et al.*, 2002).

Pertumbuhan tanaman adalah penambahan ukuran tanaman yang permanen dan tidak dapat balik. Pada kultur sel suspensi atau kultur kalus, misalnya, pengukuran pertumbuhan dapat dilakukan dengan mengukur penambahan bobot per satuan waktu tertentu. Namun demikian, pada stadia tertentu, bobot segar tanaman dapat berfluktuasi tergantung status kadar air jaringan tanaman. Pada kondisi demikian, pengukuran pertumbuhan tanaman lebih baik dilakukan dengan mengukur bobot kering tanaman. Pada tingkat sel, pertumbuhan tanaman merupakan hasil dari pembelahan sel mitosis yang terus-menerus.

Oleh karena pembelahan sel mitosis selalu menghasilkan dua sel anak identik dengan sel induknya maka secara teori, tanaman yang dihasilkan dari pertumbuhan dan perkembangan eksplan (bagian tanaman yang dikulturkan *in vitro*) mempunyai karakteristik sama dengan karakter tanaman induk dari mana eksplan diambil. Walaupun demikian, dalam kenyataannya karena beberapa alasan, penyimpangan genetik mungkin saja terjadi pada tanaman regenerasi hasil kultur jaringan. Fenomena

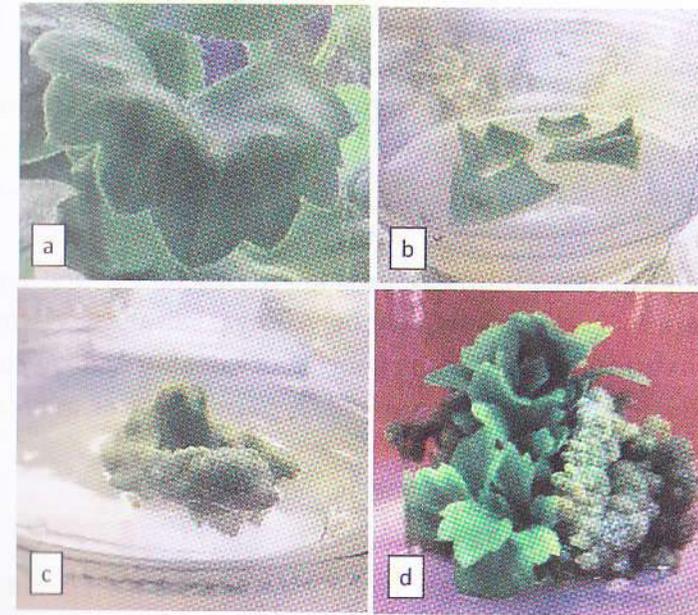
tersebut disebut dengan keragaman somaklonal (Larkin dan Scowcroft, 1981).

**Diferensiasi** adalah proses terspesialisasinya suatu sel menjadi sel yang mempunyai fungsi fisiologis, biokimia, atau struktur berbeda dari sel asalnya. Contoh diferensiasi sel adalah perubahan sel-sel meristematik pada titik tumbuh tanaman menjadi primordia daun atau batang atau infloresens bunga. Pada tanaman, tidak seperti pertumbuhan yang bersifat permanen dan tidak dapat balik, diferensiasi sel bersifat dapat balik. Jaringan tanaman yang sudah terdiferensiasi dapat mengalami dediferensiasi lalu mengalami diferensiasi lagi.

**Dediferensiasi** adalah proses seluler, di mana sel-sel yang sudah terdiferensiasi berubah atau kembali menjadi tidak terdiferensiasi, kehilangan fungsi atau bentuk khususnya, dan sering kali menjadi meristematik. Dediferensiasi sering kali berasosiasi dengan terbentuknya sekumpulan sel tidak terorganisasi yang disebut dengan kalus dari eksplan berasal dari organ tanaman *highly-differentiated* (sangat terdiferensiasi).

**Morfogenesis** adalah proses terjadinya suatu bentuk atau struktur tumbuhan. Pada kasus kultur *in vitro* suatu eksplan, morfogenesis dapat berarti proses terbentuknya organ akar/tunas (organogenesis) atau proses terbentuknya embrio (embriogenesis) secara adventif/*de novo* (terbentuk baru). Morfogenesis merupakan konsekuensi dari pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel somatik yang bermuara pada terbentuknya struktur tertentu, yaitu organ (tunas/akar) atau embrio. Ilustrasi berikut menjelaskan betapa potongan bagian organ tanaman (daun) (Gambar 3.1a,b) yang semula sudah terdiferensiasi, dalam kultur *in vitro* mengalami dediferensiasi (Gambar 3.1c). Kemudian, setelah ditransfer ke media dengan formulasi

media baru mengalami morfogenesis membentuk organ tunas (Gambar 3.1d). Rangkaian peristiwa yang terwakili oleh Gambar 3.1 ini juga mencerminkan sifat totipotensi dan plastisitas morfogenetik sel-sel daun yang dikulturkan.



**Gambar 3.1** Ilustrasi plastisitas morfogenetik pada jaringan tanaman. Organ daun yang (a) *highly differentiated* (b) ketika dikulturkan (c) mengalami dediferensiasi membentuk kalus (d) lalu mengalami dediferensiasi menjadi tunas adventif

### Morfogenesis sebagai Suatu Proses Perkembangan, Terdiri dari Beberapa Fase Seluler yang Berurutan

Pada saat eksplan mulai dikulturkan di media dengan ZPT yang dapat menginduksi terjadinya morfogenesis *de novo* maka proses seluler yang terjadi dapat dibagi menjadi beberapa fase berdasarkan respons eksplan yang dikulturkan (Christianson & Warnick, 1983; Christianson, 1987). Fase paling awal adalah fase **preinduksi** atau **tercapainya kondisi kompeten pada sel-**

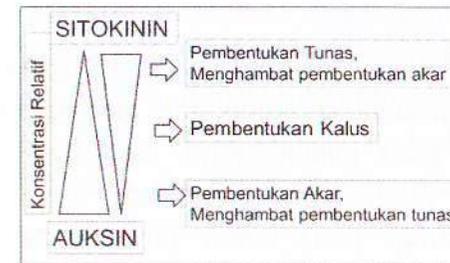
**sel eksplan.** Kompetensi sel eksplan dapat diartikan sebagai terjadinya dediferensiasi sel, namun tidak selalu diiringi oleh terbentuknya kalus (Thorpe & Kumar, 1993).

Kompetensi eksplan juga dapat diartikan sebagai kemampuan eksplan untuk mempersepsi (menerima) sinyal hormonal dari lingkungannya. Setelah eksplan kompeten untuk mempersepsi sinyal, fase selanjutnya adalah **induksi**. Pada fase ini diduga terjadi transduksi sinyal hormonal yang berakibat pada penentuan nasib (**determinasi**) sel-sel eksplan untuk membentuk struktur tertentu, misalnya organ atau embrio. Selanjutnya, kumpulan sel eksplan yang sudah terdeterminasi mengalami fase berikutnya, yaitu fase **ekspresi** atau **postinduksi**, di mana primordia organ atau embrio sudah terbentuk, baik secara langsung dari permukaan eksplan atau sel-sel kalus.

### Sinyal Hormonal pada Morfogenesis

Pada tahun 1957, Folke Skoog dan Carlos Miller, kelompok ilmuwan penemu sitokinin dari Universitas Wisconsin-Amerika, mempublikasikan hasil penelitian mereka yang mengemukakan konsep pengontrolan secara hormonal pembentukan organ (organogenesis) dalam kultur *in vitro* empulur tembakau. Dalam artikel tersebut, yang sering disebut sebagai artikel klasik, mereka menunjukkan bahwa pembentukan tunas dan akar dari eksplan dikontrol oleh nisbah (rasio) sitokinin/auksin dari sistem kultur *in vitro*. Sebagaimana diilustrasikan pada Gambar 3.2, rasio sitokinin/auksin yang tinggi mendorong pembentukan tunas, tetapi menghambat pembentukan akar, sedangkan rasio sitokinin/auksin yang rendah mendorong pembentukan akar, tetapi menghambat pembentukan tunas. Konsentrasi yang

seimbang antara auksin dan sitokinin dapat menyebabkan pembentukan kalus (Skoog & Miller, 1957). Konsep pengontrolan organogenesis oleh rasio sitokinin/auksin tersebut terbukti berlaku di banyak sistem kultur jaringan tanaman.



**Gambar 3.2** Teori klasik pengaturan pembentukan tunas, akar, dan kalus pada eksplan yang dikontrol oleh rasio sitokinin/auksin (Skoog & Miller, 1957)

Sitokinin adalah salah satu kelas Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang merangsang pembelahan sel atau sitokinesis. Fungsi fisiologis sitokinin selain merangsang pembelahan sel, terutama terlibat dalam proses pertumbuhan maupun diferensiasi sel, yaitu antagonistik terhadap dominansi apikal, merangsang pecah sekaligus tumbuhnya mata tunas aksilar, merangsang pembentukan tunas adventif, menghambat senesens, dan meningkatkan aktivitas *sink*. Sitokinin yang pertama kali ditemukan oleh Folke Skoog, Carlos Miller, dan kawan-kawannya pada tahun 1950-an adalah kinetin atau *furfuryl amino-purine*, suatu senyawa derivat (turunan) adenin atau amino purin yang didapat dari degradasi molekul DNA.

Auksin adalah salah satu kelas ZPT yang disintesis oleh tanaman di bagian meristematik, yaitu ujung tunas dan ujung akar. Pada tingkat sel, auksin secara tunggal maupun bersama dengan sitokinin berperan dalam pembelahan, pemanjangan, dan diferensiasi sel. Sementara itu, pada tingkat organ, auksin

merangsang pertumbuhan batang, menentukan dominansi apikal, merangsang inisiasi akar, menghambat absisi, merangsang pembentukan buah partenokarpi, meningkatkan laju respirasi, dan merangsang terbentuknya kalus sekaligus embrio somatik.

Skoog dan Miller (1957) menggunakan kinetin (*furfuryl amino-purine*) sebagai sitokinin dan *indoleacetic acid* (IAA) sebagai auksin pada penelitiannya. Sitokinin derivat adenin selain kinetin yang dapat digunakan untuk merangsang pembentukan tunas pada kultur jaringan tanaman adalah benziladenin (BA), isopentenil adenin (2-iP), dan zeatin. Jenis auksin yang lain selain IAA yang efektivitasnya lebih kuat daripada IAA adalah *naphthaleneacetic acid* (NAA), *indolebutyric acid* (IBA), *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), pikloram, dan dikamba. Auksin-auksin yang lebih kuat efektivitasnya daripada IAA tersebut, misalnya IBA atau NAA, umumnya digunakan untuk merangsang pembentukan akar atau bersamaan dengan sitokinin untuk merangsang pembentukan kalus. Sedangkan 2,4-D, pikloram serta dikamba, sering kali digunakan untuk menginduksi kalus dan embriogenesis somatik.

---

### **Morfogenesis Tanaman *In Vitro* Mensyaratkan Ketersediaan Hara Esensial, Suplai Energi, dan ZPT yang Sesuai**

Pada tahun 1962, Toshio Murashige dan Folke Skoog, kelompok peneliti yang secara konsisten melakukan penelitian menggunakan sistem kultur jaringan tanaman, memublikasikan formulasi media MS (Murashige dan Skoog, 1962). Dalam formulasi yang disebut dengan formulasi revisi tersebut, Murashige dan Skoog menggunakan semua hara mineral makro maupun mikro esensial (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, B, Mn, Zn,

Cu, Co, Mo, dan Cl) pada konsentrasi yang merupakan revisi terhadap konsentrasi pada formulasi media (White, 1943). *Bioassay* yang digunakan adalah pertumbuhan kalus dari eksplan empulur batang tembakau cv. Wisconsin 38. Artinya, dengan maupun tanpa suplemen 1 g/l edamin, media MS menghasilkan pertumbuhan kalus yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan formulasi pembandingnya, yaitu White's nutrient solution (White, 1943) sebagai kontrol, Heller (1953), Nitsch & Nitsch (1956), dan Hildebrandt *et al.*, (1946) sebagai pembanding lainnya. Hingga kini, formulasi MS terbukti sangat cocok untuk pertumbuhan dan perkembangan berbagai jenis tanaman yang dikulturkan *in vitro*.



## Bab 4

### *Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman: Fasilitas dan Ruangan*



Pelaksanaan kultur jaringan tanaman untuk berbagai tujuan memerlukan sebuah laboratorium (lab) kultur jaringan tanaman yang dilengkapi dengan berbagai alat dan bahan, baik bersifat esensial atau tidak esensial. Sebuah lab kultur jaringan harus mempunyai beberapa ruangan beserta peralatan yang cukup untuk mengakomodasi dan memfasilitasi beberapa kegiatan, yaitu:

1. Pembuatan larutan dan media kultur.
2. Penanganan dan sterilisasi eksplan.
3. Penanaman eksplan dan subkultur.
4. Pemeliharaan kultur.
5. Penyimpanan zat kimia dan media kultur.
6. Pencucian, pengeringan, dan sterilisasi alat.
7. Ruang diskusi yang berfungsi untuk pengamatan, pencatatan, dan pengolahan data.
8. Ruang kantor sebagai ruang untuk meja kerja dan tempat menyimpan barang-barang pribadi milik para mahasiswa/peneliti.

Ruangan yang diperlukan oleh kebanyakan laboratorium kultur jaringan ada beberapa, seperti penjelasan berikut.

## Ruang Persiapan Media

Ruangan ini digunakan untuk semua pekerjaan yang berhubungan dengan pembuatan media kultur, meliputi pencucian botol sekaligus alat-alat gelas, sterilisasi peralatan ataupun media kultur, penanganan kultur terkontaminasi, pembuatan akuades, dan peracikan media kultur. Di dalam ruang persiapan media pada umumnya diletakkan lemari penyimpanan botol maupun alat gelas, lemari penyimpanan bahan-bahan kimia, lemari atau kontainer penyimpanan bahan-bahan lain yang diperlukan, kulkas penyimpanan berbagai larutan stok, dan rak alat-alat gelas. Di dalam ruang persiapan media pada umumnya juga diletakkan aneka timbangan elektrik (dengan ketelitian 0,1 gram; 0,001 gram; dan 0,0001 gram), pH meter, *magnetic stirrer*, autoklaf, berbagai alat gelas untuk wadah sekaligus pengukur larutan, kereta dorong, oven, kompor, dan aneka panci untuk mendidihkan media.

Ibarat sebuah rumah, ruang persiapan media adalah dapur tempat meracik, memasak, mencuci, dan menyimpan berbagai alat atau bahan yang digunakan untuk memasak. Biasanya di ruangan ini terdapat banyak meja kerja (*bench*) yang di atasnya terdapat berbagai peralatan untuk menimbang bahan kimia, mengukur sekaligus membuat larutan, memasak, membagi media ke botol-botol kultur, dan sebagainya. Meja kerja dilengkapi dengan colokan listrik yang sering kali memerlukan *voltage stabilizer*.

Oleh karena berbagai larutan yang dibuat memerlukan banyak akuades sebagai pelarut maka distilator air sangat diperlukan di ruangan ini. Pekerjaan penanganan eksplan sebelum disterilisasi juga sering kali dilakukan di ruang persiapan media jika tidak tersedia ruangan khusus. Baik distilator maupun pencucian

bahan tanaman untuk eksplan memerlukan *sink* dengan keran air. Oleh karena itu, ruang persiapan media harus dilengkapi dengan beberapa *sink*. Guna mempermudah pekerjaan, urutan peletakan alat-alat yang diperlukan sebaiknya diatur sesuai urutan pekerjaan. Gambar 4.1 berikut adalah contoh ruang persiapan media di laboratorium kultur jaringan tanaman.



Gambar 4.1 Contoh ruang persiapan media

## Ruang Transfer

Ruang transfer merupakan tempat semua pekerjaan aseptik, yaitu sterilisasi eksplan, penanaman eksplan, dan subkultur. Dalam ruang ini harus tersedia semua peralatan laboratorium yang berfungsi untuk melaksanakan penanaman eksplan dan subkultur yang menghasilkan kultur aseptik. Peralatan yang esensial adalah *laminar air flow cabinet* maupun alat-alat diseksi steril (semua alat yang digunakan untuk memegang, memotong, dan mengiris eksplan atau bagian tanaman yang akan disubkultur). Alat-alat diseksi tersebut biasanya adalah pisau skalpel, mata pisau bedah, forsep atau pinset, gunting *stainless steel*, cawan petri, talenan, dan spatula *stainless steel*. Beberapa alat untuk membantu sterilisasi eksplan, seperti *shaker* dan desikator yang terhubung dengan *vacuum pump* juga dapat diletakkan di ruang ini, di samping *laminar-air flow cabinet*. Sebaiknya, di ruang transfer juga tersedia sebuah *sink* dengan air keran yang lancar. Contoh ruang transfer dan pekerjaan yang dilakukan di ruang transfer disajikan pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.2** Contoh ruang transfer dan pekerjaan yang dilakukan di ruang transfer

## Ruang Kultur

Ruang kultur atau ruang inkubasi kultur adalah sebuah ruang yang berisi rak-rak tempat meletakkan kultur. Ruang ini bisa gelap total atau dengan penerangan lampu fluoresens. Suhu

ruang dapat diatur menjadi 24<sup>o</sup>-28<sup>o</sup>C. Pengaturan suhu ruang kultur biasanya menggunakan *Air Conditioner* (AC). Suatu hal penting untuk menjaga agar ruangan ini mempunyai kelembapan nisbi atau RH (*Relative Humidity*) yang relatif rendah, yaitu sekitar 70% untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme. Hal ini karena kelembapan nisbi udara yang tinggi akan mendorong peningkatan populasi inokulum mikroorganisme di dalam ruangan tersebut. Kelembapan nisbi adalah ukuran untuk jumlah uap air yang terdapat di atmosfer. Kelembapan nisbi mengekspresikan rasio (nisbah) antara jumlah uap air yang terdapat di atmosfer saat itu dengan jumlah uap air yang terdapat di atmosfer tersebut pada saat jenuh. Contoh ruang kultur disajikan pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.3** Contoh ruang kultur dengan pencahayaan lampu fluoresens dan pengaturan suhu dengan *air conditioner*.

## Ruang Diskusi

Keberadaan ruang diskusi di laboratorium diperlukan untuk rapat, mendiskusikan hasil penelitian, pertemuan rutin lab (*lab meeting*), rehat minum kopi, makan siang, dan lain-lain.

---

### Ruang Kantor

Ruangan ini berfungsi sebagai tempat semua pekerja laboratorium menyimpan peralatan yang tidak digunakan untuk pekerjaan kultur jaringan tanaman, misalnya alat-alat tulis, jaket, tas, dan lain-lain. Ruang ini juga berfungsi untuk pekerjaan yang berhubungan dengan administrasi, pencatatan kegiatan, penulisan laporan, analisis data, dan sebagainya. Apabila tidak tersedia ruang khusus untuk makan maupun minum maka ruang kantor dapat digunakan merangkap tempat beristirahat, makan, dan minum. Perlu diingat bahwa semua ruangan laboratorium adalah bebas asap rokok.

---

### Ruang Simpan

Ruang ini sifatnya opsional karena bisa bergabung dengan ruang persiapan media. Sesuai dengan namanya, ruang simpan berfungsi untuk menyimpan bahan kimia dan/atau alat dengan jumlah sangat banyak, seperti botol kultur yang sudah dicuci, dikeringkan, serta siap digunakan untuk pembuatan media. Bahan kimia dapat disimpan di lemari besi, sedangkan berbagai larutan stok disimpan di lemari berpendingin. Keduanya dapat diletakkan di ruang persiapan media (Gambar 4.4).



**Gambar 4.4** Penyimpanan bahan kimia di lemari dan larutan stok di lemari berpendingin yang diletakkan di ruang persiapan

---

### Ruang Cuci

Ruang ini berfungsi untuk kegiatan pencucian alat-alat gelas dan botol-botol kultur. Di samping *sink* besar dengan air keran lancar, dalam ruang ini biasanya terdapat bak-bak atau ember plastik untuk merendam botol-botol yang dicuci. Ruang ini biasanya juga dilengkapi dengan autoklaf untuk mensterilkan botol berisi kultur terkontaminasi yang hendak dicuci. Pencucian botol kultur dari kontaminan harus dilakukan sebersih-bersihnya karena sisa media terkontaminasi yang menempel di botol kultur dapat menjadi sumber kontaminan bagi kultur.

Pencucian botol yang berisi media terkontaminasi dimulai dengan mensterilkan botol dan media terkontaminasi. Kemudian, membuang media lama pada saat masih panas dan dengan segera merendam botol dalam air detergen lantas menyikatnya hingga bersih tanpa meninggalkan sedikit pun sisa media yang menempel pada botol. Setelah itu, botol dibilas dengan air bersih dan ditiriskan. Setelah botol kering, botol sebaiknya ditutup dengan plastik lalu disterilkan lagi dengan

autoklaf. Autoklaf yang digunakan untuk mensterilkan alat-alat gelas dan botol kultur biasanya bukan yang digunakan untuk mensterilkan media kultur.

## Bab 5

### *Prosedur Standar Bekerja di Laboratorium*



Pelaksanaan teknik kultur jaringan tanaman memerlukan ketelitian, kebersihan, dan pengukuran yang akurat dalam berbagai tahapan. Misalnya, mulai dari persiapan eksplan yang akan ditanam, pembuatan media kultur, penanaman eksplan, subkultur, hingga aklimatisasi. Khusus untuk pembuatan media kultur, penimbangan maupun pengukuran larutan harus dilakukan dengan teliti dan akurat. Beberapa prosedur standar untuk bekerja di laboratorium yang perlu dipahami, yaitu penimbangan senyawa kimia, pembuatan sekaligus pengukuran volume larutan, konsep konsentrasi larutan termasuk satuannya, dan cara pelarutan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang sering kali tidak larut air.

#### **Penimbangan Senyawa Kimia**

Dalam pembuatan media kultur, semua komponen media perlu ditimbang dengan benar dan teliti untuk dijadikan larutan. Oleh karena itu, timbangan dengan tingkat ketelitian yang sesuai sangat diperlukan. Jenis timbangan yang sering digunakan adalah *top-loading electrical balance* dengan ketelitian 0,1 gram untuk menimbang senyawa kimia dengan ukuran gram, seperti sukrosa, agar-agar, pepton, tripton, atau pupuk NPK lengkap yang digunakan sebagai komponen nutrisi media kultur. Pada



kebanyakan komponen, media yang diperlukan dalam jumlah ratusan miligram, puluhan miligram, dan miligram maka diperlukan timbangan analitik dengan tingkat ketelitian 0,0001 g atau 0,1 mg. Timbangan sebaiknya diletakkan di permukaan datar, keras, stabil, dan tidak bergoyang-goyang atau bergerak-gerak. Areal di sekitar timbangan harus bersih dan cukup lapang untuk meletakkan bahan kimia yang hendak ditimbang.

Setiap pengguna timbangan harus mengerti cara penggunaannya maka sangat dianjurkan untuk membaca manualnya. Beberapa hal penting dalam petunjuk umum penggunaan timbangan adalah:

1. JANGAN memindah-mindahkan letak timbangan.
2. Cek posisi gelembung penunjuk keseimbangan dan posisikan di bagian tengah.
3. Nyalakan tombol *power* dan tunggu beberapa saat hingga timbangan siap digunakan.
4. Posisikan timbangan pada ukuran nol dengan menekan tombol '*tare*' setiap akan menimbang.
5. Letakkan *weighting boat* atau alas penimbang (kertas atau plastik) lalu kembali tekan tombol '*tare*'.
6. Berikutnya, dengan hati-hati, menggunakan spatula, letakkan bahan kimia yang ditimbang ke atas alas penimbang. Usahakan jangan tercecer dan meletakkan bahan kimia terlalu berlebih. Apabila bahan kimia yang ditimbang terlanjur berlebih, pengambilan kembali harus dilakukan dengan hati-hati agar bahan kimia tidak tercecer.
7. Perhatikan benar-benar bahwa angka pada *counter* timbangan adalah sesuai dengan jumlah yang ingin Anda timbang. Misalnya, pada timbangan analitik yang berketelitian

0,0001 gram, jika Anda menimbang suatu bahan kimia sejumlah 500 mg maka posisi *counter* adalah 0,5000 gram dan bukan 0,0500 gram. Kesalahan dalam membaca angka pada *counter* timbangan dapat berakibat terlalu rendah atau terlalu tingginya jumlah bahan kimia yang ditimbang.

8. Setelah penimbangan selesai, tekan kembali tombol '*tare*' untuk menyetel pada posisi nol.
9. Bersihkan timbangan dengan hati-hati dari bahan kimia yang tercecer.

---

### Pembuatan dan Pengukuran Volume Larutan

Guna membuat media kultur diperlukan pembuatan dan pengukuran larutan berbagai bahan kimia komponennya. Bahan-bahan kimia komponen media umumnya berbentuk bubuk padatan yang larut dalam air maupun tak larut air. Pada bahan kimia yang larut air, bahan kimia ditimbang sesuai dengan kebutuhannya lalu dimasukkan ke dalam gelas piala berisi akuades di volume tertentu yang lebih kecil dari volume akhir dan diaduk hingga homogen (larutan jernih, tidak terdapat endapan). Setelah itu, larutan ditera menjadi volume akhir dengan menambahkan akuades. Tabel 5.1 berikut adalah sistem satuan bobot, simbol, dan nilai relatifnya yang sering digunakan dalam pembuatan media kultur jaringan.

Pengukuran volume larutan dilakukan menggunakan gelas ukur atau labu ukur. Guna mengaduk larutan dapat digunakan pengaduk gelas atau *magnetic stirrer*. Pengukuran larutan dalam volume sangat kecil (0,01 hingga 1 ml) digunakan *micropipet*. Berikutnya, untuk mengukur volume larutan 1 ml hingga 25 ml dapat digunakan pipet gelas atau gelas ukur kecil. Perlu diingat

bahwa gelas piala dan labu erlenmeyer tidak dapat digunakan untuk mengukur volume larutan secara akurat.

**Tabel 5.1** Sistem satuan bobot, simbol, dan nilainya dalam gram

Satuan	Simbol	Nilai Relatif dalam Gram
Kilogram	kg	1000 gram
Gram	g	1 gram
Centigram	cg	0,1 gram
Miligram	mg	0,001 gram
Mikrogram	µg	0,000001 gram
Ounce	oz	28,3 gram
Pound	lb	454 gram

Dengan demikian, maka:

1 kg = 1000 gram = 1000000 mg ; 1 g = 1000 mg

1 gram = 1000 mg = 1000000 µg ; 1 mg = 1000 µg

Satuan volume:

liter (l), mililiter (ml = cc), dan mikroliter (µl)

1 liter = 1000 ml	ml = 1000 µl	1 cc = 1 ml
-------------------	--------------	-------------

### Konsentrasi Larutan dan Satuannya

Semua komponen media kultur harus tersedia dalam bentuk larutan. Jadi, konsep konsentrasi sangat penting. Pada larutan, konsentrasi adalah jumlah zat per satuan volume pelarut (*solvent*). Satuan konsentrasi, misalnya g/l, mg/l, persen volume (% b/v ; % v/v), persen berat (% b/b), M (molar), mM (milimolar), dan µM (mikromolar).

Konsentrasi suatu senyawa kimia adalah jumlah zat tersebut per satuan volume (bobot per volume) zat pelarut atau per satuan bobot (bobot/bobot) zat pembawanya. Contoh konsentrasi bobot per volume adalah mg/ml, mg/l, atau g/l. Konsentrasi suatu senyawa dalam bobot per volume (atau *weight per volume*) dapat juga disebutkan dalam satuan ppm atau *part per million* (b/v atau w/v), artinya satu per sejuta ataupun persen (% b/v atau % w/v) yang artinya satu per seratus.

Sebagai contoh, 1 ppm mioinositol = 1 mg mioinositol per liter air dan 2% sukrosa = 20 gram sukrosa per liter air. Apabila bahan yang digunakan dan pelarutnya berupa cairan maka satuan konsentrasi adalah volume/volume (v/v), misalnya 150 ml air kelapa per liter air atau 15% air kelapa. Artinya, 150 ml air kelapa ditambahkan ke 850 ml air. Dalam suatu campuran berbentuk bubuk dengan pembawa yang juga berbentuk bubuk (*powder mixture*), konsentrasi adalah jumlah zat (dalam gram atau satuan bobot lain) per satuan bobot zat pembawa. Contoh campuran yang menggunakan konsentrasi bobot/bobot (b/b) seperti ini misalnya bubuk auksin dalam *talc* yang digunakan untuk perangsang akar.

### Larutan dalam Konsentrasi Molar

Konsentrasi larutan suatu zat dalam satuan molar sering kali lebih disukai dibandingkan dengan konsentrasi bobot per volume jika dihubungkan dengan efektivitas senyawa kimia tersebut. Hal ini karena konsentrasi dalam satuan molar mengandung arti berapa banyak jumlah molekul dalam larutan tersebut, sedangkan efektivitas suatu senyawa kimia berbanding lurus dengan jumlah molekul dalam larutan tersebut.

Satu molar suatu zat dalam larutan sama dengan sejumlah bobot molekul zat tersebut dalam gram per liter larutan. Oleh karena itu, bobot molekul beberapa zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam kultur jaringan (Tabel 5.2) perlu diketahui untuk membuat larutan dalam konsentrasi molar.

Di dalam satu liter larutan zat yang berbentuk molekul dengan konsentrasi 1 mol per liter (1M) terdapat sejumlah bilangan Avogadro, (yaitu  $6,02214199 \times 10^{23}$ ) molekul zat tersebut. Jadi, dalam satu liter larutan benziladenin berkonsentrasi 1M terdapat  $6,02214199 \times 10^{23}$  molekul benziladenin. Begitu juga dalam 1 liter larutan kinetin berkonsentrasi 1M terdapat  $6,02214199 \times 10^{23}$  molekul kinetin. Akan tetapi, jumlah molekul benziladenin dalam 1 mg/l benziladenin tidak sama dengan jumlah molekul kinetin dalam 1 mg/l kinetin. Hal ini karena bobot molekul benziladenin dan kinetin tidak sama.

1 M = 1 molar = 1 mol/l = bobot molekul (BM) g zat/l larutan.

1 M = 1000 mM; 1 mM = 1 milimolar = 1 mmol/l = 0,001 M.

1 mM = 1000  $\mu$ M; 1  $\mu$ M = 0,001 mM = 0,000001M.

Jadi:

1 mM benziladenin = 225,2 mg BA/l larutan

1 mM kinetin = 215 mg kinetin/l larutan

1 mM thidiazuron = 220 mg thidiazuron /l larutan

Contoh penghitungan larutan dalam konsentrasi molar:

1. Bobot molekul kinetin = 215.

Jadi, 1 M kinetin adalah 215 g kinetin/liter larutan.

1 mM kinetin =  $1/1000$  M = 215 mg kinetin/liter larutan.

1  $\mu$ M kinetin =  $1/1000$  mM = 0,215 mg kinetin/liter larutan.

2. Bobot molekul (BM) benziladenin (BA)= 225,3.

1 M BA = 225,3 g BA per liter larutan.

1 mM BA =  $1/1000$  M = 225,3 mg BA per liter larutan.

1 M BA =  $1/1000$  mM = 225 g BA atau 0,225 mg BA per liter larutan.

**Tabel 5.2 Bobot molekul beberapa ZPT (gram/mol)**

Nama Zat Pengatur Tumbuh	Bobot Molekul (BM) g/mol
<b>Sitokinin:</b>	
Benziladenine (BA)=benzylamino purine (BAP)	225,2
Kinetin (furfuryl amino purine)	215
Isopentenyladenine (2-iP)	203,2
Zeatin	219
Thidiazuron	220
<b>Auksin:</b>	
2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	221
2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	225,5
Picloram	241,2
Naphthaleneacetic acid (NAA)	186,2
Indole-3-butyric acid (IBA)	203,2
Indoleacetic acid (IAA)	175,2
Asam absisat	264
Gibberelic acid (GA3)	364,4

### Konversi Konsentrasi Molar menjadi mg/l atau Sebaliknya

Guna mengonversi konsentrasi suatu senyawa kimia dalam satuan molar menjadi mg/l atau sebaliknya, harus diketahui bobot molekul senyawa tersebut. Setelah itu dibuat penghitungannya, misalnya pada contoh berikut:

1  $\mu\text{M}$  BA sama dengan berapa mg/l?

1 mg/l BA sama dengan berapa  $\mu\text{M}$ ?

1  $\mu\text{M}$  IAA sama dengan berapa mg/l?

1mg/l IAA sama dengan berapa  $\mu\text{M}$ ?

Cara penghitungannya adalah sebagai berikut:

Bobot molekul BA adalah 225,3

1 M BA = 225,3 gram/l

1 mM BA = 1000  $\mu\text{M}$  = 225,3 mg/l

1  $\mu\text{M}$  BA = 0,2253 mg/l

1 mg/l BA = 1000/225,3  $\mu\text{M}$  = 4,44  $\mu\text{M}$

Bobot molekul IAA adalah 175,2

1 M IAA = 175,2 g/l maka

1 mM IAA = 1000  $\mu\text{M}$  = 175,2 mg/l

1  $\mu\text{M}$  IAA = 0,1752 mg/l; 1 mg/l IAA = 1000/175,2  $\mu\text{M}$  = 5,7  $\mu\text{M}$

### Cara Melarutkan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Kebanyakan ZPT tidak larut dalam air sehingga memerlukan cara khusus untuk melarutkannya. Sitokinin yang struktur kimianya merupakan derivat adenin, misalnya benziladenin (BA), kinetin, 2-iP, dan zeatin bersifat basa. Jadi, untuk melarutkannya diperlukan asam, misalnya HCl 1 N. Auksin, misalnya *indoleacetic acid* (IAA); *naphthaleneacetic acid* (NAA); *indolebutyric acid* (IBA); dan *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D maupun *dicamba*) bereaksi asam sehingga untuk pelarutannya diperlukan basa, misalnya NaOH 1N atau KOH 1N. Caranya, sitokinin yang telah ditimbang diberi beberapa tetes HCl. Auksin

yang sudah ditimbang diberi beberapa tetes NaOH. Kemudian, setelah bubuk ZPT terbasahi semuanya oleh asam atau basa, tambahkan akuades sampai volume yang ditetapkan. Jumlah HCl atau NaOH yang dibutuhkan kurang lebih sama molaritasnya dengan konsentrasi sitokinin atau auksin yang dibuat. Berikutnya, sebagai *rule of thumb*, Murashige (1989-komunikasi pribadi) menyarankan untuk melarutkan setiap 10 mg sitokinin dengan paling banyak 0,3 ml HCl 1N. Demikian juga untuk melarutkan setiap 10 mg auksin dibutuhkan paling banyak 0,3 ml KOH atau NaOH 1N, sebelum ditera pada volume yang ditetapkan dengan menambahkan akuades. Guna melarutkan thidiazuron (TDZ) yang merupakan derivat fenil urea dapat digunakan NaOH. Di samping itu, pelarut organik *dimethyl-sulfoxide* (DMSO) juga dapat digunakan untuk melarutkan, baik auksin maupun semua jenis sitokinin.

Berikut adalah contoh membuat larutan ZPT yang bersifat basa, misalnya larutan benziladenin (BA) pada konsentrasi 100 mg/l (100 ppm). Apabila larutan yang dibuat sebanyak 500 ml maka prosedurnya adalah sebagai berikut:

1. Siapkan gelas piala berkapasitas 500 ml, akuades, HCl 1N, pengaduk gelas atau *magnetic stirrer*, dan labu ukur 500 ml.
2. Timbang 50 mg BA menggunakan timbangan analitik.
3. Masukkan BA ke dalam gelas piala. Tempatkan BA pada satu sisi gelas. Usahakan agar bubuk BA tidak tersebar.
4. Tetesi bubuk BA dengan HCl 1N. Guna melarutkan 50 mg BA, jumlah HCl yang diteteskan maksimum  $5 \times 0,3 \text{ ml} = 1,5 \text{ ml}$ . Bubuk BA dan HCl diaduk rata hingga semua BA terbasahi dengan HCl.
5. Tambahkan akuades dan tera hingga 500 ml menggunakan labu ukur lalu aduk larutan BA sampai homogen.

Cara yang sama dapat digunakan untuk melarutkan auksin. Namun demikian, karena auksin bersifat asam maka sebelum diberi akuades, bubuk auksin dibasahi dulu dengan NaOH atau KOH 1N. Jadi, misalkan Anda akan membuat larutan IBA pada konsentrasi 200 mg/l sebanyak 500 ml, caranya adalah sebagai berikut:

1. Siapkan gelas piala berkapasitas 500 ml, akuades, NaOH atau KOH 1N, pengaduk gelas atau *magnetic stirrer*, dan labu ukur 500 ml.
2. Timbang 100 mg IBA menggunakan timbangan analitik. Masukkan IBA ke dalam gelas piala. Tempatkan IBA pada satu sisi gelas. Usahakan agar bubuk BA tidak tersebar.
3. Tetesi bubuk IBA dengan NaOH 1N. Guna melarutkan 100 mg IBA, jumlah NaOH yang diteteskan maksimum  $10 \times 0,3 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$ .
4. Bubuk IBA dan NaOH diaduk rata hingga semua IBA terbasahi dengan NaOH. Tambahkan akuades dan tera hingga 500 ml menggunakan labu ukur, lalu aduk larutan IBA sampai homogen.

Perhatikan bahwa untuk membuat larutan 100 mg/l BA sebanyak 500 ml, banyaknya BA yang ditimbang adalah 50 mg. Sementara itu, untuk membuat larutan 200 mg/l IBA sebanyak 500 ml banyaknya IBA yang ditimbang adalah 100 mg.



## Bab 6

### *Pola Regenerasi pada Kultur Tanaman In Vitro*



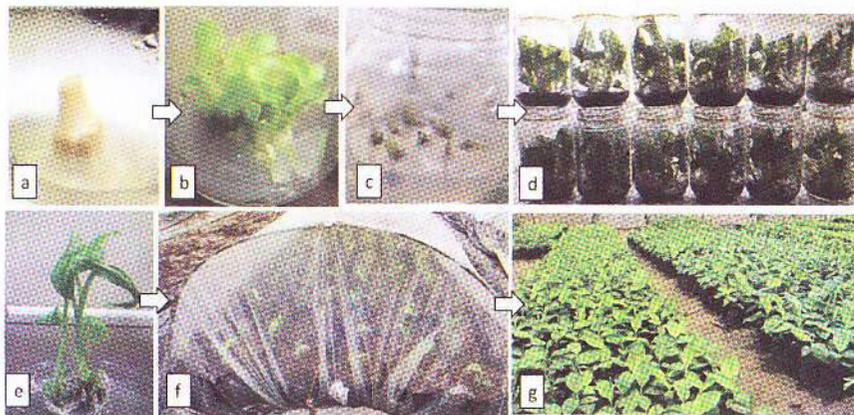
#### **Pola Regenerasi Tanaman In Vitro**

Dalam teknik kultur jaringan tanaman, sebuah potongan jaringan atau organ tanaman yang lazim disebut eksplan dimungkinkan untuk dapat tumbuh, berkembang, dan mengalami regenerasi menjadi tanaman utuh. Eksplan adalah bagian tanaman yang digunakan untuk memulai suatu kultur. Eksplan dapat berupa potongan batang berbuku, meristem, bagian rizom/bonggol bermata tunas, atau bagian-bagian organ yang tidak mempunyai mata tunas (misalnya potongan daun, tangkai daun, ujung akar, kotiledon, *internode* (ruas) batang, dan sebagainya). Pola regenerasi yang dialami oleh eksplan untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh dapat melalui beberapa cara, yaitu percabangan tunas aksilar (*axillary branching*), kultur tunas tunggal dari buku (*nodal culture*), organogenesis, dan embriogenesis somatik.

#### **Percabangan Tunas Aksilar dan Kultur Tunas Tunggal**

Pola regenerasi tanaman melalui kedua cara ini mempunyai kesamaan, yaitu dalam hal penggunaan eksplan berbuku (*nodal explants*) yang sebelumnya sudah memiliki mata tunas aksilar. Pada pola regenerasi percabangan tunas aksilar, pengulturan ditujukan untuk merangsang pecah dan tumbuhnya mata

tunas menjadi tunas-tunas majemuk atau berupa tunas tunggal. *Cluster* tunas majemuk dapat dipisah-pisah menjadi individu eksplan baru untuk disubkultur, artinya dibiakkan menjadi *cluster* tunas majemuk baru pada periode pengulturan berikutnya sampai jumlah yang diinginkan tercapai. Selanjutnya, tunas-tunas tersebut dapat diakarkan (menjadi planlet) dan diaklimatisasi menjadi bibit yang siap tanam (Gambar 6.1). Contoh perbanyakkan *in vitro* dengan pola regenerasi ini untuk pisang ambon kuning, pisang tanduk, dan raja bulu dilaporkan oleh Hapsoro *et al.*, (2010, 2017).



**Gambar 6.1** Percabangan tunas aksilar melalui pembentukan tunas majemuk: a. eksplan primer; b. tunas majemuk; c. subkultur tunas yang dipotong untuk eksplan baru; d. tunas-tunas majemuk baru untuk subkultur berikutnya; e. diakarkan untuk mendapatkan planlet; f. aklimatisasi planlet; g. bibit pisang siap tanam dalam jumlah banyak

Pada kultur tunas tunggal dari eksplan potongan batang satu buku, tunas-tunas tunggal dapat dipotong-potong menjadi eksplan satu buku untuk disubkultur dan tumbuh menjadi tunas tunggal baru yang terdiri dari beberapa buku. Tunas-tunas tunggal tersebut dapat digunakan lagi sebagai eksplan pada periode pengulturan berikutnya, sampai jumlah tunas yang

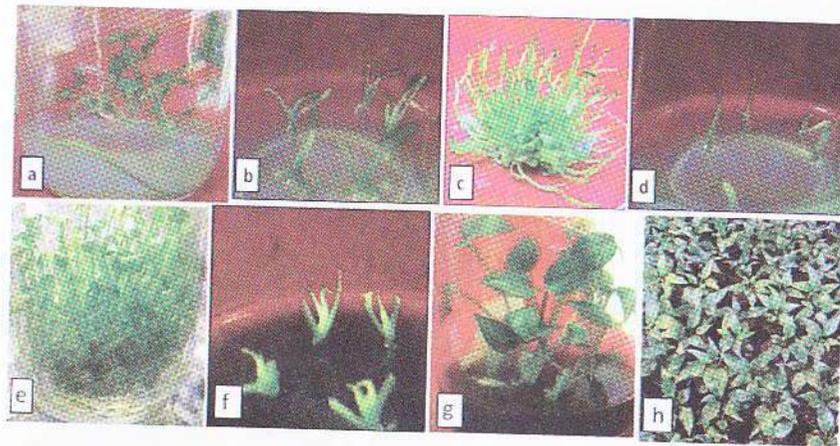
diinginkan tercapai. Selanjutnya, tunas dapat diakarkan dan diaklimatisasi menjadi bibit siap tanam (Gambar 6.2).



**Gambar 6.2** Nodal culture: a. kultur eksplan satu buku; b. tunas-tunas tunggal yang mempunyai beberapa buku; c & d tunas dipotong-potong menjadi eksplan baru; e. eksplan tumbuh menjadi tunas-tunas tunggal yang baru; f. tunas diakarkan sekaligus diaklimatisasi; g. bibit yang seragam

Kombinasi kedua cara ini masih disebut sebagai percabangan tunas lateral apabila eksplan potongan batang satu buku menghasilkan tunas majemuk yang masing-masing tunasnya mempunyai beberapa buku. Masing-masing tunas pada *cluster* tunas majemuk dapat dipotong-potong menjadi eksplan satu buku yang apabila disubkultur nantinya masing-masing eksplan akan tumbuh dan berkembang menjadi *cluster* tunas majemuk baru. Selanjutnya, jika diperlukan bibit maka subkultur dilakukan ke media pengakaran sehingga hasilnya adalah planlet, bukan *cluster* tunas majemuk. Plantlet diaklimatisasi sehingga menjadi bibit-bibit yang siap tanam (Gambar 6.3). Contoh pola regenerasi

cara ini dilaporkan oleh Yusnita *et al.*, (2010) untuk *Anthurium plowmanii* serta Hapsoro *et al.*, (1995), Hapsoro dan Yusnita (1993, 1997) untuk tanaman vanili.



**Gambar 6.3** Kultur *anthurium* dengan pola regenerasi percabangan tunas aksilar: a. *seedling* sebagai sumber eksplan; b. kultur eksplan satu buku; c. tunas majemuk dari eksplan satu buku; d. eksplan satu buku dari setiap tunas majemuk; e. kultur tunas majemuk; f. eksplan satu buku untuk diakarkan menjadi planlet; g. planlet yang siap diaklimatisasi; h. aklimatisasi planlet

Metode perbanyakan tanaman *in vitro* dengan pola regenerasi percabangan tunas aksilar saat ini paling banyak digunakan untuk menghasilkan bibit *true-to-type*. Alasannya karena tanaman regeneran berasal dari mata tunas yang sudah ada pada eksplan, walaupun sering kali menghasilkan rasio perbanyakan lebih rendah dibandingkan dengan organogenesis dan embriogenesis somatik. Prinsipnya, eksplan yang sebelumnya sudah memiliki mata tunas dikulturkan di media dengan mengandung sitokinin untuk merangsang pecah dan tumbuhnya mata tunas. Kemudian, tunas-tunas baru yang terbentuk disubkultur berulang-ulang hingga didapatkan sejumlah tunas dengan jumlah banyak. Tunas dapat diakarkan menjadi planlet lalu diaklimatisasi.

## Organogenesis

Organogenesis adalah proses pembentukan organ tanaman, seperti tunas, akar, atau bunga secara *de novo* (terbentuk baru) dari jaringan eksplan yang sebelumnya tidak bermeristem (Schwarz and Beaty, 2000). Pembentukan tunas-tunas adventif pada organogenesis dapat terjadi secara langsung dari permukaan jaringan eksplan atau secara tidak langsung dengan didahului terbentuknya kalus pada permukaan eksplan.

Pada perbanyakan *in vitro* tanaman, pola regenerasi dengan cara organogenesis lazimnya dimulai dengan pembentukan tunas-tunas adventif lalu diikuti dengan pengakaran tunas untuk membentuk planlet. Selanjutnya, planlet dapat diaklimatisasi dan dipelihara hingga bibit siap ditanam di lapangan. Secara lebih detail, proses pertumbuhan sekaligus perkembangan eksplan menjadi tunas adventif dan berbagai faktor yang memengaruhinya diulas secara khusus pada Bab 10.

## Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik adalah proses pembentukan embrio secara *de novo* (terbentuk baru) dari jaringan eksplan yang sebelumnya tidak bermeristem. Embrio yang terbentuk disebut dengan embrio somatik karena berasal dari sel-sel somatik eksplan. Pembentukan embrio somatik secara adventif dapat terjadi secara langsung dari permukaan jaringan eksplan atau secara tidak langsung dengan didahului terbentuknya kalus pada permukaan eksplan. Selanjutnya, embrio somatik dapat dikecambahkan atau dirangsang untuk tumbuh sekaligus berkembang menjadi planlet yang dapat diaklimatisasi dan dipelihara hingga bibit siap ditanam di lapangan. Secara lebih detail, proses embriogenesis somatik dan berbagai faktor yang memengaruhinya diulas secara khusus pada Bab 11.



## Bab 7

### Tahapan Perbanyakan Tanaman *In Vitro*



Perbanyakan tanaman *in vitro* merupakan rangkaian proses yang terdiri dari lima tahap berurutan, yaitu berawal dari seleksi tanaman induk sumber eksplan, berakhir dengan aklimatisasi plantlet untuk produksi bibit. Tahap paling awal disebut Tahap 0, yaitu pemilihan dan penanganan tanaman induk. Disebut Tahap 0 karena proses pengulturan belum dimulai. Sesuai kesepakatan para pakar peneliti kultur jaringan, tahap ini dianggap sangat penting dan merupakan salah satu penentu bagi keberhasilan tahap-tahap berikutnya. Selanjutnya, Tahap 1 adalah *culture establishment*, Tahap II adalah perbanyakan propagul *in vitro*, Tahap III adalah pemanjangan tunas sekaligus pengakaran, dan Tahap IV adalah aklimatisasi plantlet.

#### Tahap 0: Pemilihan dan Penanganan Tanaman Induk

Setiap pengulturan tanaman *in vitro* berawal dari eksplan. Eksplan adalah bagian kecil organ atau jaringan tanaman yang digunakan untuk memulai pengulturan awal. Eksplan yang berasal dari tanaman induk dan dikulturkan pertama kali lazim disebut eksplan primer. Kemudian, agar kultur jaringan tanaman berhasil, beberapa aspek yang perlu mendapat perhatian dari pemilihan eksplan sebagai bahan tanaman awal pengulturan adalah kesehatan tanaman induk, bagian tanaman mana yang

digunakan sebagai eksplan, umur fisiologi dan unsur ontogenetik tanaman induk, ukuran eksplan, dan cara sterilisasi eksplan.

### Pemeliharaan dan Penanganan Tanaman Induk

Tanaman induk yang digunakan sebagai sumber eksplan harus terbebas dari infeksi patogen penyebab penyakit maupun serangan hama (terutama kutu sebagai vektor penyakit). Tanaman tampak sehat dan bugar yang hidup di alam bebas tidak selalu terbebas dari *transmissible pathogen* atau *endophytic microorganisms* di dalam tubuhnya. Untuk memastikan bahwa suatu tanaman induk terbebas dari virus tertentu dapat dilakukan dengan *Ezyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Pada tanaman terinfeksi virus atau patogen sistemik lainnya, hanya sel-sel di bagian meristem pucuk di mana belum memiliki pembuluh vaskuler yang tidak mengandung patogen *transmissible* tersebut. Oleh karena itu, penggunaan meristem pucuk sebagai eksplan dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman bebas virus atau bebas patogen.

Tanaman yang hidup di alam bebas umumnya tidak mudah disterilkan untuk menghasilkan eksplan aseptik karena kebanyakan tanaman tersebut mengandung mikroorganisme endofitik di dalam tubuhnya. Oleh karena itu, agar tingkat kontaminasi dapat ditekan serendah mungkin sering kali tanaman induk harus dipelihara di rumah kaca kedap serangga, dipangkas, dipupuk, dan disemprot dengan pestisida (bakterisida maupun fungisida) sistemik. Tujuannya agar *flush* atau trubusan tunas baru tidak terlalu banyak mengandung mikroorganisme endofitik. Eksplan dari trubusan baru dalam lingkungan rumah kaca/rumah tanaman kedap serangga kemungkinan lebih "bersih" daripada eksplan dari trubusan baru yang hidup di alam bebas.

### Bagian Tanaman yang Digunakan untuk Eksplan

Eksplan untuk pengulturan awal dapat berupa sel tanaman tanpa dinding (*protoplast*), kumpulan sel, biji, bagian dari biji (misalnya kotiledon, embrio, atau poros embrio), hipokotil, pucuk tunas, ujung meristem apikal, potongan batang berbuku, mata tunas, potongan batang antarbuku (*internodes*), potongan daun muda, tangkai daun, ujung akar, anther, ovul, dan bagian-bagian bunga. Bagaimana kita dapat mengetahui bagian tanaman mana yang paling sesuai digunakan untuk eksplan? Hal ini tergantung pada tujuan pengulturan dan pola regenerasi apa yang akan dilalui oleh eksplan menjadi tanaman. Guna menghasilkan bibit *true-to-type* maka pola regenerasi *in vitro* paling baik adalah percabangan tunas aksilar dengan menggunakan eksplan potongan batang berbuku, pucuk tunas, meristem, mata tunas pada tangkai bunga, atau eksplan yang sudah mempunyai mata tunas. Contoh tanaman di mana perbanyakannya menggunakan pola regenerasi percabangan tunas aksilar yang menggunakan eksplan meristem, pucuk tunas, atau potongan batang berbuku adalah kentang, nanas, pisang krisan, jati, tebu, mawar, *eucalyptus*, *aglaonema*, dan sebagainya. Perbanyakan klonal *Phalaenopsis* dapat dilakukan dengan eksplan potongan tangkai bunga bermata tunas. Gambar 7.1 adalah contoh eksplan primer nanas dari potongan batang *crown* (tunas mahkota) atau dari *sucker*.



**Gambar 7.1** Eksplan primer nanas dari potongan *crown* atau *sucker*

Pada beberapa tanaman, regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik atau organogenesis juga dapat digunakan untuk produksi tanaman regeneran *true-to-type*, atau untuk memfasilitasi rekayasa genetika tanaman, misalnya pada tanaman kurma, kopi, kelapa sawit, tebu, bambu, dan berbagai tanaman kehutanan. Untuk pola regenerasi embriogenesis somatik atau organogenesis ini, eksplan yang digunakan biasanya adalah bagian tanaman yang tidak mempunyai mata tunas, misalnya potongan daun muda, kotiledon muda, embrio yang diambil dari buah muda, hipokotil, ujung akar, atau bagian-bagian bunga.

### Ukuran Eksplan

Pada umumnya, ukuran eksplan berbanding lurus dengan tingkat kontaminasi dan berbanding terbalik dengan kecepatan tumbuhnya. Semakin kecil ukuran eksplan, semakin sedikit tingkat kontaminasi. Semakin kecil ukuran eksplan, semakin lambat pertumbuhannya. Semakin besar ukuran eksplan, semakin sulit untuk mendapatkan kultur yang steril. Semakin besar ukuran eksplan, semakin cepat tumbuhnya. Kebanyakan

eksplan berupa potongan batang satu buku berukuran 1–2 cm. Sementara itu, eksplan potongan daun umumnya berukuran (0,5-1 cm x 0,5-1 cm) berbentuk segi empat atau lingkaran yang pemotongannya dilakukan menggunakan ujung pisau skalpel ataupun pelubang gabus dengan diameter 1 cm.

Sehubungan dengan ukuran eksplan ini, penggunaan ujung meristem yang sangat kecil (berukuran 0,2-0,3 mm), yaitu terdiri dari kubah meristem apikal dengan satu pasang primordia daun (Gambar 7.2) dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman bebas patogen.



**Gambar 7.2** Eksplan meristem apikal dari koleus. Ukuran eksplan yang terdiri dari kubah apikal dengan 1 pasang primordia daun adalah 0,3 mm. Pemotongan eksplan dilakukan menggunakan mikroskop binokuler di dalam LAFC.

Cara ini dikenal dengan kultur meristem *in vitro*. Pengambilan eksplan sangat kecil ini dilakukan menggunakan mikroskop binokuler yang diletakkan di *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC).

Kultur meristem *in vitro* dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman bebas penyakit, yang pantogennya (pada umumnya virus) sudah menginfeksi pembuluh vaskuler tanaman. Sel-sel pada bagian paling ujung meristem apikal aktif membelah diri dan belum berdiferensiasi menjadi jaringan pembuluh vaskuler sehingga virus belum terdapat di bagian tersebut. Oleh karena itu, tanaman regenerasi hasil dari kultur *in vitro* bagian tersebut akan terbebas dari virus dan dapat diperbanyak atau digunakan sebagai bahan entres untuk okulasi, misalnya pada tanaman jeruk dan buah-buahan lain.

### Umur Fisiologi dan Ontogenetik Tanaman Induk

Eksplan umumnya diambil dari jaringan, di mana secara fisiologi masih muda, seperti daun muda yang sudah membesar sempurna, bagian pucuk ranting, ujung akar, dan sebagainya. Jaringan muda mempunyai sel-sel bersifat meristematik, lebih mudah membelah diri, dan lebih responsif terhadap ZPT yang ada di media kultur. Umur ontogenetik tanaman adalah masa transisi dari fase juvenil menuju fase dewasa. Fase juvenil adalah masa ketika tanaman belum mampu berbunga walaupun dirangsang pembungaannya dengan perlakuan perangsangan pembungaan. Sementara itu, fase dewasa atau *mature* adalah masa ketika tanaman sudah mampu berbunga. Guna menjamin bahwa tanaman induk sumber eksplan adalah dari varietas tertentu atau sudah mengekspresikan sifat-sifat unggulnya, umumnya eksplan diambil dari tanaman induk dewasa yang sudah berbunga dan berbuah. Namun demikian, eksplan dengan bahan tanaman dewasa umumnya lebih sulit beregenerasi dibandingkan dengan eksplan yang diambil dari tanaman pada fase juvenil. Daya regenerasi eksplan dapat diartikan kemampuan eksplan untuk beregenerasi menjadi kalus, tunas, akar/embrio

somatik, dan akhirnya menjadi tanaman baru. Secara umum, kapasitas beregenerasi suatu bagian tanaman berbanding lurus dengan derajat juvenilitasnya. Makin juvenil makin tinggi daya regenerasi, makin dewasa makin sulit beregenerasi.

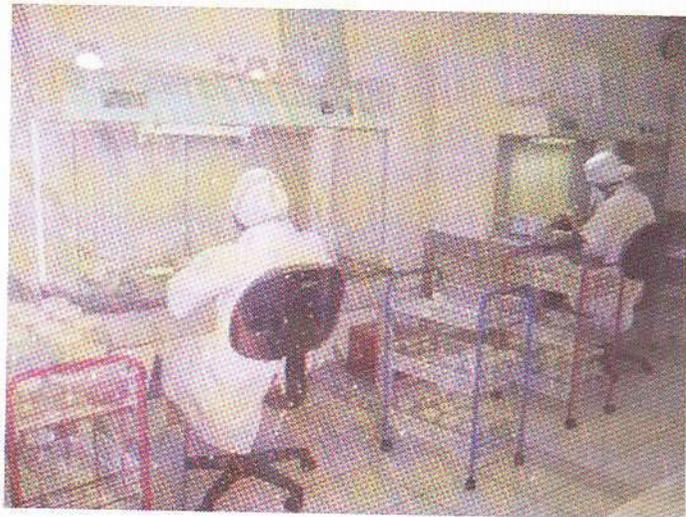
### **Tahap I: Pembuatan Kultur Awal yang Aseptik**

Tahap I disebut juga *culture establishment* bertujuan untuk mendapatkan kultur aseptik dan bahan tanaman yang siap untuk diperbanyak pada tahap selanjutnya. Tahap ini memerlukan waktu 1-2 bulan tergantung pada jenis tanaman dan kemudahannya beregenerasi. Tahap I dinyatakan berhasil apabila eksplan yang dikulturkan selama 2-4 minggu masih hidup, tidak terkontaminasi bakteri/jamur, dan menunjukkan pertumbuhan awal.

Berikutnya, agar didapatkan kultur awal yang aseptik, eksplan harus disterilkan dan ditanam di media steril dengan cara penanaman khusus menggunakan enkas atau *Laminar Air-Flow Cabinet* (LAFC). LAFC (Gambar 7.3) adalah sebuah kabinet dilengkapi dengan blower dan filter HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) di hadapan sebuah meja kerja, sedemikian rupa sehingga semua pekerjaan yang dilakukan dalam ruangan terhembus oleh udara tersaring filter dengan pori sangat kecil ( $0,22 \mu\text{m}$ ). Udara steril yang dihembuskan membantu pekerjaan penanaman eksplan dan subkultur dalam kondisi aseptik.

Sterilisasi media kultur dapat dilakukan dengan autoklaf pada tekanan  $1,5 \text{ kg/cm}^2$  dan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 10-15 menit. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan beberapa tahapan berikut, seperti pencucian eksplan yang diberi detergen dengan air mengalir, perendaman maupun pengocokan eksplan dalam desinfektan yang ditetesi surfaktan, dan pembilasan eksplan

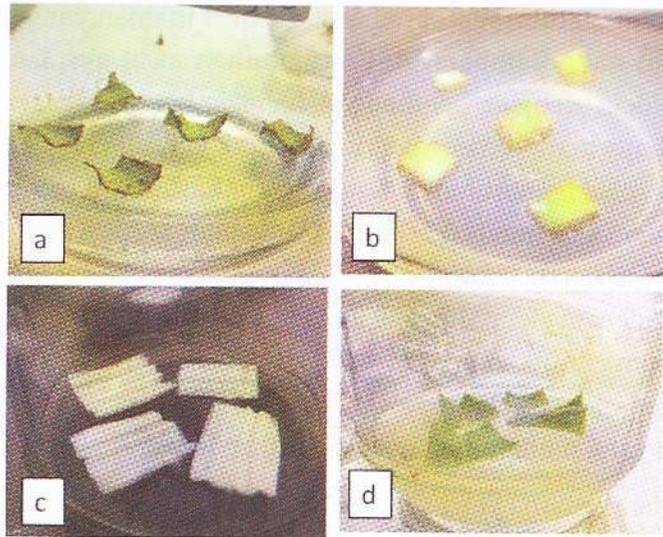
dengan air steril (air yang disterilkan dengan autoklaf) beberapa kali untuk menghilangkan sisa desinfektan yang menempel pada eksplan. Cara sterilisasi ini dapat dimodifikasi sesuai dengan jenis dan tingkat kelunakan jaringan eksplan. Desinfektan yang sering digunakan untuk sterilisasi eksplan adalah sodium hipoklorit ( $\text{NaOCl}$ ), etanol (etil alkohol), propanol (propionil-alkohol), dan merkuri klorida ( $\text{HgCl}_2$ ). Berikutnya yang lebih jarang, seperti kalsium hipoklorit ( $\text{CaOCl}_2$ ) dan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Penggunaan  $\text{HgCl}_2$  harus sangat hati-hati karena senyawa ini mengandung logam berat yang bersifat toksik dan karsinogenik. Penggunaan etanol 70% umumnya untuk mencelup cepat eksplan yang permukaan jaringannya cukup keras, misalnya eksplan-eksplan tanaman berkayu.  $\text{NaOCl}$  atau sodium hipoklorit adalah bahan aktif pemutih pakaian. Oleh karena itu, larutan pemutih pakaian sering digunakan untuk sterilisasi eksplan.



**Gambar 7.3** Laminar Air-Flow Cabinet (LAF) untuk pekerjaan aseptik kultur jaringan tanaman

Contoh kultur Tahap I beberapa jenis tanaman yang aseptik disajikan pada Gambar 7.4. Pertumbuhan awal eksplan dapat ditunjukkan dengan pembengkakan eksplan, pecah sekaligus tumbuhnya mata tunas, atau membentuk kalus. Sebagai contoh, eksplan pisang umumnya hanya menghasilkan 1 tunas atau paling banyak 2 tunas. Selanjutnya, eksplan aseptik yang sudah melalui tahapan *establishment* dipindahkan ke media baru untuk memperbanyak tunas/PT. Pada kultur yang memerlukan waktu lama untuk merespons ZPT dalam media, seperti eksplan potongan daun kelapa sawit, eksplan dikulturkan di media Tahap I yang menginduksi pembentukan kalus.

Masalah utama yang sering dijumpai pada Tahap I ini adalah kontaminasi kultur oleh mikroorganisme (jamur atau bakteri atau keduanya). Kontaminasi kultur oleh mikroorganisme ini sangat umum dihadapi dan berpotensi menyebabkan kerugian yang besar apabila tidak ditangani dengan sistematis. Kontaminasi eksplan bisa disebabkan oleh berbagai faktor, misalnya bahan tanaman sumber eksplan mengandung bakteri endofitik, sterilisasi eksplan tidak efektif, pencucian botol kurang bersih, sterilisasi media tidak sempurna, teknik aseptik kurang tepat yang melibatkan keahlian dari operator, dan sanitasi (meja kerja, alat-alat diseksi, dan sebagainya).



**Gambar 7.4** Contoh eksplan primer pada kultur tahap I: a. potongan daun muda kopi robusta; b. potongan daun *Sansevieria*; c. potongan daun kelapa sawit; d. potongan daun krisan

Masalah penting lainnya yang sering dihadapi adalah pencokelatan atau penghitaman kultur, yaitu pada eksplan lalu terdifusi ke media (Gambar 7.5). Eksudat berwarna coklat atau hitam pada eksplan yang dikulturkan *in vitro* telah banyak dilaporkan karena disebabkan oleh oksidasi senyawa fenolik, di mana menghasilkan senyawa-senyawa *quinines* yang dapat meracuni dan menghambat pertumbuhan sekaligus perkembangan eksplan (Titov, *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2013).



**Gambar 7.5** Penghitaman (*blackening*) eksplan pada kultur pisang raja bulu; jika tidak diatasi dapat mematikan tanaman yang dikulturkan

Beberapa cara mengatasi masalah *blackening* atau *browning* pada kultur tahap awal telah menjadi bahan diskusi di banyak forum kultur jaringan. Di antara tindakan yang dapat dilakukan untuk mengurangi pencokelatan atau penghitaman eksplan adalah pemindahan kultur atau subkultur setiap seminggu atau dua minggu sekali ke media baru; pemotongan eksplan dengan pisau skalpel yang sangat tajam untuk menghindari pelukaan eksplan; pemotongan eksplan dalam larutan antioksidan sebelum dikulturkan, misalnya larutan asam askorbat atau asam sitrat; pengulturan awal di media cair; menginkubasi kultur awal di ruang gelap atau bersuhu rendah (4-10°C) untuk memperlambat metabolisme di dalam jaringan eksplan; dan penambahan antioksidan (asam askorbat, asam sitrat, arang aktif, atau PVP (*polyvinylpyrrolidone*) ke dalam media kultur. Ngomuo, *et al.*, (2014) melaporkan bahwa perendaman eksplan pisang plantain dengan 1,2 g/l asam askorbat sekaligus penambahan 100 mg/l asam askorbat dalam media dapat mengatasi penghitaman pada eksplan dan media. Di samping itu, pengurangan konsentrasi unsur hara tertentu, seperti Co dan Cu dalam media *establishment* juga dapat mengurangi pencokelatan eksplan.

## Tahap II: Perbanyak Propagul

Pada tahap ini, eksplan aseptik yang sudah menunjukkan pertumbuhan awal dari Tahap I disubkultur ke media baru untuk memperbanyak bahan tanaman atau propagul. Propagul dapat berupa tunas, buku-buku, atau embrio somatik. Eksplan aseptik dari kultur Tahap I yang disubkultur ke media baru dengan ZPT sesuai akan mengalami perbanyak tunas atau embrio. Periode pengulturan Tahap II ini dapat diulang beberapa kali untuk menghasilkan tunas-tunas mikro dalam jumlah yang banyak

(Gambar 7.6) sebelum diakarkan pada tahap berikutnya. Jumlah tunas yang dihasilkan pada tahap perbanyakkan akan bertambah sesuai deret ukur dengan faktor pengali jumlah tunas per eksplan per periode pengulturan. Setiap periode pengulturan lamanya tergantung dari jenis tanaman, umumnya 1- 2 bulan.

Rasio perbanyakkan tunas aksilar atau jumlah tunas yang dihasilkan per eksplan per periode pengulturan pada Tahap II ini pada pola percabangan tunas aksilar beberapa kali lipat, misalnya 3-4 kali. Masing-masing tunas bisa subkultur ke media perbanyakkan tunas lagi. Proses perbanyakkan di Tahap II ini bisa dilakukan hingga 4-6 periode pengulturan. Jadi, agar tunas menjadi banyak maka harus dilakukan subkultur beberapa kali.



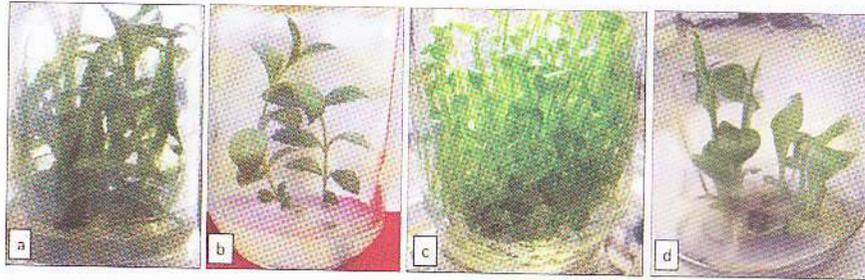
**Gambar 7.6** Pada Tahap II, jumlah tunas dilipatgandakan melalui beberapa kali periode pengulturan hingga jumlahnya banyak

Sebagai contoh, jika kultur Tahap I memerlukan waktu dua bulan dan setiap periode pengulturan untuk dilakukan subkultur (disebut juga satu *passage*) memerlukan waktu satu bulan maka untuk 6 periode pengulturan Tahap II diperlukan waktu 8 bulan sejak penanaman eksplan primer. Biasanya pada subkultur-subkultur awal, jumlah tunas yang dihasilkan masih sedikit, yaitu 2-3 tunas per eksplan. Namun demikian, pada *passage-passage* berikutnya, jumlah tunas yang dihasilkan umumnya meningkat menjadi 4 atau 5 tunas per eksplan. Secara kasar, jika dibuat rata-rata, misalkan setiap eksplan pisang pada Tahap II (di media perbanyakkan tunas) membentuk 3 tunas per eksplan per *passage* maka setelah subkultur ke-1 dihasilkan 3 tunas, setelah subkultur ke-2 dihasilkan 9 tunas, setelah subkultur ke-3 dihasilkan 27 tunas, setelah subkultur ke-4 dihasilkan 81 tunas, setelah subkultur ke-5 dihasilkan 243 tunas, dan setelah subkultur ke-6 dihasilkan 729 tunas. Berikutnya, dengan perkiraan terjadinya kehilangan tunas yang terkontaminasi atau ketidaknormalan pertumbuhan selama proses subkultur sebesar 10% masih dihasilkan sekitar 656 tunas per eksplan dalam waktu 8 bulan. Pada kenyataannya, jumlah ini bisa lebih atau kurang tergantung pada genotipe, kontaminasi, dan ketepatan formulasi media kultur. Apabila suatu laboratorium kultur jaringan memulai pengulturan dengan 500 eksplan steril setiap bulan (sekitar 20 eksplan per hari) maka diperkirakan pada akhir bulan kesembilan dapat dihasilkan tunas mikro pisang sekitar  $500 \times 656 = 328.500$  tunas pisang. Setelah pengakaran *in vitro* selama 1 bulan dan diaklimatisasi selama 2-3 bulan maka pada bulan ke-12 atau ke-13 diperkirakan dihasilkan 300.000-an bibit dengan asumsi keberhasilan aklimatisasi tidak kurang dari 95%.

Namun demikian, apabila karena kebutuhan bibit yang mendesak membuat sebelum *passage* ke-6 tunas sudah harus

diakarkan dan diaklimatsasi maka perhitungan produksi bibit ini tentu akan berkurang. Apabila penanaman eksplan dilakukan setiap bulan sepanjang tahun secara konsisten 20 eksplan aseptik per hari maka dapat dibuat matriks jumlah tunas dan jumlah bibit teraklimatisasi yang dihasilkan setiap bulan sekaligus dalam setahun. Jumlah bibit sehat yang seragam ukurannya tersebut jauh lebih banyak dibandingkan bibit pisang yang dihasilkan secara konvensional dengan anakan atau belahan bonggol.

Pada kasus lain, nisbah perbanyakkan bisa jauh lebih tinggi apabila pola regenerasi tidak hanya terjadi melalui percabangan tunas aksilar yang membentuk *cluster* tunas dan masing-masing tunas terdiri dari banyak buku. Dengan demikian, ketika disubkultur, eksplan baru yang ditanam sangat banyak. Gambar 7.7 menunjukkan contoh kultur beberapa jenis tanaman pada tahap perbanyakkan tunas.



**Gambar 7.7** Contoh kultur beberapa jenis tanaman pada tahap perbanyakkan tunas: a. kultur nanas; b. jati; c. *Anthurium plowmanii*; d. pisang raja bulu pada tahap perbanyakkan propagul atau Tahap II

### Tahap III: Pemanjangan dan Pengakaran Tunas

Berikutnya, agar tunas-tunas yang diperbanyak pada Tahap II dapat diaklimatisasi, diperlukan pemanjangan tunas dan pengakaran. Tahap ini adalah Tahap III yang kurang lebih

memerlukan waktu 1 bulan. Pada tahap III, ini setiap individu tunas dipisah-pisah dan dikulturkan di media pengakaran yang mengandung auksin atau tanpa auksin dengan arang aktif. Auksin, misalnya IBA, NAA, atau IAA sering ditambahkan di media pengakaran pada konsentrasi 1-5 mg/l untuk merangsang tunas supaya berakar lebih cepat. Selain auksin, penambahan arang aktif ke media juga dapat memperbaiki pengakaran tunas. Pada kultur tanaman yang mudah berakar, tak jarang tunas-tunas pada Tahap II yang medianya mengandung sitokinin pun sudah berakar. Namun demikian, apabila tunas-tunas yang berakar tersebut berada dalam suatu *cluster* serta langsung diaklimatisasi, membuat beberapa tunas tidak mempunyai akar. Oleh sebab itu, untuk menjamin berakarnya setiap tunas diperlukan tahap pengakaran, di mana setiap individu tunas ditransfer ke media pengakaran. Tunas-tunas yang sudah berakar dapat diaklimatisasi. Namun demikian, untuk menghemat waktu dan biaya, tunas-tunas yang sudah cukup besar dari kultur Tahap II dapat dipotong lalu diakarkan bersamaan dengan proses aklimatisasi. Pengakaran yang dilakukan bersamaan dengan aklimatisasi disebut pengakaran *ex vitro* (pengakaran di luar wadah kultur). Pengakaran *ex vitro* tunas-tunas dari kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan pemberian perangsang akar pada dasar tunas sebelum ditanam di media aklimatisasi yang terdiri dari campuran kompos, *coco peat*, arang sekam, dan pasir. Cara ini jika berhasil akan sangat menghemat waktu dan biaya produksi bibit karena tidak memerlukan tahap khusus pengakaran *in vitro*. Pada akhir tahap III akan diperoleh kultur tunas atau planlet (tunas berakar) dalam jumlah banyak yang dapat diaklimatisasi pada tahap berikutnya untuk menghasilkan bibit. Contoh planlet beberapa jenis tanaman disajikan pada Gambar 7.8.

#### Tahap IV: Aklimatisasi Planlet ke Lingkungan *Ex Vitro*

Setelah didapatkan tunas-tunas berakar (disebut planlet) dalam jumlah yang diperlukan, tahap berikutnya adalah Tahap IV atau aklimatisasi planlet. Aklimatisasi adalah proses pengadaptasian tanaman yang berasal dari kultur *in vitro* ke lingkungan *ex vitro*. Tanaman kecil yang terbentuk, tumbuh, berkembang, sudah terbiasa hidup di lingkungan *in vitro* dengan intensitas cahaya lampu rendah, kelembapan nisbi (RH) tinggi (hampir selalu 100%), suhu relatif rendah ( $260 \pm 20C$ ), aseptik, serta selalu mendapat suplai energi berkecukupan akan menghadapi lingkungan *ex vitro* dengan RH rendah, suhu, intensitas cahaya lebih tinggi, septik, dan harus dapat berfotosintesis secara mandiri (autotrof).



Gambar 7.8 Planlet yang sudah dapat diaklimatisasi: a. krisan; b. pisang; c. nanas; d. *anthurium*; e. tebu; f. angrek *dendrobium*

Kondisi yang sangat berbeda antara *in vitro* dan *ex vitro* tersebut sering kali membuat planlet mengalami stres jika tidak secara bertahap diaklimatisasi. Di samping itu, planlet tampak segar dan hijau dalam kondisi *in vitro* umumnya mempunyai karakteristik khusus yang membuatnya cepat layu apabila dipindahkan ke lingkungan di luar botol kultur. Misalnya, yaitu lapisan lilin kutikula daun tidak terbentuk atau sangat sedikit (Sutter & Langhans, 1982), bersifat polar (kurang hidrofobik) dengan stomata yang abnormal, dan hampir selalu membuka (Capellades *et al.*, 1990). Oleh karena itu, agar planlet dapat hidup normal sekaligus menjadi bibit siap tanam di lapangan diperlukan kondisi lingkungan yang adaptif secara bertahap menuju lingkungan rumah kaca dan kondisi lapangan yang baik. Aklimatisasi planlet umumnya dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Meletakkan kultur di suhu ruang dengan penerangan intensitas cahaya matahari tidak langsung selama beberapa hari (tindakan ini disebut juga penguatan planlet atau *hardening off the plantlets*).
2. Mengeluarkan planlet dari botol secara hati-hati.
3. Mencuci bersih bagian planlet dari media kultur yang menempel.
4. Merendam planlet dalam larutan fungisida dan bakterisida lalu ditiriskan beberapa saat.
5. Menanam planlet di media aklimatisasi yang gembur, ber-aerasi, dan drainase baik.
6. Mengondisikan planlet pada lingkungan yang RH-nya tinggi (disungkup plastik transparan) dalam rumah tanaman dengan intensitas cahayanya relatif rendah ( $\pm 50\%$ ). Kemudian, setelah beberapa hari secara bertahap sungkup

plastik dibuka agar RH turun dan intensitas cahaya bertambah sampai terbentuk daun baru pada planlet.

7. Memindahkan planlet ke lingkungan dengan RH normal dan cahaya matahari penuh.

Media tanam yang digunakan untuk aklimatisasi dapat dibuat dari campuran beberapa bahan media tanam, misalnya kompos, pasir, *cocopeat*, arang sekam, *perlite*, *vermiculit*, dan sebagainya. Asalkan mempunyai sifat-sifat, seperti gembur, aerasi sekaligus drainase baik, tidak mengandung inokulum patogen tular tanah maupun biji gulma, dan mengandung nutrisi cukup bagi planlet yang akan diaklimatisasi. Sebelum ditanami planlet, sebaiknya campuran media dipanaskan dengan solarisasi selama tiga hingga enam minggu untuk mengendalikan mikroorganisme patogen tular tanah. Solarisasi media tanam adalah proses pemanasan campuran media menggunakan energi cahaya matahari selama beberapa minggu untuk menekan viabilitas patogen tular tanah (jamur, bakteri, nematoda, virus, dan sebagainya) sehingga penyakit tanaman tidak dapat berkembang (Rahayu, 2017). Caranya, media ditutup dengan plastik mulsa dan dibiarkan terpapar cahaya matahari penuh selama 4-6 minggu (Gambar 7.9).



**Gambar 7.9** Solarisasi media tanam dengan cara menutupi campuran media dengan plastik mulsa lalu dibiarkan terpapar cahaya matahari penuh selama beberapa minggu

Pada skala kecil, aklimatisasi planlet dapat dilakukan melalui penyungkupan setiap individu pot berisi planlet dengan plastik transparan (Gambar 7.10) pada tempat yang mendapat cahaya matahari tidak langsung (50% cahaya penuh), dan setelah beberapa hari dibuka secara bertahap hingga planlet dapat bertahan hidup tanpa sungkup. Planlet yang sudah mulai teraklimatisasi di lingkungan *ex vitro* ditandai dengan terbentuknya daun baru pada planlet. Pada skala besar, aklimatisasi planlet dilakukan dengan cara menanam planlet di *polybag*, lalu secara bersama-sama disungkup plastik di bawah naungan paranet. Setelah satu hingga dua minggu, sungkup plastik dibuka secara bertahap hingga planlet teraklimatisasi dan dapat tumbuh dengan baik tanpa penyungkupan. Selanjutnya, bibit dapat dipindahkan ke tempat dengan intensitas cahaya lebih tinggi (Gambar 7.11).



**Gambar 7.10** Aklimatisasi planlet pada skala kecil: a. menyungkup planlet dengan plastik transparan; b & c sungkup dibuka secara bertahap hingga planlet dapat hidup tanpa sungkup; d. bibit dipindahkan ke *polybag* lebih besar pada tempat dengan intensitas cahaya lebih tinggi



**Gambar 7.11** Aklimatisasi planlet skala besar: a. planlet disungkup plastik di bawah naungan paranet; b. sungkup plastik dibuka secara bertahap hingga planlet teraklimatisasi; c. bibit dipindahkan ke tempat dengan intensitas cahaya yang lebih tinggi hingga siap tanam

Berikutnya, untuk menghasilkan bibit dengan kualitas tinggi, pemeliharaan yang perlu dilakukan selama aklimatisasi sekaligus pembesaran bibit di nurseri adalah sanitasi tempat aklimatisasi, penyiraman, dan pemupukan (dengan pupuk NPK maupun pupuk organik cair).



## Bab 8

### Teknik Bekerja Aseptik



#### Permukaan Eksplan dalam Keadaan Septik

Eksplan adalah bagian tanaman yang digunakan untuk pengulturan awal. Eksplan dapat berupa pucuk tunas, potongan batang satu buku, potongan daun atau akar, kotiledon, aksis embrio pada biji, biji utuh, bagian bunga, dan sebagainya. Oleh karena salah satu karakteristik kultur jaringan tanaman terutama adalah kultur harus aseptik maka eksplan yang hendak dikulturkan atau ditanam di media kultur steril harus dibuat aseptik. Bagian tanaman untuk eksplan berasal dari tanaman utuh yang tumbuh di alam bebas atau di rumah kaca. Permukaan terluar tanaman tersebut selalu dalam keadaan septik, walaupun sehat dan tidak menunjukkan gejala serangan hama atau penyakit. Guna menghasilkan kultur yang aseptik maka sebelum penanaman eksplan harus disterilisasi.

Kultur jaringan tanaman merupakan pengulturan secara aseptik bagian kecil tanaman dalam media buatan yang mengandung nutrisi lengkap dan sumber energi. Media buatan tersebut juga sangat baik untuk tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme. Oleh karena itu, jika eksplan masih mengandung inokulum mikroorganisme pada saat ditanam di media kultur yang steril maka inokulum mikroorganisme yang menempel atau berada di dalam jaringan eksplan akan

tumbuh dan berkembang menjadi koloni mikroorganisme yang mengontaminasi eksplan yang dikulturkan. Apabila koloni mikroorganisme tidak dikehendaki tumbuh bersamaan dengan bagian tanaman atau tanaman yang dikulturkan maka kondisi kultur seperti ini dikatakan sebagai terkontaminasi. Pada kultur tanaman yang terkontaminasi mikroorganisme, pertumbuhan mikroorganisme bisa sangat cepat. Hal ini jauh melampaui kecepatan pertumbuhan tanaman sehingga menyebabkan tanaman di dalam kultur mati. Kontaminasi juga dapat ditularkan dari botol kultur satu ke yang lain, yaitu misalnya jika inokulum jamur terbawa oleh tungau (*spider mites-Tetranychidae*) yang dapat keluar masuk botol kultur. Kontaminasi kultur oleh cendawan (jamur), bakteri, atau mikroorganisme lain (Gambar 8.1) merupakan masalah penting yang sering dihadapi dalam praktik maupun penelitian kultur jaringan tanaman.

Media kultur steril yang disimpan terlalu lama di tempat lembap dan kotor juga dapat terkontaminasi mikroorganisme walaupun belum digunakan. Hal ini dapat disebabkan oleh tingginya populasi inokulum mikroorganisme di udara ketika udara lembap, temperaturnya tinggi, atau kurang bersihnya pencucian botol kultur.



**Gambar 8.1** Kontaminasi kultur oleh cendawan (kiri) dan bakteri (kanan) merupakan masalah penting dalam kultur jaringan tanaman

Teknik bekerja secara aseptik dimaksudkan agar kontaminasi pada kultur *in vitro* tanaman tidak terjadi atau diupayakan seminimal mungkin. Kemudian, agar keberhasilannya tinggi, segala tindakan pada teknik aseptik ini harus didasarkan atas pengertian bahwa anggota badan kita, udara, peralatan yang digunakan, bahan tanaman, dan bahan media kultur adalah tidak steril, melainkan septik. Hal ini karena walaupun tidak kasatmata, permukaan anggota badan, peralatan yang digunakan, meja kerja, udara, dan air adalah tempat berpijak, menempel, atau media hidup inokulum mikroorganisme. Beberapa aspek maupun teknik aseptik esensial yang harus diterapkan dalam pekerjaan kultur jaringan tanaman adalah kebersihan pakaian maupun anggota badan operator atau pelaksana, sterilisasi eksplan, sterilisasi alat-alat tanam sekaligus media kultur, dan tata cara penanaman ataupun subkultur secara aseptik di *Laminar-Air Flow Cabinet* (L AFC).

### Kebersihan Pakaian dan Anggota Badan Operator

Operator wajib memakai jas lab dan mencuci tangan dengan sabun. Artinya, agar kontaminasi pada kultur dapat dihindarkan atau setidaknya diminimalkan maka pakaian dan anggota badan operator harus benar-benar bersih. Para mahasiswa, di mana hendak melakukan praktikum diwajibkan mengenakan jas lab yang bersih. Sebelum melakukan pekerjaan aseptik, tangan harus dicuci bersih-bersih dengan sabun dan air keran.

## Sterilisasi Eksplan

Penampilan tanaman sumber eksplan yang tampak sehat tidak menjamin kultur steril. Hal ini karena semua permukaan tanaman selalu tertempel atau disinggahi mikroorganisme di permukaannya. Mikroorganisme ini bisa saja terdapat di permukaan jaringan tanaman, di sela-sela mata tunas, di lekukan permukaan daun, dan sebagainya. Akan tetapi, mungkin juga sudah menginfeksi jaringan tanaman. Oleh karena itu, agar keberhasilan sterilisasi tinggi maka hal pertama harus diperhatikan adalah memilih tanaman sumber eksplan yang sehat, tidak bergejala penyakit atau serangan hama, dan tampak vigor. Bahkan tanaman tampak sehat pun bisa saja di dalam jaringannya sudah mengandung mikroorganisme yang hidup (*endophytic microorganisms*).

Sterilisasi eksplan yang berasal dari lapangan atau rumah kaca umumnya dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Mencuci permukaan bagian tanaman dengan air keran dan detergen lalu dibilas air keran yang mengalir selama 15-20 menit.
2. Bagian tanaman untuk eksplan direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida selama kurang lebih 30 menit lalu dibilas lagi dengan air keran.
3. Sterilisasi eksplan dilanjutkan dalam LAFC. Di dalam LAFC, eksplan direndam sambil dikocok dalam larutan 0,5-2,5% NaOCl dari pemutih pakaian selama 10-20 menit (tergantung pada tingkat kekerasan jaringan tanaman).
4. Eksplan dibilas dengan air steril (air yang sudah disterilkan dengan autoklaf) setidaknya dua kali.
5. Eksplan tanaman berkayu yang jaringannya keras biasanya mengandung banyak kontaminan. Pada eksplan seperti itu,

sebelum direndam dalam larutan NaOCl, eksplan direndam selama 30-120 detik dalam 70% etanol.

## Disinfektan untuk Sterilisasi Eksplan

Disinfektan yang sering digunakan sebagai bahan pensteril eksplan adalah mengandung klorin. Hal ini karena disinfektan jenis ini banyak tersedia di pasar, murah, dan tidak beracun bagi tanaman maupun manusia. Di samping itu, alkohol dan disinfektan lain juga dapat digunakan sebagai pensteril eksplan. Contoh bahan pensteril yang banyak digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah:

1. Natrium hipoklorit (NaOCl) pada kisaran konsentrasi 0,25%-2,5%. Kebanyakan pemutih pakaian yang dijual di pasar mengandung 5,25% NaOCl. Dengan demikian, konsentrasi pemutih pakaian yang digunakan untuk sterilisasi eksplan berkisar antara 5%-50%.
2. Kalsium hipoklorit ( $\text{CaOCl}_2$ ). Penggunaan kalsium hipoklorit dilakukan lewat mencampurkannya dengan akuades steril, mengaduknya, dibiarkan mengendap, disaring, dan larutan klorinnya digunakan sebagai pensteril. Bubuk  $\text{CaOCl}_2$  yang ekonomis biasanya hanya mengandung 50-70%  $\text{CaOCl}_2$  dan digunakan pada konsentrasi 50 g/l.
3. Etanol 70% biasanya digunakan untuk merendam bahan tanaman yang jaringannya agak keras dan potensi kontaminasinya tinggi. Penggunaan etanol sebagai bahan pensteril umumnya tetap dikombinasikan dengan bahan pensteril lain utama, misalnya NaOCl yang terdapat dalam pemutih pakaian.

Guna meningkatkan efektivitas sterilisasi, perendaman dalam larutan desinfektan umumnya dicampur dengan beberapa tetes Tween-20, Tween-80, atau detergen cair sebagai agen pembasah/surfaktan.

### Sterilisasi Alat-Alat Tanam

Alat-alat tanam, seperti cawan petri, gagang skalpel, pinset, atau gunting, sebelum digunakan harus disterilkan dulu. Demikian juga botol kultur kosong, botol berisi akuades, botol berisi kapas, atau lipatan kertas tisu kering. Sterilisasi alat maupun bahan untuk penanaman ini umumnya dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan  $1.2 \text{ kg/cm}^2$  selama 20-30 menit. Autoklaf harus mencapai suhu dan tekanan tersebut sebelum waktu sterilisasi dimulai. Semua alat diseksi harus dibungkus dulu (dengan alfoil atau kertas lalu dimasukkan plastik), sebelum disterilkan dengan autoklaf. Botol-botol kosong, botol berisi akuades, kapas, dan kertas tisu harus ditutup dengan plastik diikat karet atau alfoil sebelum disterilkan (Gambar 8.2).

Setelah disterilkan, alat-alat ini dibawa ke ruangan yang bersih sampai saat digunakan. Waktu sterilisasi alat hingga alat digunakan tidak boleh terlalu lama, biasanya hanya dua atau lima hari saja. Alat-alat diseksi yang sudah diautoklaf sebelum digunakan untuk penanaman eksplan atau subkultur harus dibawa ke LAFC dalam keadaan terbungkus lalu dibuka bungkusnya di dalam LAFC yang blowernya sudah dihidupkan. Sebelum digunakan, alat-alat tersebut disterilkan lagi dengan mencelupkan atau membasahi permukaannya melalui 95% etanol (atau spiritus) lalu dibakar. Sterilisasi alat-alat diseksi menggunakan *glass-bead sterilizer* (Gambar 8.3) di LAFC tidak

memerlukan sterilisasi dengan autoklaf sebelumnya karena suhu *glass-beads* (butiran gelas)-nya dapat mencapai suhu  $360^{\circ}\text{C}$ .



**Gambar 8.2** Botol berisi akuades, alat-alat gelas, alat-alat diseksi, kapas, atau kertas tisu harus ditutup dengan plastik diikat karet sebelum disterilkan



**Gambar 8.3** Contoh *glass-bead sterilizer*, alat pensteril alat-alat diseksi

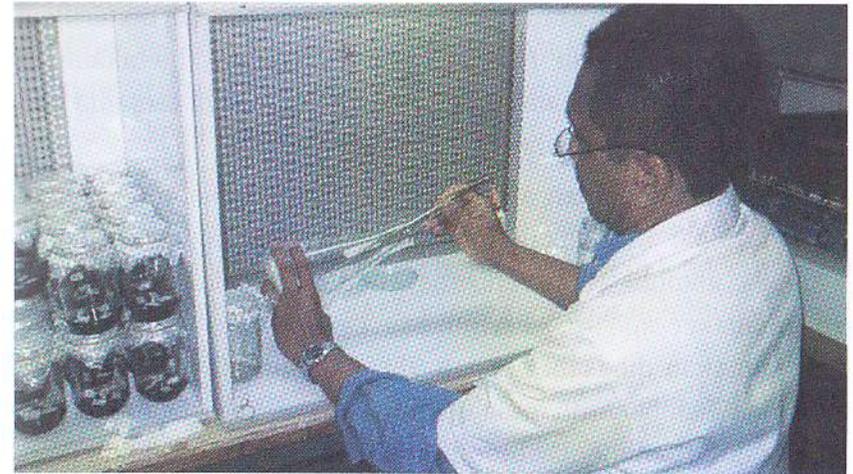
## Sterilisasi Akuades dan Media Kultur

Media kultur, akuades, ataupun larutan lain yang stabil jika dipanaskan umumnya disterilisasi dengan memasukkannya ke dalam botol kultur, labu erlenmeyer, atau botol Schott bertutup plastik. Kemudian, diautoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan  $1.2 \text{ kg/cm}^2$ . Lamanya sterilisasi bergantung pada volume larutan per botol. Kebanyakan media dalam botol kultur volumenya antara 30-40 ml/botol atau  $< 100 \text{ ml}$  dan untuk mensterilkannya diperlukan waktu 15-20 menit. Guna mensterilkan akuades atau cairan yang volumenya lebih besar, misalnya 100 ml hingga 2 liter, diperlukan waktu lebih lama, seperti 30-45 menit. Hal perlu diingat volume cairan yang disterilkan sebaiknya tidak melebihi  $\frac{3}{4}$  dari volume botol agar cairan tidak tumpah pada saat mendidih di dalam autoklaf. Sterilisasi cairan yang bersifat *thermolabile* (mengalami kerusakan jika dipanaskan) dapat dilakukan dengan menggunakan filter milipore atau membran *nitrocellulose*, sejenis filter khusus yang dapat menyaring partikel hingga  $\leq 0,22 \mu\text{m}$  (mikron). Tentu saja, wadah gelas yang digunakan untuk menyaring harus disterilkan lebih dulu. Berikutnya, proses penyaringan dan pencampuran dengan komponen media yang lain juga dilakukan secara aseptik di dalam LAFC.

## Prosedur Penanaman Eksplan dan Subkultur secara Aseptik

Pekerjaan penanaman eksplan dan subkultur atau pemindahan kultur dari media lama ke media baru harus dilakukan dalam kondisi aseptik. Sterilisasi dan subkultur sebaiknya dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) (Gambar 8.4). Alat LAFC dilengkapi dengan filter HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*) yang dapat menyaring partikel di udara dengan efisiensi tinggi, yaitu hingga 0,2-0,3 mikron.

Setelah disaring, udara bersih selanjutnya dihembuskan secara mendatar ke arah operator. Permukaan dinding maupun meja LAFC umumnya dibuat dari bahan yang tidak mudah mengakumulasi debu sekaligus mikroorganisme dan mudah dibersihkan.



Gambar 8.4 Teknik aseptik yang dikerjakan di LAFC

Tata-cara penanaman eksplan dan subkultur secara aseptik di dalam LAFC adalah sebagai berikut:

1. Supaya udara yang terhembus dari dalam ke arah operator benar-benar bersih, sekitar 15 menit sebelum digunakan LAFC harus dinyalakan terlebih dahulu.
2. Selama digunakan untuk penanaman dan subkultur, LAFC harus selalu dalam keadaan menyala, tidak boleh mati walaupun hanya sebentar. Apabila aliran listrik padam beberapa lama, sebelum digunakan lagi, LAFC harus dinyalakan lagi selama setidaknya 15 menit lagi.
3. Sebelum memulai pekerjaan aseptik, permukaan meja LAFC disemprot dengan etanol 70% atau spiritus lalu dilap dengan tisu.

4. Mencuci bagian tangan hingga siku secara bersih menggunakan sabun berantiseptik dengan air keran. Lengan sekaligus telapak tangan dibasahi dengan 70% etanol dan dibiarkan kering terlebih dulu (hati-hatilah dengan nyala api pembakar).
5. Peralatan tanam atau alat-alat diseksi yang sudah disterilkan dan semua bahan (media tanam, eksplan) diletakkan di bagian pinggir dalam LAFC. Setelah semuanya tersedia dan siap digunakan, nyalakan pembakar spiritus.
6. Sebelum digunakan, alat-alat diseksi yang sebelumnya sudah diautoklaf disterilkan dengan mencelupkannya ke dalam 95% alkohol (atau spiritus) lalu membakarnya dengan pembakar spiritus. Permukaan cawan petri yang hendak digunakan dibasahi dengan 95% alkohol atau spiritus lalu bakar. Pembakaran diulangi dua atau tiga kali pada saat akan memulai penanaman ataupun subkultur. Sebelum digunakan, ujung alat diseksi yang baru dibakar dibiarkan dulu sampai dingin agar bahan tanaman tidak rusak.
7. Ketika bekerja, posisi operator sebaiknya agak jauh dari LAFC. Namun demikian, diusahakan agar botol kultur steril, media yang akan ditanami, dan bahan tanaman steril yang akan ditanam/ditransfer diletakkan sedekat mungkin dengan filter. Diusahakan agar hembusan udara steril dari LAFC ke tempat kerja tidak terhalang sesuatu yang tidak steril.
8. Dalam melakukan penanaman dan subkultur, tangan Anda yang septik tidak menyentuh bagian apa pun yang seharusnya tetap steril. Gunakan ujung pinset steril yang secara berkala dicelup ke dalam 95% etanol atau spiritus lalu dibakar.

9. Gunakan gagang skalpel steril yang mata pisaunya baru diganti untuk mengiris bahan tanaman steril. Kemudian, letakkan bahan tanaman steril di permukaan cawan petri steril.
10. Pegang bahan tanaman steril dengan ujung pinset lalu tancapkan di media steril dalam botol kultur. Sedemikian rupa sehingga bagian yang harusnya steril tidak tersentuh tangan atau kejatuhan inokulum. Penanaman atau subkultur hendaknya dikerjakan secepat mungkin lalu tutup kembali botol kulturnya.
11. Pada saat membuka atau menutup botol kultur, sentuhkan tangan hanya di bagian luar botol kultur, dan letakkan tutup botol di bagian meja LAFC yang mendapat hembusan udara steril dari arah filter.
12. Jangan berbicara, apalagi berteriak atau menyanyi ketika mengerjakan penanaman eksplan ataupun subkultur. Apabila terpaksa berbicara, palingkan muka anda dari hembusan udara steril.
13. Apabila terpaksa harus dilakukan, akhirkkan pekerjaan subkultur untuk yang terkontaminasi. Misalnya, untuk kultur yang terkontaminasi hanya pada medianya, tetapi tidak mengenai bahan tanamannya.
14. Setelah pekerjaan penanaman atau subkultur selesai, segera bersihkan permukaan meja LAFC lalu semprot dengan 70% etanol dan lap dengan tisu bersih. Yakinkan bahwa Anda sudah mematikan pembakar bunsen atau spiritus.
15. Buang sampah pada tempatnya, jangan diletakkan menumpuk di meja LAFC. Keluarkan benda-benda yang sudah tidak dibutuhkan dari LAFC.



## Bab 9

### Formulasi Media Kultur



#### Formulasi dan Komponen Media untuk Kultur Jaringan Tanaman

Bagian tanaman yang dikulturkan *in vitro* memerlukan suplai unsur hara yang lengkap, baik unsur makro maupun unsur mikro. Di samping itu, kultur *in vitro* tanaman memerlukan suplai energi dalam bentuk gula untuk menjamin pertumbuhannya karena di dalam kultur *in vitro* laju fotosintesis tanaman sangat rendah atau tidak ada sama sekali. Berdasarkan formulasi, jenis, dan konsentrasi garam-garam mineral, vitamin, serta bahan organik lainnya, terdapat beragam formulasi media kultur jaringan tanaman. Misalnya dari Knudson C. (Knudson, 1946), Vacin dan Went (1949), Murashige dan Skoog (1962), Lloyd dan McCown (1981), dan lain-lain. Apa pun formulasinya, umumnya media kultur jaringan tanaman terdiri dari komponen-komponen berikut:

1. Air, digunakan untuk melarutkan komponen media lainnya.
2. Hara mineral makro: N, P, K, Ca, Mg, dan S.
3. Hara mineral mikro: Cu, Co, Mo, Fe, Mn, Zn, dan B.
4. Sumber energi dalam bentuk gula.
5. Beberapa vitamin (tiamin-HCl, piridoksin-HCl, asam nikotinat), zat organik lain (asam amino (glisin, pepton, tripton)), heksitol (mioinositol), dan poliamin.

6. Kompleks *addenda* kadang-kadang ditambahkan, misalnya air kelapa, ekstrak taoge, jus tomat, jus apel, jus wortel, bubur buah pisang, dan sebagainya.
7. Arang aktif terkadang ditambahkan ke dalam media untuk tujuan tertentu, misalnya pada pengakaran tunas, mengatasi efek negatif *browning*, dan mendorong perkembangan embrio somatik.
8. Zat pengatur tumbuh, terutama sitokinin, auksin, atau kombinasi keduanya digunakan untuk mengarahkan pertumbuhan sekaligus perkembangan eksplan.
9. Pematid media (jika digunakan media semipadat), seperti bubuk agar-agar atau *gelrite*.

**Air sebagai pelarut.** Semua komponen media harus terlarut dalam air. Oleh karena itu, kualitas air sebagai pelarut komponen media kultur harus benar-benar murni. Air sumur, air PDAM, dan air mineral umumnya mengandung kation, anion mineral terlarut, partikel-partikel anorganik, atau mikroorganisme sehingga kurang sesuai digunakan untuk media kultur jaringan. Kemudian, agar air dapat berfungsi maksimal sebagai pelarut komponen-komponen media maka setidaknya air harus disuling atau dihilangkan ion-ionnya. Air suling atau akuades adalah air yang dimurnikan melalui distilasi. Alat distilasinya disebut *distillator*. Melalui alat ini, air dipanaskan hingga mendidih lalu uap air didinginkan dan terkondensasi menjadi air suling atau air murni yang ditampung dalam suatu wadah.

Air bebas ion adalah air yang ion-ionnya dihilangkan melalui suatu resin penukar ion (*exchange resins*) sehingga kation maupun anion yang terdapat di dalam air tergantikan dengan  $H^+$  dan  $OH^-$  pada resin penukar ion. Cara deionisasi seperti ini

tidak mampu menghilangkan kontaminan organik. Oleh karena itu, kualitas sumber air masih berpengaruh terhadap kualitas air bebas ion. Proses *Reverse Osmosis* (RO) bila sebagian air didorong menggunakan tekanan melalui membran semipermeabel dan porsi lainnya dari air yang mengandung kontaminan dibuang. Proses ini dilaporkan dapat menghilangkan 95%-99% dari kontaminan ion-ion atau partikel-partikel organik dalam air ([puretecwater.com](http://puretecwater.com)). Saat ini, peralatan pemurnian air melalui *reverse osmosis* dengan berbagai merek dagang banyak dijual di pasar, misalnya Milli-RO™, Millipore™, RO Pure™, Brackish Water Reverse Osmosis Apparatus, PurePro® Reverse Osmosis, Pureit Unilever, dan sebagainya. Dalam praktik riset kultur jaringan, air paling sering digunakan adalah akuades atau akuabides (air bebas ion yang didistilasi). Pada keperluan komersial produksi bibit penggunaan air RO atau air bebas ion dapat digunakan dengan biaya yang lebih murah.

**Hara makro dan mikro.** Hara mineral makro dan mikro adalah hara mineral esensial yang diperlukan oleh tanaman dalam jumlah banyak (makro) atau dalam jumlah sedikit (mikro) untuk kelangsungan hidupnya, baik secara *in vivo* maupun dalam sistem kultur jaringan (*in vitro*). Hara makro dalam kebanyakan formulasi media kultur jaringan tersedia pada konsentrasi milimolar (mM), sedangkan hara mikro terdapat pada konsentrasi mikromolar ( $\mu M$ ). Hara makro bagi tanaman, yaitu nitrogen (N), fosfor (P), kalium (K), kalsium (Ca), magnesium (Mg), dan sulfur (S). Nitrogen biasanya disuplai dalam bentuk ion  $NH_4^+$  maupun  $NO_3^-$ , misalnya dalam bentuk  $NH_4NO_3$ ,  $KNO_3$ ,  $NH_4SO_4$ , dan  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ . Namun demikian, kadang-kadang juga diberikan dalam bentuk *addenda* kompleks berisi N-organik, seperti campuran beberapa asam amino (casein hidrolisat, pepton, dan tripton). Suplai fosfor umumnya

diberikan dalam bentuk garam  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  atau  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , kalium dalam bentuk garam  $\text{KCl}$  atau  $\text{KNO}_3$  atau  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , kalsium dalam bentuk garam-garam  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  atau  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , dan magnesium maupun sulfur dalam bentuk  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Dalam berbagai formulasi media kultur jaringan, unsur-unsur hara mikro umumnya diberikan dalam bentuk  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Kemudian, agar dapat larut dan tersedia bagi tanaman,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dicampur dengan senyawa pengkelat, yaitu NaEDTA.

**Gula sebagai sumber energi.** Kebanyakan bagian tanaman yang dikulturkan *in vitro* tidak autotrofik. Eksplan ataupun jaringan tanaman dalam kultur *in vitro* tidak dapat berfotosintesis secara efektif karena berbagai alasan. Beberapa alasan tersebut misalnya jaringan eksplan tidak mempunyai atau mengandung sedikit klorofil, ukurannya terlalu kecil, intensitas cahaya yang diterima terlalu rendah, keterbatasan pertukaran gas yang mengakibatkan keterbatasan ketersediaan  $\text{CO}_2$  dalam botol kultur, atau jaringan tanaman belum terorganisasi secara sempurna. Oleh karena itu, keberadaan gula dalam media kultur sangat penting sebagai sumber energi untuk pertumbuhan sekaligus perkembangan eksplan dan jaringan tanaman yang dikulturkan. Gula yang paling sering digunakan adalah sukrosa (disakarida dari glukosa dan fruktosa), yang merupakan gula utama yang ditranslokasikan dalam floem. Sukrosa digunakan dalam media pada kisaran konsentrasi 20-60 g/l. Pada kultur anggrek dan berbagai tanaman berkayu sering kali digunakan 20 g/l. Namun demikian, untuk kultur tunas berbagai tanaman biasanya digunakan 30 g/l, sedangkan untuk kultur embrio digunakan konsentrasi > 30 g/l. Jenis gula yang lain, seperti

glukosa, maltosa, rafinosa, dan gula alkohol juga dapat digunakan sebagai sumber energi.

### **Vitamin, asam amino, dan *addenda* organik kompleks.**

Vitamin adalah senyawa organik merupakan kofaktor enzim yang sebagian di antaranya esensial bagi proses metabolisme tanaman. Vitamin yang sering digunakan dalam formulasi media kultur adalah vitamin B1 (dalam bentuk tiamin-HCl; 0,1-5 mg/l), vitamin B6 (piridoksin-HCl; 0,1-1 mg/l), vitamin B3 (asam nikotinat atau niasin; 0,1-5 mg/l), vitamin B9 atau vitamin M (asam folat; 0,1-0,5 mg/l), vitamin H (biotin; 0,01-1 mg/l), vitamin B2 (riboflavin; 0,1-10 mg/l), vitamin B5 (asam pantothenat; 0,5-2,5 mg/l), vitamin C (asam askorbat; 1-100 mg/l), dan vitamin E (tokopherol, 1-50 g/l). Tiamin esensial untuk metabolisme karbohidrat dan biosintesis asam amino. Piridoksin dan berbagai vitamin lain diduga berperan baik secara langsung maupun tidak langsung sebagai koenzim dalam berbagai reaksi metabolisme. Niasin berperan dalam pembentukan koenzim yang terlibat dalam respirasi.

Beberapa jenis asam amino, seperti glisin, L-glutamin, dan asparagin terkadang juga ditambahkan ke dalam media sebagai sumber nitrogen organik. Hal ini terutama untuk induksi, pemeliharaan, dan pendewasaan embrio somatik. Formulasi MS (Murashige dan Skoog, 1962), misalnya menggunakan 2 mg/l glisin sebagai sumber asam amino. Glisin esensial untuk sintesis basa purin dan merupakan komponen esensial dari cincin porfirin pada klorofil.

Inositol (misalnya mioinositol atau mesoinositol) adalah heksitol atau gula alkohol yang sering kali digolongkan ke dalam grup vitamin B kompleks berperan dalam sintesis fosfolipida, senyawa pektin pada dinding sel, dan sintesis sistem membran

di sitoplasma. Mio-inositol banyak berpengaruh positif pada kultur tanaman monokotil, dikotil, dan gymnospermae; sering ditambahkan ke media kultur pada kisaran 50-200 mg/l.

*Addenda* organik kompleks adalah sekelompok bahan organik (misalnya air kelapa muda, ekstrak ragi, ekstrak malt, jus jeruk, jus wortel, jus kecambah, jus nanas, jus wortel, bubur pisang, dan sebagainya) yang sering digunakan sebagai suplemen pada media kultur jaringan tanaman. Pada banyak penelitian, penambahan bahan *addenda* organik terbukti berpengaruh positif terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur. Di samping itu, beberapa protein hidrolisat (seperti casein hidrolisat) dan hasil penguraian enzimatik protein hewani, seperti pepton dan tripton (campuran dari 18-20 asam amino dan amonium), dapat digunakan sebagai suplemen sumber N organik karena terbukti dapat merangsang pertumbuhan tanaman yang dikulturkan.

**Arang aktif.** Arang aktif adalah suatu bentuk khusus karbon yang tersusun dari butiran kristal mikro sangat kecil, porus, tidak berasa, dan mempunyai jaringan pori-pori sangat kecil sekaligus banyak. Oleh sebab itu, mempunyai kapasitas penyerapan yang amat tinggi terhadap koloid padatan, gas, dan bahkan bau. Arang aktif (merupakan *non-selective absorbent*) sering ditambahkan ke dalam media kultur jaringan tanaman dengan tujuan memberikan lingkungan gelap pada media kultur, mengadsorpsi atau menyerap senyawa-senyawa penghambat pertumbuhan, menyerap zat pengatur tumbuh pada kultur tanaman *in vitro*, melepaskan senyawa-senyawa yang merangsang morfogenesis, dan mengatur pH media menjadi optimum untuk morfogenesis (Pan & van Staden, 1998; Thomas, 2008).

**Zat Pengatur Tumbuh (ZPT).** Zat pengatur tumbuh adalah senyawa organik bukan hara yang dalam konsentrasi rendah dapat memengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. ZPT yang disintesis oleh tanaman disebut fitohormon atau hormon tanaman. Keberadaan ZPT dalam media kultur sangat penting karena peranannya dalam mendorong atau menghambat pertumbuhan dan menentukan arah perkembangan eksplan maupun bahan tanaman yang dikulturkan. Lima kelompok ZPT klasik yang dikenal memengaruhi fisiologi tanaman adalah auksin, giberelin, sitokinin, asam absisat, dan etilen. Namun demikian, yang paling sering digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah auksin dan sitokinin.

Sitokinin adalah ZPT yang pada level sel tanaman merupakan perangsang sitokinesis atau pembelahan sel, merangsang pembentukan klorofil, dan menghambat senesens. Sementara itu, pada level organ berfungsi untuk merangsang pembentukan tunas, menghambat pembentukan akar, dan meningkatkan aktivitas *sink*. Berdasarkan struktur kimianya, ada dua jenis sitokinin, yaitu sitokinin derivat adenin (*adenine-type cytokinins*) dan sitokinin derivat fenil-urea (*phenyl-urea type cytokinins*). Contoh sitokinin derivat adenin adalah benziladenin (BA) atau benzilaminopurin (BAP), kinetin, 2iP, zeatin, dan zeatin ribosida. Sementara itu, contoh sitokinin derivat fenil-urea adalah thidiazuron (TDZ) dan CPPU. Sitokinin umumnya ditambahkan ke dalam media kultur, baik secara sendiri maupun dikombinasikan dengan auksin untuk merangsang pembentukan tunas aksilar, tunas adventif, kalus, atau embrio somatik. Auksin yang sering digunakan adalah *indoleacetic acid* (IAA), *indolebutyric acid* (IBA), *naphthaleneacetic acid* (NAA), *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), dan *picloram*. IAA, NAA, atau IBA ditambahkan ke dalam media dalam konsentrasi

rendah dikombinasikan dengan sitokinin. Sitokinin maupun auksin yang ditambahkan ke media adalah pada kisaran 0,01-10 mg/l, tergantung pada tujuan pengulturan, spesies tanaman, dan jenis ZPT. Namun demikian, jika ZPT diberikan bersamaan dengan pemberian arang aktif, misalnya untuk menginduksi kalus pada eksplan daun kelapa sawit, konsentrasi auksin yang digunakan bisa mencapai 100 mg/l (Yusnita & Hapsoro, 2011).

### Formulasi Media Dasar untuk Kultur *In Vitro* Tanaman

Beragam formulasi media dasar yang digunakan sekarang ini, terlepas dari kesamaan komponen penyusunnya, mengandung garam-garam mineral, vitamin, dan bahan organik dengan konsentrasi berbeda-beda. Pertumbuhan maupun perkembangan eksplan dan bahan tanaman yang dikulturkan *in vitro* sedikit banyak dipengaruhi oleh formulasi media dasar yang digunakan. Media dasar tertentu dilaporkan lebih sesuai untuk jenis-jenis tanaman tertentu. Sebagai contoh, Vacin dan Went (1949) dan Knudson C. adalah media dasar yang ditujukan untuk pengulturan anggrek, Euwens (1979) lebih sesuai untuk kultur *in vitro* kelapa, *Woody Plant Medium* (WPM, Lloyd, & McCown, 1981) ditujukan untuk kultur *in vitro* tanaman berkayu, dan sebagainya. Pada Tabel 9.1 disajikan formulasi garam mineral, vitamin, dan bahan organik MS (Murashige & Skoog, 1962). Resep media MS ini sejak dipublikasi hingga kini telah terbukti cocok digunakan secara luas untuk pengulturan berbagai tanaman. Dalam formulasi MS tersebut terdapat sumber hara mineral makro, hara mineral mikro, sumber energi (umumnya sukrosa), beberapa jenis vitamin, dan bahan organik lain (seperti asam amino glisin atau gula alkohol mioinositol).

**Tabel 9.1** Formulasi garam mineral, vitamin, dan bahan organik MS (Murashige & Skoog, 1962)

Rumus Kimia	Nama Bahan Kimia	Konsentrasi (mg/l)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Amonium nitrat	1650
$\text{KNO}_3$	Kalium nitrat	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnesium sulfat heptahidrat	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Potassium dihidrogen orthophosphate	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Calcium chloride tetra hidrat	440
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Asam borat	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Manganese sulfat mono hidrat	16,9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Zink sulfat hepta hidrat	8,6
KI	Kalium iodida	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Disodium molibdat dihidrat	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cuprisulfat pentahidrat	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Cobalt chloride monohidrat	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Ferrosulfat	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Disodium EDTA	37,3
$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$	Tiamin-HCl (Vitamin B1)	0,1
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	Asam Nikotinat (niacin)	0,5
$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$	Piridoksin-HCl (Vitamin B6)	0,5
$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	Glisin	2,0
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Mioinositol	100
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Sukrosa (gula pasir)	30.000

### Cara Membuat Media Kultur Jaringan

Guna membuat satu liter media MS diperlukan akuades untuk melarutkan semua bahan kimia yang terdapat dalam resep tersebut. Kemudian, masing-masing pada konsentrasi tertentu, sedemikian rupa sehingga volume akhir dari larutan media adalah 1 liter. Perlu dicatat bahwa resep formulasi MS di atas adalah media dasar. Jadi, belum ditambah dengan zat pengatur tumbuh guna mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan kultur untuk beregenerasi dengan pola regenerasi tertentu.

Berikutnya, untuk membuat media penginduksi tunas *in vitro*, media dasar MS tersebut perlu ditambah dengan ZPT sitokinin, misalnya ditambah dengan 2-5 mg/l BA. Apabila yang diperlukan adalah media penginduksi akar maka media dasar MS perlu ditambah dengan auksin, misalnya 1 mg/l IBA atau 0,5 mg/l NAA. Setelah semua komponen media terlarut secara homogen, larutan media diatur pH-nya menggunakan pH-meter menjadi 5,7-5,8. Apabila larutan media semula bereaksi asam maka sedikit demi sedikit larutan media ditetesi dengan KOH atau NaOH hingga pH larutan menjadi 5,8. Apabila larutan media semula bereaksi basa maka sedikit demi sedikit larutan media ditetesi dengan HCl hingga pH larutan menjadi 5,8.

Setelah pH larutan media diatur menjadi 5,8 maka langkah selanjutnya dari pembuatan media adalah memberi pematat media. Pematat media yang sering digunakan adalah bubuk agar-agar, selain itu bisa juga digunakan *gelrite* atau *phytagar*. Bubuk agar umumnya digunakan pada konsentrasi 7-8 g/l, sedangkan *gelrite* atau *phytagar* pada konsentrasi 2,5-3,5 g/l. Guna melarutkan bubuk agar dalam larutan media, bubuk agar ditambahkan ke larutan media yang dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk supaya semua bubuk agar atau *gelrite*

larut. Setelah larutan media dan agar-agar mendidih, larutan media yang sudah mengandung agar-agar itu selagi masih panas harus dituangkan sejumlah volume tertentu ke botol-botol kultur yang sebelumnya sudah dicuci bersih. Apabila botol kultur sudah berisi larutan media+agar-agar, botol ditutup dengan plastik transparan atau tutup botol plastiknya. Berikutnya, disterilkan dengan autoklaf kurang lebih selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 kg/cm<sup>2</sup>. Media yang sudah disterilisasi diangkat dan diletakkan di rak-rak penyimpanan media untuk dibiarkan beberapa hari hingga dua minggu guna mengecek apakah media tetap steril. Media yang steril (tidak terkontaminasi mikroorganisme) selanjutnya dapat digunakan untuk penanaman eksplan maupun subkultur.

### Perlunya Membuat Larutan Baku (Larutan Stok)

Media tumbuh untuk teknik kultur *in vitro* sebagaimana pada contoh di atas terdiri dari beberapa komponen, yaitu hara-hara makro, hara-hara mikro, bahan-bahan organik (meliputi vitamin, asam amino, serta heksitol), sumber energi (berupa gula), dan sering kali Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Formulasi media yang sering digunakan untuk pembiakan tanaman *in vitro* di antaranya adalah MS (Murashige dan Skoog, 1962), WPM (*Woody Plant Medium*-Lloyd & McCown, 1981), LS (Linsmaier dan Skoog, 1965), dan sebagainya.

Oleh karena komponen media terdiri dari banyak senyawa anorganik maupun organik serta dalam jumlah beragam maka apabila ditimbang satu per satu sering kali menjadi tidak efisien dan tidak praktis. Bahkan untuk beberapa senyawa seperti vitamin dan beberapa unsur mikro tidak mungkin dilakukan penimbangannya satu per satu karena terlalu kecilnya

konsentrasi. Oleh karena itu, pembuatan larutan baku (*stock solution*) untuk beberapa komponen media merupakan suatu keharusan. Sementara itu, untuk beberapa komponen yang lain dapat mempermudah pekerjaan pembuatan media.

Larutan stok atau larutan baku dibuat beberapa kali lebih pekat (misalnya 10x, 20x, 50x, 100x, atau 1000x) daripada konsentrasinya dalam suatu formulasi media, artinya sesuai dengan kebutuhan. Beberapa zat kimia dapat dijadikan satu untuk tujuan kepraktisan asalkan tidak terjadi endapan. Misalnya, larutan stok makro MS yang berisi amonium nitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), kalium nitrat ( $\text{KNO}_3$ ), kalium dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), dan magnesium sulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Seluruhnya dibuat 10x atau 20x lebih pekat daripada yang terdapat pada formulasi MS sehingga dalam penggunaannya nanti dibutuhkan 100 ml (jika larutan stoknya 10x lebih pekat) atau 50 ml (jika larutan stoknya 20x lebih pekat) per liter media. Pada komponen vitamin dan hara mikro larutan stok sering kali dibuat sangat pekat, misalnya 100, 500, atau 1000x lebih pekat dari yang terdapat dalam media MS. Dengan demikian, dalam penggunaannya untuk membuat media diperlukan 10 ml (untuk stok 100x), 2 ml (untuk stok 500x), atau 1 ml (untuk stok 1000x) per liter media yang dibuat. Hal ini terutama supaya penimbangan zat tersebut dapat dengan mudah dilakukan, artinya tidak terlalu sedikit sebagaimana yang terdapat pada formulasi mediana.

### Pembuatan Larutan Stok Hara Makro Murashige dan Skoog (1962) dengan Konsentrasi 10x Formulasi MS

Guna membuat 1 liter larutan stok makro yang berisi  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  pada konsentrasi 10x yang terdapat di media MS, prosedurnya adalah sebagai berikut:

1. Timbang  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sebanyak yang dibutuhkan untuk membuat 1 liter larutan stok 10x MS, sebagaimana pada Tabel 9.2.
2. Siapkan gelas piala yang sudah diisi dengan akuades sekitar 500 ml.
3. Siapkan labu ukur atau gelas ukur berkapasitas 1000 ml.
4. Masukkan dan larutkan satu demi satu komponen hara makro yang sudah ditimbang, misalnya masukkan  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ke dalam gelas piala berisi akuades. Kemudian, aduk hingga homogen, dilanjutkan dengan pelarutan bahan kimia yang lain satu demi satu sampai keempat komponen sumber hara makro di atas terlarutkan.
5. Masukkan larutan stok ke dalam labu ukur lalu tambahkan akuades hingga volume akhir 1000 ml.
6. Tutup labu ukur, lalu kocoklah larutan tersebut dengan membolak-balikkan labu ukur hingga larutan homogen. Apabila yang anda gunakan untuk menera hingga 1000 ml adalah gelas ukur, tuangkan kembali larutan yang sudah ditera ke dalam gelas piala lalu aduk hingga homogen.
7. Simpan larutan dalam botol sekaligus beri label (nama stok (hara makro 10x MS), tanggal pembuatan, volume stok yang diperlukan untuk membuat 1 liter media, dan nama yang membuat larutan).

**Tabel 9.2** Komponen hara makro sekaligus konsentrasinya pada formulasi MS dan pada larutan stok 10x MS

No.	Komponen Media	Konsentrasi di Media MS (mg/l)	Konsentrasi Larutan Stok (mg/l) 10x MS
1.	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 650	16 500
2.	$\text{KNO}_3$	1 900	19 000
3.	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	1700
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3700

### Pembuatan Larutan Stok $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100x Formulasi MS

Konsentrasi  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  yang terdapat dalam formulasi media MS adalah 440 mg/l. Oleh karena itu, untuk membuat 1 liter larutan stok yang kepekatannya 100 kali diperlukan  $100 \times 440 \text{ mg} = 44000 \text{ mg} = 44 \text{ g}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Apabila larutan stok yang dibuat adalah 500 ml maka kebutuhan  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  adalah 22 g. Berapa banyak larutan stok yang akan dibuat tergantung dari kebutuhan laboratorium, misalnya bisa 500 ml, 1 liter, 10 liter, atau 100 liter. Prosedur membuat 1 liter larutan stok  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  100x MS adalah sebagai berikut:

1. Timbang  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 44 g.
2. Siapkan gelas piala yang sudah diisi dengan akuades sekitar 600 ml.
3. Siapkan labu ukur atau gelas ukur berkapasitas 1000 ml.
4. Masukkan  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  yang sudah ditimbang (44 g) ke dalam gelas piala berisi akuades dan aduk hingga homogen.
5. Masukkan larutan stok ke dalam labu ukur 1000 ml lalu tambahkan akuades hingga volume akhir 1000 ml.
6. Kocok atau aduk larutan hingga homogen.
7. Simpan larutan dalam botol sekaligus beri label (nama stok ( $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  100x MS), tanggal pembuatan, volume stok yang diperlukan untuk membuat 1 liter media (10 ml), dan nama yang membuat larutan).

### Pembuatan 1000 Mililiter Larutan Stok Hara Mikro 1000x MS

Dalam formulasi MS terdapat delapan senyawa yang mengandung hara mikro ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KI,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan satu

zat pengkelat ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ). Larutan baku Fe dan pengkelatnya umumnya dibuat terpisah dari unsur hara mikro lainnya untuk menghindari pengendapan. Dilihat dari konsentrasi dalam media,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  berada dalam kisaran 6,2-16,9 mg/l. Sementara itu, KI,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dalam kisaran konsentrasi jauh lebih kecil, yaitu 0,025-0,25 mg/l. Ketujuh senyawa sumber hara mikro ini dapat dibuat dalam satu larutan stok atau dibagi dua, yaitu mikro A berisi  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan mikro B berisi KI,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Kemudian, mana yang dipilih tidak menjadi masalah asalkan tidak terjadi pengendapan dalam pembuatannya. Dalam contoh berikut (Tabel 9.3) disajikan daftar sekaligus konsentrasi senyawa-senyawa kimia mengandung hara mikro yang diperlukan untuk membuat media MS dan diikuti dengan prosedur pembuatan larutan stok hara mikro, di mana ketujuh komponennya dijadikan satu. Perlu diingat, senyawa  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  yang juga termasuk dalam hara mineral mikro tidak disatukan pembuatannya dengan hara mikro lainnya karena untuk menghindari pengendapan.

Prosedur:

1. Timbang masing-masing bahan kimia:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KI,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  sebanyak yang dibutuhkan untuk membuat 1 liter larutan stok 1000x MS (Tabel 9.3). Siapkan gelas piala yang sudah diisi dengan akuades sekitar 600 ml.
2. Siapkan labu ukur atau gelas ukur berkapasitas 1000 ml.
3. Masukkan dan larutkan satu demi satu komponen hara mikro yang sudah ditimbang, misalnya masukkan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ke dalam gelas piala berisi akuades lalu aduk hingga homogen. Berikutnya, dilanjutkan dengan pelarutan bahan kimia yang

lain ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) satu demi satu sampai ketujuh komponen sumber hara mikro di atas terlarutkan.

4. Masukkan larutan stok ke dalam labu ukur 1000 ml lalu tambahkan akuades hingga volume akhir 1000 ml.
5. Tutup labu ukur, bolak-balikkan labu ukur atau tuangkan larutan stok yang sudah ditera ke dalam gelas piala 1 liter. Aduk hingga larutan homogen.
6. Simpan larutan dalam botol Scott dan beri label (nama stok (stok hara mikro 1000x MS), tanggal pembuatan, volume stok yang diperlukan untuk membuat 1 liter media (1 ml), dan nama yang membuat larutan).

**Tabel 9.3** Komponen hara mikro MS, konsentrasinya dalam media dasar, dan dalam larutan stok 1000x MS

No.	Komponen Media (mg/l)	Konsentrasi di Media MS (mg/l)	Konsentrasi dalam Larutan Stok 1000x MS (mg/l)
1.	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	6 200
2.	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9	16 900
3.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8 600
4.	$\text{KI}$	0,83	830
5.	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	250
6.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	25
7.	$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025	25

### Pembuatan 1 Liter Stok Sumber Besi ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) pada Konsentrasi 100x Formulasi MS

Guna membuat larutan stok Fe, prosedurnya adalah sebagai berikut:

1. Timbang  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  sebanyak yang dibutuhkan untuk membuat 1 liter/1000 ml larutan stok Fe 100x MS sebagaimana pada Tabel 9.4.
2. Siapkan dua gelas piala berkapasitas 1000 ml yang masing-masing sudah diisi dengan akuades sekitar 400 ml dan siapkan labu ukur atau gelas ukur berkapasitas 1000 ml.
3. Masukkan sekaligus larutan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ke dalam gelas piala yang berbeda, aduk hingga homogen.
4. Tuangkan larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  sedikit demi sedikit ke dalam larutan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sambil diaduk.
5. Masukkan larutan stok ke dalam labu ukur. Tambahkan akuades hingga volume akhir 1000 ml. Larutan stok Fe yang homogen adalah berwarna kuning muda dan bening tanpa endapan.
6. Tutup labu ukur lalu kocoklah larutan tersebut dengan membolak-balikkan labu ukur hingga larutan homogen. Apabila yang Anda gunakan untuk menara hingga 1000 ml adalah gelas ukur, tuangkan larutan ke dalam gelas piala. Aduk hingga homogen.
7. Simpan larutan stok Fe di botol berwarna kuning gelap atau labu Erlenmeyer yang dibungkus alfoil agar tidak mudah teroksidasi. Beri label tanggal, nama stok Fe, 100x MS, penggunaan untuk 1 liter media (10 ml), dan nama yang membuat.

**Tabel 9.4** Komponen sumber besi, konsentrasinya yang terdapat di media MS, dan dalam larutan stok 100x MS

No.	Komponen Media MS	Konsentrasi dalam Media (mg/l)	Konsentrasi dalam Larutan Stok 100x MS (mg/l)
1.	Fe SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	2780
2.	Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	3730

### Pembuatan 1 Liter atau 1000 Mililiter Stok Vitamin (Tiamin-HCl, Asam Nikotinat, Piridoksin-HCl, dan Glisin) 100x MS

Prosedur pembuatan larutan stok vitamin 100x MS adalah sebagai berikut:

1. Timbang tiamin-HCl, asam nikotinat, piridoksin-HCl, dan glisin sebanyak yang dibutuhkan untuk membuat 1000 ml larutan stok vitamin 100x MS (Tabel 9.5).
2. Siapkan gelas piala 1000 ml yang sudah diisi dengan akuades sekitar 600 ml.
3. Siapkan labu ukur atau gelas ukur berkapasitas 1000 ml.
4. Masukkan dan larutkan satu demi satu vitamin yang sudah ditimbang, misalnya masukkan tiamin-HCl ke dalam gelas piala berisi akuades lalu aduk hingga homogen. Lanjutkan dengan pelarutan zat-zat lainnya (asam nikotinat, piridoksin, dan asam amino glisin) satu demi satu sampai keempat vitamin di atas terlarutkan.
5. Masukkan larutan stok ke dalam labu ukur lalu tambahkan akuades hingga volume akhir 1000 ml.
6. Tutup labu ukur, lalu kocoklah larutan tersebut dengan membolak-balikkan labu ukur hingga larutan homogen. Apabila yang Anda gunakan untuk menara hingga 1000 ml

adalah gelas ukur, tuangkan larutan ke dalam gelas piala lalu aduk hingga homogen.

7. Simpan larutan dalam botol Scott atau labu erlenmeyer, beri label (nama stok (vitamin 100x MS), tanggal pembuatan, volume stok yang diperlukan untuk membuat 1 liter media, dan nama yang membuat larutan).

**Tabel 9.5** Komponen vitamin sekaligus asam amino, konsentrasinya dalam media MS, dan larutan stok 100x MS

No.	Komponen Media	Konsentrasi di dalam Media MS (mg/l)	Konsentrasi dalam Larutan Stok 100x MS (mg/l)
1.	Tiamin-HCl	0,1	10
2.	Asam nikotinat	0,5	50
3.	Piridoksin-HCl	0,5	50
4.	Glisin	2,0	200

### Pembuatan 1 Liter Larutan Stok Mioinositol 10x MS

Konsentrasi mioinositol yang terdapat dalam formulasi media MS adalah 100 mg/l. Oleh karena itu, untuk membuat 1 liter larutan stok yang kepekatannya 10 kali diperlukan 10 x 100 mg = 1000 mg atau 1 g mioinositol.

Prosedur:

1. Timbang mioinositol sebanyak 1 gram.
2. Siapkan gelas piala (1000 ml) yang sudah diisi dengan akuades sekitar 500 ml.
3. Siapkan labu ukur atau gelas ukur berkapasitas 1000 ml.
4. Masukkan mioinositol yang sudah ditimbang ke dalam gelas piala berisi akuades dan aduk hingga homogen.
5. Masukkan larutan stok ke dalam labu ukur 1000 ml, lalu tambahkan akuades hingga volume akhir 1000 ml.

6. Kocok atau aduk larutan hingga homogen.
7. Simpan larutan dalam botol Scott sekaligus beri label (nama stok (mioinositol 10x MS), tanggal pembuatan, volume stok yang diperlukan untuk membuat 1 liter media, dan nama yang membuat larutan).

### Pembuatan Larutan Stok ZPT

Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke media kultur umumnya pada konsentrasi rendah, yaitu pada kisaran 1- 40  $\mu\text{M}$  atau 0,1-10 mg/l. Larutan stok ZPT dapat dibuat pada konsentrasi milimolar (mM) maupun mg/l tergantung pada kebutuhan. Sebagai contoh, jika konsentrasi benziladenin (BA) yang digunakan untuk perbanyak tunas adalah pada kisaran 2-5 mg/l, larutan stok BA dapat dibuat pada konsentrasi 100 hingga 200 mg/l. Apabila penggunaannya pada konsentrasi 5-10  $\mu\text{M}$  maka larutan stok dapat dibuat pada konsentrasi 1 mM (atau 1000  $\mu\text{M}$ ). Demikian juga halnya dengan larutan stok IAA, NAA, atau IBA.

Berikutnya, yang perlu mendapat perhatian adalah bahwa kebanyakan ZPT pada umumnya tidak larut dalam air. Sitokinin (BA; kinetin; zeatin; dan 2,i-P) bereaksi basa sehingga untuk melarutkannya diperlukan asam, misalnya HCl 1N. Sementara itu, auksin (IAA; NAA; IBA; 2,4-D; dan picloram) bereaksi asam sehingga untuk melarutkannya diperlukan basa, misalnya NaOH 1N. Guna membuat 1 liter larutan BA pada konsentrasi 100 mg/l, mula-mula timbanglah 100 mg BA. Tempatkan BA di salah satu sisi gelas piala lalu tetesi bubuk BA dengan  $\pm 2$  ml HCl 1N dan aduk sedemikian rupa sehingga semua bubuk BA terbasahi dengan HCl. Setelah itu, tambahkan akuades sambil diaduk (dengan *magnetic stirer*) sampai homogen dan tera hingga volume akhir 1 liter dengan labu ukur.

Guna membuat 1 liter larutan IBA pada konsentrasi 100 mg/l, mula-mula timbanglah 100 mg IBA. Tempatkan IBA di salah satu sisi gelas piala lalu tetesi bubuk IBA dengan  $\pm 2$  ml NaOH 1N dan aduk sedemikian rupa sehingga semua bubuk IBA terbasahi dengan NaOH. Setelah itu, tambahkan akuades sambil diaduk (dengan *magnetic stirer*) sampai homogen dan tera hingga volume akhir 1 liter dengan labu ukur.

Pada prinsipnya, penambahan HCl 1N atau NaOH 1 N hanya dimaksudkan untuk melarutkan ZPT. Oleh karena itu, konsentrasi akhir dari asam atau basa tersebut tidak boleh melebihi konsentrasi ZPT supaya tidak menyebabkan pengaruh negatif pada tanaman yang dikulturkan. Sebagai patokan, penggunaan HCl 1N atau NaOH 1N untuk melarutkan ZPT maksimum adalah sebanyak 0,3 ml untuk 10 mg ZPT. Jadi, jika yang dilarutkan adalah 200 mg kinetin maka kebutuhan HCl maksimum sebanyak 6 ml. Artinya, akan lebih baik jika digunakan 3-4 ml HCl 1N karena larutan kinetin sudah homogen.

### Peracikan Media Kultur Jaringan dari Berbagai Larutan Stok

Setelah semua larutan stok dibuat dengan konsentrasi tertentu (misalnya 10x, 100x, atau 1000x dari yang terdapat dalam formulasi MS) maka langkah selanjutnya adalah pembuatan media dari semua larutan stok ditambah dengan komponen lain yang tidak terdapat dalam larutan stok, misalnya sukrosa, arang aktif, air kelapa, dan sebagainya. Misalkan akan dibuat media MS dengan penambahan 5 mg/l BA dan 0,1 mg/l IAA.

Prosedur:

1. Siapkan wadah, alat pengukur, akuades, dan semua bahan kimia yang diperlukan.
2. Buat semua larutan stok yang diperlukan. Perhatikan berapa kali lebih pekat dari yang seharusnya ada di formulasi media.
3. Hitung masing-masing kebutuhan larutan stok jika ingin membuat sejumlah media.
4. Timbang agar-agar, gula, atau arang aktif jika diperlukan.
5. Tuliskan di buku log (catatan) pembuatan media langkah-langkah yang harus dilakukan secara berurutan, misalnya sebagaimana pada borang (Tabel 9.6).
6. Ambil masing-masing larutan stok sesuai dengan kebutuhan. Masukkan satu demi satu ke dalam gelas piala yang sebelumnya diberi akuades seperlunya. Berikan tanda (√) jika komponen media tertentu sudah dimasukkan ke dalam gelas piala.
7. Masukkan gula dan tambahkan akuades hingga larutan mencapai volume akhir 1 liter. Aduk (dengan *magnetic stirrer*) hingga larutan homogen.
8. Atur pH larutan media menjadi 5.8 menggunakan pH meter dan KOH atau HCl.
9. Tambahkan bubuk agar ke dalam larutan sambil dimasak hingga mendidih untuk melarutkannya.
10. Masukkan media ke dalam botol-botol kultur lalu tutup botol dengan penutup plastik.
11. Sterilkan media menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,1-1,5 kg/cm<sup>2</sup>.

**Tabel 9.6** Kebutuhan larutan stok dan komponen lain untuk membuat 1 liter media MS

No.	Larutan Stok dan Komponen Lain	Kebutuhan untuk Membuat 1 liter Media MS	
1.	Makro (10x)	100 ml	√
2.	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (100 x)	10 ml	√
3.	Mikro (1000 x)	1 ml	√
4.	FeSO <sub>4</sub> (100 x)	10 ml	√
5.	Vitamin (100 x)	10 ml	√
6.	Mioinositol (10 x)	100 ml	√
7.	Sukrosa (ditimbang)	30 gram	√
8.	ZPT : BA	Sesuai kebutuhan	√
9.	Air kelapa ( <i>optional</i> )	100-150 ml	√
10.	pH	5,8	√
11.	Agar-agar	7-8 gram	√
12.	Arang aktif ( <i>optional</i> )	2-3 gram	√



## Bab 10

### *Organogenesis pada Kultur In Vitro Tanaman*



Salah satu fenomena seluler pada tanaman yang menjelaskan rahasia totipotensi sel adalah organogenesis. Organogenesis pada tanaman *in vitro* adalah proses pembentukan organ tanaman *de novo* (baru) dari jaringan eksplan yang dikulturkan *in vitro*, di mana sebelumnya tidak bermeristem (Schwarz and Beaty, 2000). Organ tanaman yang terbentuk dapat berupa tunas, akar, atau bunga. Contoh organogenesis adalah pembentukan tunas adventif *in vitro* dari eksplan yang tidak bermata tunas, misalnya dari potongan daun, potongan akar, atau potongan batang antarbuku (*internodes*). Pembentukan akar adventif dari sel-sel setek batang suatu tanaman juga merupakan fenomena organogenesis. Dalam hal ini, organ baru yang dibentuk oleh sel-sel batang adalah akar. Istilah lain untuk pembentukan tunas adventif *de novo* dari eksplan yang sebelumnya tidak bermeristem adalah *caulogenesis*, sedangkan untuk pembentukan akar adventif adalah *rhizogenesis*.

Sejak ide pertama pengulturan jaringan tanaman oleh Gotlieb Haberland pada awal abad ke-20 hingga penemuan auksin (1930-an) dan penemuan sitokinin (1950-an), organogenesis *in vitro* dari eksplan berbagai tanaman sudah berhasil didemonstrasikan. Contohnya adalah pembentukan organ vegetatif (seperti tunas dan akar) serta pembentukan organ generatif (seperti bunga dan buah).

Proses organogenesis merupakan fenomena penting dari perbanyakan aseksual tanaman, terutama yang berasal dari jaringan somatik nonmeristematik. Misalnya pembentukan akar adventif (pada setek daun atau setek batang berbagai tanaman), pembentukan akar adventif pada setek mikro (tunas-tunas yang diperbanyak *in vitro*), dan pembentukan tunas adventif (dari eksplan potongan daun, hipokotil, atau ujung akar). Dalam tulisan ini akan dibahas organogenesis pada eksplan yang dikulturkan *in vitro*, baik terjadi secara langsung dari permukaan eksplan maupun secara tidak langsung, yakni didahului dengan pembentukan kalus.

### Organogenesis sebagai Proses Perkembangan Tanaman

Jaringan tanaman yang dikulturkan *in vitro* dapat membentuk berbagai macam primordia, di mana dalam proses perkembangannya akan berujung pada proses diferensiasi menuju pembentukan tunas, akar, bunga, atau embrio. Apabila struktur yang terbentuk adalah embrio maka prosesnya disebut embriogenesis. Apabila struktur yang terbentuk adalah organ maka prosesnya disebut organogenesis. Oleh karena embrio terbentuk dari jaringan tanaman yang tersusun atas sel-sel somatik maka proses tersebut disebut embriogenesis somatik atau embriogenesis nonzigotik. Proses embriogenesis nonzigotik akan dibahas pada bab tersendiri dalam buku ini.

Sebagaimana dijelaskan pada bab terdahulu, pertumbuhan tanaman adalah peningkatan ukuran yang tidak dapat balik atau permanen. Sementara itu, perkembangan tanaman didefinisikan sebagai perubahan progresif sekaligus bertahap pada pertumbuhan dan penampilan tanaman, baik secara kuantitatif maupun kualitatif yang mengarah pada perubahan

zigot menjadi tanaman dewasa reproduktif. Morfogenesis termasuk organogenesis merupakan proses perkembangan tanaman (*developmental process*), yaitu terbentuknya suatu struktur organ baru (*de novo*). Misalnya saja primordia tunas atau akar dari eksplan yang sebelumnya tidak mempunyai struktur tersebut. Primordia yang terbentuk *de novo* bermula dari proses dediferensiasi, sel di mana diikuti oleh serangkaian proses, yaitu induksi dan diferensiasi di mana berujung pada terbentuknya primordia organ.

### Dediferensiasi, Kompetensi, Induksi, Determinasi, dan Diferensiasi

Sebelum mengalami organogenesis, sel-sel pada eksplan yang kondisinya sangat terdiferensiasi (*highly differentiated*) harus dapat mempersepsi atau merespons sinyal seluler dari lingkungan di sekitarnya. Pada saat sepotong jaringan tanaman atau eksplan dikulturkan di media buatan dengan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) tertentu, sel atau sekumpulan sel tertentu pada eksplan akan mengalami prainduksi berupa proses dediferensiasi. Dediferensiasi merupakan proses kembalinya sel-sel yang sudah terdiferensiasi menjadi tidak terdiferensiasi. Melalui stimulus ZPT tertentu yang terdapat di media kultur maka sel-sel pada eksplan yang tadinya sangat terdiferensiasi akan mengalami dediferensiasi, yaitu terangsang untuk membelah diri dengan cepat membentuk sel-sel kalus. Selain itu, bisa juga proses dediferensiasi tersebut tidak melalui pembentukan kalus. Kalus adalah massa sel *parenchyma* tanaman yang tidak terorganisasi dan merupakan titik awal untuk organogenesis. Pada tanaman utuh, sel-sel kalus umumnya terbentuk setelah pelukaan jaringan tanaman.

Sel-sel pada eksplan yang sudah mengalami dediferensiasi secara morfologi bersifat plastis atau fleksibel. Pada *stadia* ini, sel-sel eksplan dikatakan bersifat kompeten. Sel-sel eksplan dikatakan mencapai *stadia* kompetensi jika mempunyai kemampuan untuk merespons sinyal atau stimulus. Stimulus dapat berupa media tertentu, ZPT tertentu, kondisi pencahayaan tertentu, dan sebagainya. Proses pencapaian status kompeten sel-sel eksplan tidak selalu melalui satu tahapan pemaparan pada media dengan ZPT tertentu, namun bisa melalui dua tahapan. Sebagai contoh, ketika potongan daun *Sansevieria trifasciata* dikulturkan di media dengan penambahan ZPT penginduksi tunas berupa benziladenin (BA) maka eksplan tidak menunjukkan respons morfogenesis, yaitu tidak menunjukkan respons pembentukan tunas. Namun demikian, eksplan tersebut dikulturkan di media dengan penambahan 0,25 mg/l 2,4-D selama satu minggu, lalu dipindahkan ke media tanpa ZPT satu minggu. Kemudian, dilanjutkan dengan pemindahan ke media penginduksi tunas yang mengandung BA maka tunas dalam jumlah banyak terbentuk (Yusnita *et al.*, 2013). Dalam hal *stadia* kompetensi eksplan, eksplan dapat merespons sitokinin di media induksi tunas dengan memerlukan prakondisi (prainduksi) di media yang mengandung auksin selama satu minggu sekaligus diikuti pemindahan eksplan ke media tanpa ZPT selama satu minggu.

Tahap berikutnya adalah tahap induksi, di mana sel-sel eksplan yang kompeten mempersepsi sinyal/stimulus dan mengalami determinasi, yaitu keadaan di mana sel-sel eksplan sudah ditentukan nasibnya menjadi suatu primordia. Awal dari determinasi ditandai dengan terbentuknya meristemoid, yaitu agregat sel-sel mirip sel meristem berukuran lebih kecil, isodiametrik, berdinding sel tipis, bervakuola kecil, dan

mempunyai sitoplasma sekaligus inti yang padat (Thorpe, 1982). Dalam proses perkembangannya, meristemoid bersifat plastis dan dapat terdiferensiasi menjadi berbagai macam primordia organ, seperti tunas, akar, atau bunga (Schwarz & Beaty, 2000). Dengan demikian, determinasi sel-sel meristemoid dapat diartikan bahwa sel-sel meristemoid sudah ditentukan nasibnya menjadi primordia tunas atau akar.

Melalui berbagai penelitian secara saksama, para peneliti telah menggunakan proses organogenesis *in vitro* sebagai sistem model untuk menjawab pertanyaan tentang berbagai kejadian yang menyebabkan morfogenesis ataupun pembentukan organ, misalnya akar, tunas, bunga, atau pembentukan embrio dari eksplan. Salah satu sistem model pada eksplan *Convolvulus arvensis* yang dilaporkan oleh Christianson dan Warnick (1983) dapat memilah proses organogenesis menjadi beberapa tahap berurutan, yaitu dimulai dari dediferensiasi eksplan untuk mencapai *stadia* kompetensi. Eksplan kompeten akan mengalami induksi, di mana berujung pada tercapainya determinasi, yaitu sel-sel yang terinduksi sudah ditentukan nasibnya menjadi organ. Pada saat inilah terjadi pengorganisasian sel-sel eksplan, mula-mula dari meristemoid lalu menjadi organ tunas atau akar.

Dalam organogenesis *de novo* terdapat dua pola perkembangan berbeda, yaitu organogenesis secara langsung (terbentuknya organ dari sel-sel eksplan tanpa melalui pembentukan kalus) dan organogenesis tidak langsung (terjadi melalui pembentukan kalus terlebih dahulu) (Hicks, 1994). Kalus adalah kumpulan sel tidak terorganisasi dan tidak terdiferensiasi, yang merupakan hasil dari dediferensiasi sel-sel eksplan atau merupakan respons penyembuhan luka pada jaringan tanaman. Pada eksplan dari suatu spesies yang

sama organogenesis bisa terjadi secara langsung atau tidak langsung, kemungkinan karena beberapa faktor. Umur fisiologis eksplan berpengaruh terhadap perbedaan kandungan hormon tertentu di dalamnya sehingga responsnya terhadap media kultur dengan konsentrasi ZPT tertentu bisa berbeda pula. Demikian pula, eksplan yang tingkat ketuaan fisiologisnya sama mungkin memberikan respons berbeda terhadap media dengan jenis dan konsentrasi ZPT berbeda. Walaupun secara umum, perimbangan auksin sitokinannya masih mengarah pada pembentukan tunas adventif. Sebagai contoh, eksplan potongan daun melinjo (Gambar 10.1a) dapat membentuk tunas adventif secara langsung (10.1b) atau membentuk mata tunas setelah didahului oleh terbentuknya kalus (Gambar 10.1c). Pada eksplan potongan daun *Sansevieria trifasciata* (Gambar 10.2a) organogenesis terjadi secara tidak langsung, yaitu didahului oleh pembentukan kalus (Gambar 10.2b) yang berlanjut dengan pembentukan tunas adventif (Gambar 10.2c). Pada eksplan potongan daun krisan organogenesis juga terjadi secara tidak langsung, yaitu didahului dengan pembentukan kalus (Gambar 10.3a,b) lalu terjadi pembentukan tunas adventif pada media yang mengandung sitokinin (Gambar 10.3 c,d).

Rangkaian jalur yang dilalui pada organogenesis langsung dan tidak langsung adalah sebagai berikut:

Eksplan → Meristemoid → Primordia → Organ

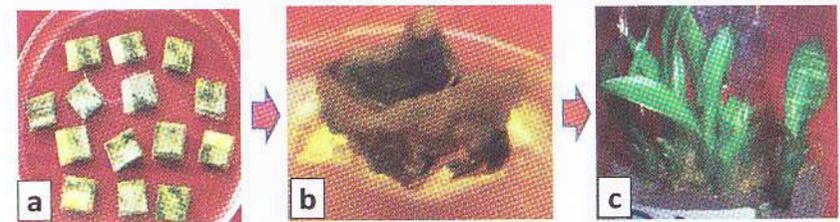
Eksplan → Kalus → Meristemoid → Primordia → Organ

Pada pola organogenesis secara langsung, sel-sel eksplan kompeten terdiferensiasi menjadi meristemoid. Artinya, kumpulan atau agregat sel mirip meristem yang selanjutnya mengikuti perkembangan membentuk primordia lalu organ (tunas atau akar), tergantung pada sinyal hormonal yang diterima

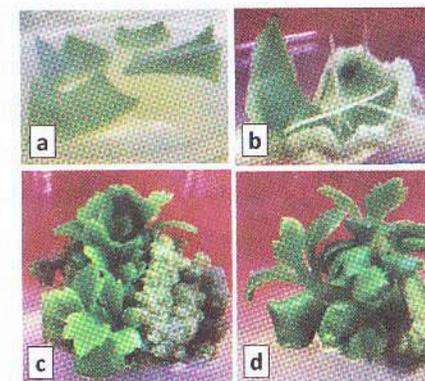
oleh eksplan. Pada pola organogenesis tidak langsung, sel-sel eksplan mengalami dediferensiasi membentuk kalus sebelum sinyal hormonal mengarahkannya membentuk meristemoid, berlanjut dengan pembentukan primordia lalu organ.



**Gambar 10.1** Contoh organogenesis langsung dan tidak langsung pada eksplan potongan daun melinjo



**Gambar 10.2** Organogenesis tidak langsung pada eksplan *Sansevieria trifasciata*



**Gambar 10.3** Organogenesis (pembentukan akar atau tunas) secara tidak langsung pada eksplan daun *Chrysanthemum morifolium* yang didahului oleh terbentuknya kalus

### Aplikasi Organogenesis dalam Bioteknologi Tanaman

Regenerasi berbagai tanaman *in vitro* melalui organogenesis yang diaplikasikan untuk berbagai tujuan telah banyak dilaporkan, di antaranya untuk :

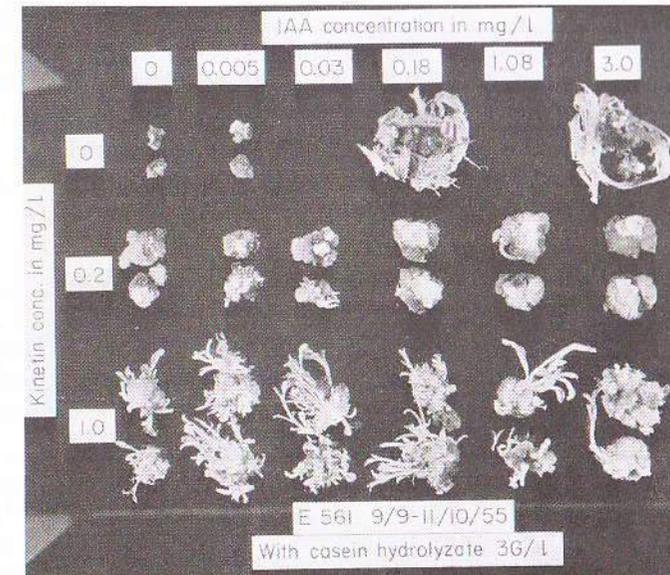
- Perbanyak klonal tanaman secara cepat.
- Induksi keragaman somaklonal.
- Mutagenesis.
- Regenerasi tanaman untuk memfasilitasi rekayasa genetika tanaman.

### Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Organogenesis

Bukti-bukti awal bahwa pembentukan tunas adventif pada jaringan eksplan *in vitro* dipengaruhi oleh konsentrasi auksin maupun sitokinin dalam media dilaporkan oleh Skoog dan Miller (1957). Menggunakan jaringan empulur batang tembakau yang dikulturkan di media dengan penambahan kinetin (sitokinin) serta IAA (auksin), Skoog dan Miller (1957) menemukan bahwa pembentukan organ tunas maupun akar pada eksplan merupakan fungsi dari nisbah sitokinin/auksin dalam media kultur. Artinya, yaitu bahwa konsentrasi sitokinin tinggi (relatif terhadap auksin) akan mengarahkan eksplan membentuk tunas, sedangkan konsentrasi auksin tinggi (relatif terhadap sitokinin) akan mendorong pembentukan akar. Sementara konsentrasi sitokinin dan auksin berimbang menyebabkan eksplan membentuk struktur tidak terorganisasi yang disebut kalus (Gambar 10.4).

Konsep klasik pengaturan organogenesis yang dipengaruhi oleh konsentrasi relatif kedua jenis zat pengatur tumbuh ini hingga kini banyak terjadi pada berbagai kultur *in vitro* tanaman.

Tabel 10.1 menunjukkan kebutuhan ZPT pada berbagai sistem kultur *in vitro* tanaman yang menghasilkan pembentukan tunas adventif, baik pada organogenesis secara langsung maupun tidak langsung.



**Gambar 10.4** Pembentukan tunas, akar, atau kalus pada eksplan empulur batang tembakau yang dipengaruhi oleh perimbangan ZPT kinetin (sitokinin) dan IAA (auksin) (Skoog & Miller, 1957)

Secara umum, pembentukan tunas adventif kultur *in vitro* tanaman-tanaman tersebut memerlukan ZPT sitokinin pada konsentrasi lebih tinggi dibandingkan dengan auksin. Sementara itu, untuk pembentukan kalus diperlukan auksin dan sitokinin pada konsentrasi berimbang ataupun auksin yang kuat, seperti 2,4-D; NAA; IBA; atau sitokinin TDZ secara sendiri/kombinasi.

**Tabel 10.1** Zat pengatur tumbuh penginduksi kalus dan tunas adventif pada kultur *in vitro* berbagai tanaman

Tanaman	Eksplan	ZPT Penginduksi Kalus	ZPT Penginduksi Tunas Adventif	Referensi
Anggur ( <i>Vitis vinifera</i> L.) cv. Canonannon & Chenin Blanc	Daun dari tunas kultur <i>in vitro</i> (di media MS +1 mg/l BA + 0,1 mg/l IBA)	MS + 0,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l NAA (cv. Chenin Blanc); 2 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA (cv. Canonannon); kondisi gelap	MS BA + 1 mg/l IBA + 1,5 mg/l TDZ (cv. Canonannon & Chenin Blanc); MS + 1,5 mg/l BA + 1 mg/l IBA (cv. Chenin Blanc)	Kumsa (2017)
Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> )	Potongan daun		MS + 2 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA	Yusnita <i>et al.</i> , (2017)
Markisa ( <i>Passiflora suberosa</i> L.)	Potongan Akar		MS + 9 µM BA	Rosa <i>et al.</i> , (2016)
Anyelir ( <i>Dianthus caryophyllus</i> L.) 'Master'	Potongan daun	MS + 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l NAA	MS + 1,5 mg/l TDZ + 0,25 mg/l kinetin + 0,25 mg/l NAA	Thakur & Kanwar (2017)
Krisan 'Escapade', 'White Albatros', 'Yellow Albatross'	Potongan daun		MS + 2 mg/l BA + 1 mg/l NAA	Hodson de Jaramillo <i>et al.</i> , (2008)
Pyrethrum [ <i>Tanacetum cinerariifolium</i> (Trevir.) Schultz-Bib]	Potongan daun		MS + 4 mg/l BA + 0.2 mg/l 2,4-D	Hedayat <i>et al.</i> , (2009)

Tanaman	Eksplan	ZPT Penginduksi Kalus	ZPT Penginduksi Tunas Adventif	Referensi
<i>Sansevieria trifasciata</i> 'Lorentii'	Potongan daun	MS + 0,25 mg/l 2,4-D	MS + 2 mg/l BA	Yusnita <i>et al.</i> , (2013)
<i>Agave tequilana</i>	Potongan longitudinal pucuk tanaman	MS + 5,2 µM NAA	10 BA + 1,1 µM 2,4-D	Valenzuela-Sanchez <i>et al.</i> , (2006)
Kurma ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv. Siwy	Potongan longitudinal pucuk meristematik (1-1.5 cm)		MS + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BA + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l 2i-P	Ali <i>et al.</i> , (2017)
Kurma ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv. Barhee	Potongan longitudinal pucuk meristematik (1-1.5 cm)		MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l NAA + 4 mg/l 2i-P	Jazinizadeh <i>et al.</i> , (2015)
Kurma ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv. Quntar	Potongan daun bagian bawah (berwarna putih)	MS + 5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BA	MS + 3 mg/l 2i-P + 1 mg/l NAA	Al-Mayahi (2015)
<i>Pinus pinaster</i>	Kotiledon (0,3 cm) dari seedling umur 4 hari ( <i>in vitro</i> )		DCR + TDZ 10 mg/l (6 hari), lalu ditransfer ke DCR0 + 3g/l arang aktif	Humanez <i>et al.</i> , (2011)

Tanaman	Eksplan	ZPT Penginduksi Kalus	ZPT Penginduksi Tunas Adventif	Referensi
African violet ( <i>Saintpaulia ionantha</i> Wendl.)	Potongan daun atau potongan petiol (tangkai daun)	MS + 0,5 mg/l TDZ	MS + 3 mg/l BA atau MS + 1 mg/l NAA + 3 mg/l BA	Sunpui & Kanchanapoom (2002)
<i>Anthurium andreanum</i> cv. Nitta	Potongan daun	MS + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BA (kondisi gelap)	MS + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BA (kondisi terang)	Saptari <i>et al.</i> , (2017)
<i>Alstroemeria ligtu</i> Hybrid	Potongan daun bagian bawah		MS + 1 mg/l BA + 0,1 mg/l IBA	Nasri <i>et al.</i> , (2013)
<i>Begonia homonyma</i>	Potongan daun	MS + 3,38 µM BA + 5 µM NAA	MS + 3,38 µM BA + 1,4 µM NAA	Kumari <i>et al.</i> , (2017)
<i>Begonia x hiemalis</i> Fotsch	Kuncup bunga muda ( <i>immature inflorescence</i> )	MS + 1 mg/l NAA	MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l NAA + 40 mg/l adenin	Awal <i>et al.</i> , (2013)

Tabel 10.2 menunjukkan bahwa pada berbagai tanaman pembentukan akar tunas mikro umumnya terstimulasi oleh keberadaan auksin. Auksin yang sering digunakan untuk merangsang pembentukan akar adalah *indolebutyric acid* (IBA) dan *naphthaleneacetic acid* (NAA).

Pengakaran tunas atau planlet hasil kultur jaringan dapat dilakukan secara *ex vitro* ataupun *in vitro*. Pengakaran tunas mikro atau planlet secara *ex vitro* umumnya memerlukan konsentrasi auksin yang lebih tinggi karena pemaparan pada auksin umumnya lebih singkat daripada dalam kondisi *in vitro*.

**Tabel 10.2** Zat pengatur tumbuh penginduksi akar pada tunas mikro berbagai tanaman

Tunas dari Kultur <i>In Vitro</i> Tanaman	ZPT Perangsang Akar (mg/l)	Pengakaran <i>In Vitro/Ex Vitro</i>	Referensi
<i>Sansevieria trifasciata</i> cv. Lorentii	2000 ppm IBA (pasta dari bubuk campuran auksin)	<i>Ex vitro</i>	Yusnita <i>et al.</i> , (2013)
Planlet kelapa sawit	2 mM NAA	<i>Ex vitro</i>	Sumaryono & Riyadi (2011)
Planlet tebu ( <i>Saccharum officinarum</i> L.)	20 mg/l NAA (direndam semalam)	<i>Ex vitro</i>	Tesfa <i>et al.</i> , (2016)
Jambu biji ( <i>guava</i> ) cv. Allahabad	0,4 mg/l IBA	<i>In vitro</i>	Kadam <i>et al.</i> , (2017)
Buah tin ( <i>Ficus carica</i> L.)	2,5 µM IBA atau NAA	<i>In vitro</i>	Hepaksoy & Aksoy (2006)
Anggur ( <i>Vitis</i> spp.) cv. Concord, Thompson Seedless, Beauty Seedless, King Ruby)	1 mg/l IBA	<i>In vitro</i>	Mustofa <i>et al.</i> , (2015)



## Bab 11

### *Embriogenesis Somatik pada Kultur In Vitro Tanaman*



Salah satu ciri tanaman maupun makhluk hidup lainnya adalah tumbuh dan berkembang. Tumbuh berarti bertambah ukurannya, misal tingginya, diameter batangnya, jumlah cabangnya, jumlah rantingnya, dan sebagainya. Berkembang berarti bertambah kemampuannya dalam menjalani kehidupan. Tanaman yang masih muda belum mampu berbunga. Tetapi, dengan bertambahnya usia, tanaman tersebut kemudian berbunga. Berbunga adalah salah satu contoh fenomena perkembangan sebab ada penambahan kemampuan. Dengan kata lain, perkembangan adalah suatu proses bertambahnya fungsi-fungsi fisiologis. Pada contoh di atas, berbunga adalah fungsi fisiologis yang sebelumnya belum dimiliki oleh tanaman.

Proses pertumbuhan dan perkembangan pada level tanaman pada dasarnya cerminan dari proses pertumbuhan dan perkembangan pada level sel, sebab tanaman terdiri atas sel-sel. Oleh karena itu, tumbuh dan berkembang juga dapat dilihat pada level sel atau kumpulan sel. Suatu sel dikatakan tumbuh jika ukurannya bertambah, misalnya menjadi lebih besar, lebih berat, atau lebih banyak. Sel menjadi lebih banyak karena mengalami pembelahan. Jadi, pembelahan sel merupakan fenomena pertumbuhan. Pada saat sel-sel menjadi bertambah banyak, kemudian sekelompok sel tertentu mengalami perubahan

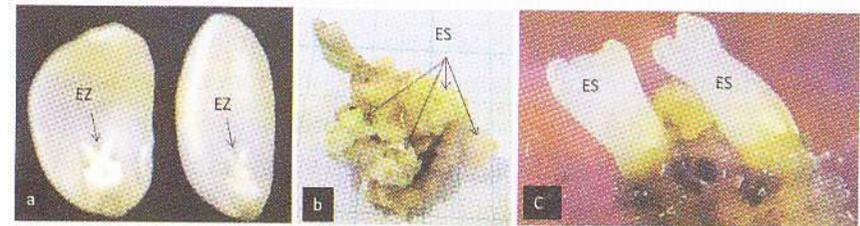
fungsi maka sel-sel itu dikatakan mengalami perkembangan. Pada tataran konsep, pertumbuhan dan perkembangan mudah dipisahkan. Akan tetapi, dalam tataran empiris sulit dipisahkan, sebab keduanya sering terjadi dalam waktu bersamaan.

Embriogenesis adalah suatu proses pertumbuhan dan perkembangan, yaitu suatu proses pembentukan embrio dari satu sel atau beberapa sel. Embrio adalah suatu struktur awal tanaman terdiri atas banyak sel yang sudah memiliki bakal akar dan bakal tajuk. Apabila embrio tanaman ditumbuhkan maka dia menjadi individu tanaman yang mempunyai tajuk dan akar. Jadi, embrio bersifat bipolar yang terdiri dari sel-sel di mana merupakan bakal tajuk dan bakal akar.

Ada dua jenis embrio tanaman, yaitu embrio zigotik dan embrio nonzigotik (Gray, 2000). Embrio zigotik adalah embrio hasil dari pertumbuhan maupun perkembangan satu sel yang merupakan hasil perpaduan antara sel gamet jantan dan sel gamet betina. Dengan kata lain, sel gamet jantan dan sel gamet betina berpadu membentuk satu sel yang kemudian tumbuh maupun berkembang menjadi zigot serta kemudian menjadi embrio. Embrio ini disebut embrio zigotik (Gambar 11.1a). Embrio nonzigotik adalah embrio yang merupakan hasil pertumbuhan dan perkembangan suatu struktur bukan zigot. Struktur bukan zigot ini misalnya adalah sel somatik (sel daun, sel akar, sel hipokotil, dan lain-lain) sehingga embrio yang terbentuk disebut sebagai embrio somatik (Gambar 11.1b,c). Proses pembentukan embrio somatik disebut embriogenesis somatik (*somatic embryogenesis*). Proses pembentukan embrio zigotik disebut embriogenesis zigotik (*zygotic embryogenesis*).

Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa proses perkembangan maupun perubahan-perubahan morfologi,

fisiologi, dan biokimia yang terjadi pada kedua embriogenesis ini memiliki banyak kemiripan (Dodeman *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 2001; Winkelmann, 2016). Oleh karena itu, sejumlah ilmuwan menggunakan embriogenesis somatik untuk mempelajari embriogenesis zigotik. Mempelajari embriogenesis zigotik secara langsung sulit dilakukan sebab melibatkan struktur tanaman induk sehingga banyak hal sulit untuk dikontrol. Mempelajari embriogenesis somatik lebih mudah sebab banyak hal dapat dikontrol dengan mudah. Embriogenesis somatik dilakukan secara *in vitro*. Hal ini memungkinkan dilakukan seperti modifikasi faktor lingkungan, nutrisi, serta hormonal dengan mudah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap proses embriogenesis somatik.



**Gambar 11.1** Contoh berbagai bentuk embrio: a. embrio zigotik pada biji kacang tanah; b. embrio somatik pada eksplan tebu; c. embrio somatik pada kacang tanah

Pada tataran praktis, embriogenesis somatik tanaman *in vitro* banyak dimanfaatkan di dunia pertanian. Embriogenesis somatik banyak dimanfaatkan pada perbanyakan vegetatif tanaman secara massal untuk menghasilkan bibit tanaman dalam jumlah besar sekaligus waktu relatif singkat. Embriogenesis somatik *in vitro* juga dapat digunakan sebagai wahana untuk menghasilkan varietas unggul, misalnya melalui induksi variasi somaklonal dan rekayasa genetika.

## Embriogenesis Somatik Langsung dan Tidak Langsung

Pada embriogenesis somatik tanaman secara *in vitro*, eksplan (misalnya berupa potongan daun, kotiledon, hipokotil, dan lain lain) disterilisasi, dikulturkan dalam suatu media kultur, diletakkan di dalam ruang kultur, dan dari eksplan tersebut muncul embrio somatik. Itulah cara sederhana untuk mengungkapkan proses embriogenesis somatik *in vitro*.

Embriogenesis somatik dapat terjadi secara langsung (*direct somatic embryogenesis*) atau tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*). Embriogenesis somatik langsung terjadi tanpa melalui pembentukan kalus, sedangkan embriogenesis somatik tidak langsung terjadi melalui pembentukan kalus. Kalus adalah sekumpulan sel yang membelah diri secara cepat sekaligus tidak memiliki karakteristik sel-sel dari bagian jaringan, organ, atau struktur tertentu tanaman. Pada embriogenesis somatik tidak langsung, dengan perlakuan tertentu sel-sel kalus dapat diarahkan untuk berubah menjadi sel-sel yang akan membentuk embrio. Sel-sel yang memiliki karakteristik dapat menjadi embrio disebut sel-sel embriogenik.

## Pada Embriogenesis Terjadi Perubahan Ekspresi Gen

Embriogenesis somatik merupakan proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Sebagian ilmuwan berpendapat bahwa embrio somatik berasal hanya dari satu sel dan sebagian lainnya dapat berasal dari sekumpulan sel.

Pada embriogenesis somatik, suatu sel membelah-belah diri lalu mengalami diferensiasi untuk membentuk embrio. Diferensiasi adalah suatu proses berubahnya satu sel atau sekumpulan sel menjadi sel atau sekumpulan sel yang mempunyai karakteristik baru. Dalam kasus embriogenesis

somatik karakteristik baru tersebut adalah karakteristik yang dimiliki oleh sel-sel komponen dari embrio. Karakteristik baru itu muncul bukan disebabkan oleh perubahan genetik, tetapi oleh perubahan ekspresi gen-gen yang sering disebut sebagai *differential expression*. Secara sederhana dapat dikemukakan bahwa gen-gen pada sel yang belum terdiferensiasi adalah sama persis dengan gen-gen dalam sel yang sudah terdiferensiasi, tetapi gen-gen yang terekspresikan berbeda. Gen-gen yang sebelumnya tidak terekspresikan menjadi terekspresikan. Bisa pula sebaliknya, gen-gen yang sebelumnya terekspresikan menjadi tidak terekspresikan. Berubahnya gen mana terekspresikan dan mana tidak terekspresikan berimplikasi pada perubahan proses fisiologi.

## Konsep Induksi-Ekspresi pada Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik mengikuti konsep induksi-ekspresi, artinya bahwa untuk berkembang menjadi embrio somatik sel-sel eksplan mengalami fase induksi dan fase ekspresi. Pada fase induksi, sel-sel kompeten mengalami induksi sehingga menjadi sel yang terdeterminasi, artinya sel-sel tersebut sudah memiliki arah perkembangan untuk menjadi embrio somatik. Sel seperti ini disebut sebagai sel embriogenik yang merupakan sel terdiferensiasi. Pada fase ekspresi, sel embriogenik mengalami perubahan menjadi embrio somatik. Pada tahap selanjutnya, embrio somatik mengalami maturasi menjadi embrio somatik matang yang siap untuk berkecambah.

Namun demikian, untuk dapat mengalami induksi jaringan eksplan yang dikulturkan, mula-mula mengalami prainduksi sehingga mengalami dediferensiasi. Saat itu, sekumpulan sel eksplan yang terdediferensiasi menjadi kompeten, yaitu siap

untuk menerima stimulus dari lingkungan kulturalnya dan mengalami induksi. Pada embriogenesis somatik tidak langsung terjadi proses dediferensiasi dari jaringan eksplan menjadi kalus, yaitu sekumpulan sel yang membelah-belah diri secara cepat. Sel-sel ini menjadi bersifat kompeten sehingga siap untuk mengalami induksi.

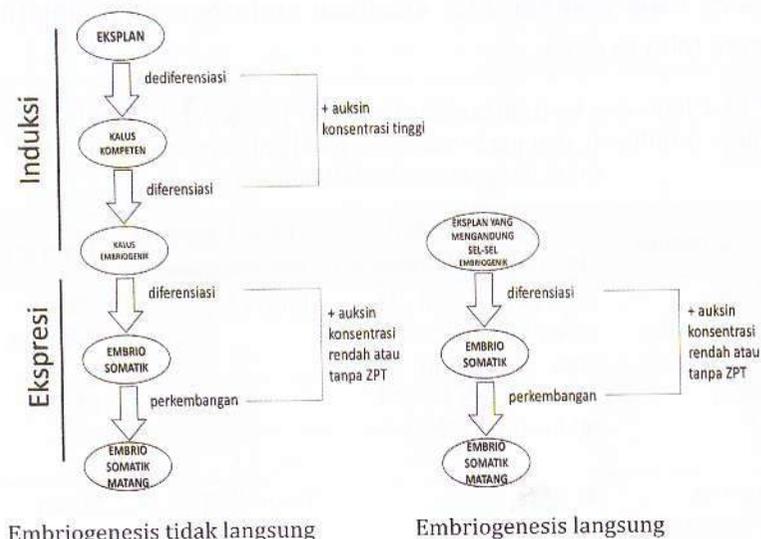
Pada embriogenesis somatik langsung sejumlah sel eksplan yang dikulturkan (misalnya potongan daun yang *highly differentiated*) kemungkinan sudah berada pada *stadia pre-determined* dan hanya perlu sedikit pemicu untuk membentuk embrio somatik. Oleh karena itu, ketika berada di media embriogenesis yang sesuai sel-sel eksplan terdeterminasi tersebut langsung tumbuh dan berkembang menjadi embrio somatik (von Arnold, 2008).

### Peranan Auksin pada Embriogenesis Somatik

Berdasarkan uraian di atas maka agar mengalami proses embriogenesis somatik tidak langsung, sel mengalami dediferensiasi menjadi kalus yang mengandung sel-sel kompeten. Kemudian, mengalami induksi menjadi sel yang terdeterminasi, yaitu sudah bersifat embriogenik lalu mengalami ekspresi untuk menjadi embrio somatik. Adapun agar mengalami embriogenesis somatik langsung maka sel-sel eksplan di mana sebagian sudah terdeterminasi (bersifat embriogenik) akan mengalami ekspresi menjadi embrio somatik pada kondisi yang sesuai (von Arnold, 2008).

Auksin memegang peranan penting pada embriogenesis somatik. Pada embriogenesis somatik tidak langsung, fase induksi umumnya membutuhkan konsentrasi auksin tinggi, sedangkan fase ekspresi membutuhkan konsentrasi auksin yang

rendah atau tidak membutuhkan auksin. Pada embriogenesis langsung, sebagian sel eksplan yang kemungkinan sudah embriogenik membutuhkan auksin konsentrasi rendah atau tidak membutuhkan auksin untuk membentuk embrio. Secara skematik, perbedaan tahapan pada embriogenesis somatik langsung dan tidak langsung disajikan pada Gambar 11.2.



Gambar 11.2 Skema tahap-tahap embriogenesis somatik tidak langsung (kiri) dan langsung (kanan)

Pada praktik di laboratorium, embriogenesis somatik tidak langsung juga dapat dipandang mengikuti konsep induksi-ekspresi. Pada fase induksi, eksplan dirangsang untuk membentuk kalus embriogenik. Namun demikian, setelah terbentuk kalus embriogenik, kalus ini pada umumnya dirangsang untuk mengalami perbanyakan atau proliferasi. Berdasarkan konsep induksi-ekspresi maka proliferasi ini masih berada pada fase induksi. Kalus embriogenik mengalami perkembangan menjadi embrio somatik (mengalami fase ekspresi). Oleh karena itu,

pada umumnya proses embriogenesis somatik dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu induksi kalus primer, proliferasi kalus hingga menjadi embriogenik, perkembangan embrio somatik, dan regenerasi tunas (Hapsoro & Yusnita, 2016). Tabel 11.1 menunjukkan kebutuhan zat pengatur tumbuh untuk tahap induksi dan ekspresi pada embriogenesis somatik tidak langsung. Pada Gambar 11.3 disajikan embriogenesis somatik tanaman tebu *in vitro*.

**Tabel 11.1** Jenis dan konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) pada tahap induksi, proliferasi, dan perkembangan pada embriogenesis somatik tidak langsung sejumlah tanaman

No.	Tanaman	Fase Induksi		Fase Ekspresi	Literatur
		Induksi	Proliferasi	Perkembangan	
1	<i>Agave fourcroydes</i> Eksplan: daun	2,26 $\mu$ M dicamba atau 2,07 $\mu$ M pikloram	2,26 $\mu$ M dicamba atau 2,07 $\mu$ M pikloram	Tanpa ZPT	Monja-Mio and. Robert (2013)
2	Kurma ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) Eksplan: daun	45 $\mu$ M pikloram dan 5 $\mu$ M 2iP	-	Tanpa ZPT	Mazri <i>et al.</i> , (2018)
3	Kelapa sawit ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) Eksplan: embrio zigotik	450 $\mu$ M pikloram	450 $\mu$ M pikloram	0,6 $\mu$ M NAA dan 12,3 $\mu$ M 2iP	de Carvalho Silva <i>et al.</i> , (2014)

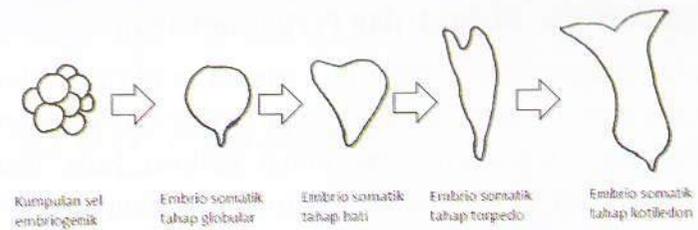
No.	Tanaman	Fase Induksi		Fase Ekspresi	Literatur
		Induksi	Proliferasi	Perkembangan	
4	Kelapa sawit ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) Eksplan: potongan daun	450 $\mu$ M 2,4-D	450 $\mu$ M 2,4-D dan 4,4 $\mu$ M BA	Tanpa ZPT atau 1 $\mu$ M BA	Yusnita dan Hapsoro (2011)
5	Passion fruit Eksplan: embrio zigotik	72,4 $\mu$ M 2,4-D dan 4,5 $\mu$ M BA	-	-	Rocha <i>et al.</i> , (2016)
6	Kentang Eksplan: ruas batang	5 $\mu$ M 2,4-D	5 $\mu$ M 2,4-D	Tanpa ZPT	Sharma <i>et al.</i> , (2008)
7	Tebu Eksplan: daun	13,6 $\mu$ M 2,4-D dan 1,1 $\mu$ M BA	13,6 $\mu$ M 2,4-D dan 1,1 $\mu$ M BA	Tanpa ZPT	Medeiros de Araújo Silva <i>et al.</i> , (2014)
8	Tebu Eksplan: daun	3 mg/L 2,4-D	3 mg/L 2,4-D	2,5 mg/L BA	Hapsoro <i>et al.</i> , (2012; 2018)
9	Turkis crocus Eksplan: batang, daun, dan corm.	4 mg/L NAA dan 4 mg/L TDZ	-	2 mg/L IAA dan 2 mg/L TDZ	Verma <i>et al.</i> , (2016)

No.	Tanaman	Fase Induksi		Fase Ekspresi	Literatur
		Induksi	Proliferasi	Perkembangan	
10	Mawar ( <i>Rosa chinensis</i> Jacq.) Eksplan: batang berbuku	13,56 $\mu$ M 2,4-D dan 2,25 $\mu$ M TDZ	13,56 $\mu$ M 2,4-D dan 2,25 $\mu$ M TDZ	9,45 $\mu$ M ABA	Chen <i>et al.</i> , (2014)
11	Kopi ( <i>Coffea canephora</i> ) Eksplan: daun	50 $\mu$ M BA	50 $\mu$ M BA	Tanpa ZPT	Ducos <i>et al.</i> , (2007)



**Gambar 11.3** Embriogenesis somatik *in vitro* pada tanaman tebu dari eksplan potongan daun pucuk (*leafrolls*): (a) eksplan mengalami prainduksi dan induksi membentuk kalus primer embriogenik; (b) kalus mengalami proliferasi, berlanjut dengan perkembangan membentuk embrio somatik; (c) embrio somatik beregenerasi menjadi tunas-tunas

Pada tanaman dikotil sebagaimana embrio zigotik, embrio somatik berkembang melalui empat tahap, yaitu globular, hati, torpedo, dan kotiledon. Pada tahap globular embrio somatik berbentuk bulat, tahap hati berbentuk hati, tahap torpedo berbentuk torpedo, dan tahap kotiledon muncul struktur berbentuk kotiledon (Gambar 11.4).



**Gambar 11.4** Tahap-tahap perkembangan embrio somatik tanaman dikotil secara *in vitro*



**Gambar 11.5** Tahap-tahap perkembangan embrio somatik tanaman monokotil secara *in vitro*

Berbeda dengan embriogenesis zigotik yang berlangsung secara sinkron, embriogenesis somatik berlangsung secara tidak sinkron. Berlangsung secara sinkron artinya bahwa sel-sel calon embrio menjalani tahap demi tahap embriogenesis dalam waktu yang sama. Berlangsung secara tidak sinkron artinya bahwa sel-sel calon embrio menjalani tahap demi tahap embriogenesis dalam waktu yang tidak sama. Misalnya sel-sel tertentu sudah mencapai tahap kotiledon, sementara sel-sel lainnya masih berada pada tahap globular, tahap hati, atau tahap torpedo.

Pada tanaman monokotil embriogenesis somatik juga melalui tahapan seperti pada embriogenesis zigotik, yaitu melalui tahap globular, tahap skutelum, dan tahap koleoptil (Gambar 11.5).

## Maturasi Embrio Somatik dan Perkecambahan

Pada embriogenesis zigotik, setelah embrio terbentuk maka mengalami maturasi agar siap berkecambah. Maturasi dicirikan oleh tercapainya morfologi embrio yang matang; terakumulasinya karbohidrat, protein, maupun lemak; menurunnya kadar air; terhambatnya perkecambahan; dan menurunnya atau berhentinya metabolisme secara perlahan. Embrio lalu menjadi toleran terhadap desikasi.

Pada embrio somatik, maturasi juga dicirikan oleh morfologi embrio yang matang dengan mengembangnya kotiledon serta terakumulasinya produk simpanan (karbohidrat, protein, dan lemak). Dibutuhkan perlakuan dehidrasi agar terjadi penurunan kadar air. Sebagaimana pada embrio zigotik, penurunan kadar air dibutuhkan untuk meningkatkan kualitas maturasi. Salah satu bentuk perlakuan dehidrasi adalah penggunaan media maturasi yang mempunyai nilai potensial osmotik rendah. Hal ini dapat dilakukan dengan menambahkan zat-zat osmotikum, misalnya garam-garam anorganik, asam-asam amino, gula, dan zat-zat dengan ukuran molekul yang lebih besar (seperti polietilen glikol (PEG) atau dekstran).

Embrio matang yang mengakumulasi produk simpanan dalam jumlah cukup dan telah mencapai kondisi toleran terhadap desikasi dapat berkecambah dengan baik untuk membentuk tanaman sehat. Zat pengatur tumbuh kadang-kadang dibutuhkan untuk merangsang perkecambahan. Glutamin dan kasein hidrolisat sering kali ditambahkan pada media perkecambahan atau regenerasi tunas *in vitro* (von Arnold, 2008).

## Daftar Pustaka



- Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M. Maryam, R.M., Iqbal, M. 2013. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 13(4): 539-547.
- Ali, K.M.S., Sabbour, A.M., Khalil, M.K., Aly A-H.S., Amal, F.M., Din, Z.E. 2017. In vitro morphogenesis of direct organs in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Siwy. *Intl. J. Advance Agric. Sci. Tech.* 4 (2): 01-12.
- Al-Mayahi, A.M.W. 2015. An efficient protocol for indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf segments of date palm (*Phoenix dactylifera*L.) cv. Quntar. *Afric.J. Agric. Res.* 10(10) : 1031-1042.
- Arditti, J., R. Ernst. 1993. *Micropropagation of Orchids*. John Wiley and Sons. 691 p.
- Awal, A., Ali Ahmed, A.B., Taha, R.M., Yaacob, J.S. and Mohajer, S., 2013: Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on in vitro flowering in 'Begonia x hiemalis' Fotsch. *Australian Journal of Crop Science*, 7(5): 691-698.
- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C. and Debergh, P., 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(1): 141-145.
- Chen, J.R., Wu, L., Hu, B.W., Yi, X., Liu, R., Deng, Z.N., and Xiong, X.Y., 2014. The influence of plant growth regulators and light

- quality on somatic embryogenesis in China rose (*Rosa chinensis* Jacq.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2): 295-304.
- Christianson, M.L. 1987. Causal events in morphogenesis. In: Plant Tissue and Cell Culture. Alan R Liss. New York. Pp45-55.
- Christianson, M.L. dan D.A. Warnick. 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev. Biol.* 95: 288-293.
- de Carvalho Silva, R., Luis, Z.G., Scherwinski-Pereira, J.E., 2014. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Growth Regul.* 72: 67-80.
- de Maagd, R.A., Bosch, D. and Stiekema, W. 1999. Bacillus thuringiensis toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in plant science*, 4(1): 9-13.
- Dodeman, V.L., Ducreux, G., Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48 (8): 1493-1509.
- Ducos, J.P., Labbe, G., Lambot, C. and Pétiard, V., 2007. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6), pp.652-659.
- Euwens, C.J. Mineral requirements of cultural coconut tissue. *Physiol. Plant.* 36: 23-24.
- George, E. F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure- Background. In. *Plant Propagation By Tissue Culture*. 3<sup>rd</sup> edition. Vol.1. The Background. George EF, MA Hall, G-J De Klerk (Eds). Springer. Dordrecht, The Netherland. 501 p.
- Gray, D.J. 2000. Nonzygotic embryogenesis. In: Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exersice 2nd Ed. (R.N. Trigiano & D.J. Gray, Eds). CRC Press LLC. Boca Raton, Florida.p175-189.
- Hapsoro, D., Alisan, M.I., Ismaryati, T., Yusnita. 2010. Effects of benzyladenine on in vitro shoot multiplication of banana (*Musa paradisiaca* Linn.) cv. Ambon Kuning and Tanduk. Proceeding of International Seminar on Horticulture to Support Food Security 2010. Bandar Lampung, Indonesia, 22-23 June 2010 (A-88).
- Hapsoro, D. dan Yusnita, Y. 2016. Kultur Jaringan untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Penerbit: CV Anugrah Utama Raharja (AURA). Bandar Lampung. 122 hlm.
- Hapsoro, D., Febriani, A.P., Yusnita, Y. 2012. *In vitro* shoot formation on sugarcane callus as affected by benzyladenine concentrations. *Jurnal Agronomi Indonesia*. 40(1): 56-61.
- Hapsoro, D., Inayah, T. Yusnita, Y. 2018. Plant regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) calli *in vitro* and its response to gamma irradiation. *J. ISSAAS*. 24 (1): 58-66.
- Hapsoro, D., Saputra, D., Yusnita, Y. 2017. Pengaruh konsentrasi benziladenin (BA) dan sukrosa terhadap multiplikasi tunas pisang Raja Bulu (AAB) *in vitro*. Prosiding Seminar Nasional BKS PTN Wilayah Barat Bidang Pertanian 2017 (hlm 59-64). Balunijuk, Pangkal Pinang, 20-21 Juli 2017.
- Hapsoro, D., Yusnita, Ardian, Setiawan, K., Evizal, R. 1995. Pengaruh konsentrasi agar dan benziladenin terhadap perbanyak tunas vanili (*Vanilla planifolia* Andr.) secara in vitro. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Pertanian* 3: 50-53.
- Hapsoro, D., Yusnita. 1993. Pengaruh benziladenin terhadap pembentukan tunas majemuk vanili (*Vanilla planifolia* Andr.) in vitro. Prosiding Seminar Penelitian Pertanian, BKS Barat, Palembang, 19-20 Februari 1993. Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya.
- Hapsoro, D., Yusnita. 1997. Micropropagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) using apical mesistems. *Jurnal Agrotropika* 2(1):1-5.

- Harada, J.J., Belmonte, M.F., Kwong, R.W. 2001. Plant embryogenesis (Zygotic and Somatic). *e LS*. Wiley online Library. (<http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002042.pub2>.)
- Hedayat, M., Abdi, G.H. and Khosh-Khui, M., 2009. Regeneration via direct organogenesis from leaf and petiole segments of pyrethrum [*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Schultz-Bip.]. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 6(1), pp.81-87.
- Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultive in vitro. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14: 1-223.
- Hemlata, C., Mahdi, A. 2016. *In vitro* regeneration of *Chrysanthemum morifolium* cv. White through petal explants. *Int. J.Sci. Res.Rev.* 5(1):35-44.
- Hepaksoy, S., Aksoy, U. 2006. Propagation of *Ficus carica* L. clones by in vitro culture. *Biologia Plantarum* 50 (3): 433-436.
- Hicks, G. 1994. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant.* 301:10-15.
- Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., Duggar, B.M. 1946. The influence of the composition of the medium on the growth *in vitro* of excised tobacco and sunflower tissue cultures. *Amer. J. Bot.* 33:591.
- Hodson de Jaramillo, E., Forero, A., Cancino, G., Moreno, A.M., Monsalve, L.E. and Acero, W., 2008. In vitro regeneration of three chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora*) varieties" via" organogenesis and somatic embryogenesis. *Universitas Scientiarum*, 13(2): 118-127.
- Humanez, A., Blasco, M., Brisa, C., Segura, J., Arrillaga, I. 2011. Thidiazuron enhances axillary and adventitious shoot proliferation in juvenile explants of Mediterranean provenances of maritime pine *Pinus pinaster*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 47: 569-577.
- Jazinizadeh, E., Zarghami, R., Majd, A., Iranbakhsh, A. and Tajaddod, G., 2015, July. In vitro production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv.'Barhee' plantlets through direct organogenesis. In *Biological Forum* (Vol. 7, No. 2, p. 566). Research Trend.
- Kadam, S., Singh, P., Patel, R.M. 2017. Rooting and acclimatization of *in vitro* of raised plantlets of guava cv. Allahabad safeda. *International Journal of Scientific Research Publication.* 7 (8): 449-453.
- Knudson, 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *Amer Orchid Soc Bull* 15: 214-217.
- Kumari, A., Baskaran, P., van Staden, J. 2017. In vitro regeneration of *Begonia homonyma* – A threatened plant. *South Afric. J.Bot.* 109: 174-177.
- Kumsa, F. 2017. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of two grapevines (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Afric. J. Biotech.* 16 (16):852-859.
- Larkin, P.J., Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures fo plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-204.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 18(1): 100-127.
- Lloyd, G. & McCown, B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Intl. Plant Prop. Soc. Proc.* 30: 421-427.
- Mazri, M.A., Meziani, R., Belkoura, I., Mokhless, B., Nour, S. 2018. A combined pathway of organogenesis and somatic embryogenesis for an efficient large-scale propagation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Mejhoul. *Biotech* 8: 1-8.
- Medeiros de Araújo Silva, M., Medeiros, L.E., Jaislanny, M., Cavalcante Granja, M.A.N.U.E.L.A., Willadino, L. and Camara, T., 2014. Antioxidant enzymes activity in embryogenic and non-embryogenic tissues in sugarcane. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2): 203-210.

- Monja-Mio, K.M. and Robert, M.L., 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5): 541-549.
- Muller-Wille, S. 2010. Cell theory, specificity, and reproduction. *Studies in History and Philosophy of Science Part C* 41 (3): 225-231.851.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann Rev Plant Physiol* 25: 135-166.
- Murashige T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Murashige, T. 1988. Modul Summer Course Plant Tissue Culture and Its Agricultural Application, University of California, Riverside.
- Mustofa, F. M.A., Shaaban, M.M., Elazab, D.S. Kamel, M.T. 2015. In vitro propagation of Four Grape Cultivars. *Assiut J. Agric. Sci.* 46(4): 65-76.
- Nasri, F., Mortazavi, S.N., Ghaderi, N. and Javadi, T., 2013. Propagation in vitro of *Alstroemeria ligtu* hybrid through direct organogenesis from leaf base. *Journal of Horticultural Research*, 21(2): 23-30.
- Ngomuo, M., E. Mneney and P. Ndakidemi. 2014. Control of browning by using ascorbic acid on shoot tip cultures of local *Musa* spp. (banana) cv. Mzuzu in Tanzania. *Afric. J. Biotech.* 13 (16): 1721-1725.
- Nitsch. J.P. dan Nitsch, C. 1956. Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues I. *American Journal of Botany*. 43 (10) : 839-851.
- Pan, M.J. and Van Staden, J. 1998. The use of charcoal in in vitro culture—A review. *Plant growth regulation*, 26(3), pp.155-163.
- Rahayu, M 2017. Solarisasi tanah, salah satu alternatif pengendalian penyakit tular tanah ramah lingkungan. *Info Teknologi BALITKABI*, 17 Juli 2017.
- Rocha, D.I., Pinto, D.L.P., Vieira, L.M., Tanaka, F.A.O., Dornelas, M.C., Otoni, W.C. 2016. Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. *Protoplasma*, 253(2): 595-609.
- Rosa, Y.B.C.J., Monte-Bello, C.C. and Dornelas, M.C., 2016. In vitro organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L.(Passifloraceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(1): 64-71.
- Rout, G.R., Mohapatra, A. and Jain, S.M., 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology advances*, 24(6): 531-560.
- Saptari, R.T., Sinta, M.M. and Budiani, A., 2017. In Vitro Propagation of *Anthurium adreanum* cv. Nitta through Organogenesis. *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 39(2): 192-200.
- Schwarz, O.J. and Beaty R.M. 2000. Organogenesis. In: *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercise* 2nd Ed. (R.N. Trigiano & D.J. Gray, Eds). CRC Press LLC. Boca Raton, Florida. p125-137.
- Sharma, S.K., Millam, S., Hedley, P.E., McNicol, J. and Bryan, G.J., 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective. *Plant Molecular Biology*. 68(1-2): 185-201.
- Singh, G., S. Shetty. 2011. Impact of tissue culture on agriculture on agriculture in India. *Invited Review Biotechnol. Bioinf. Bioeng.* 1(3):279-288.
- Skoog, F.C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-131.
- Staba, E.J., 1985. Milestones in plant tissue culture systems for the production of secondary products. *Journal of Natural Products*, 48(2): 203-209.

- Sumaryono, S., Riyadi, I. 2011. *Ex vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantlets derived from tissue culture. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 12 (2): 57-62.
- Sunpui, W. and Kanchanapoom, K., 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured in vitro. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 24(3): 357-364.
- Sutter, E., Langhans, R.W. 1982. Formation of epicuticular wax and its effects on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.* 60: 2896-2902.
- Taji, A., Kumar, P.P. and Lakshmanan, P., 2002. *In vitro* plant breeding (No. SB123. 6. T35 2002.). New York: food products Press.
- Tesfa, M., Admassu, B., Bantte, K. 2016. *Ex vitro* rooting of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantlets derived from tissue culture. *Advance in Crop Science and Technology* 4 (2): 1-4.
- Thakur, K. and Kanwar, K., In Vitro Plant Regeneration by Organogenesis from Leaf Callus of Carnation, *Dianthus caryophyllus* L. cv.'Master'. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, pp.1-9.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618-631.
- Thorpe, T.A. 1982. Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In: *Proc. 5th Intl.Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo* (Japanese association for Plant Tissue Culture).pp.121-124.
- Thorpe, T.A. 2006. History of Plant Tissue Culture, In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 318 : 9-32, In. *Plant Cell Culture Protocols*, 2<sup>nd</sup> Edition. VM Loyola-Vargas dan F Vazquez-Flota. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 25p.
- Thorpe, T.A., Kumar, I.S. 1993. Application of micropropagation to forestry. In: *Micropropagation, Technology and Application*. P.C. Debergh & R.H.Zimmerman (eds.). Kluwer Academic Publishers. 484p.
- Titov, S., Bhowmik, S.K., Mandal, A., Alam, M.S. and Uddin, S.N., 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. Kanthali floral bud explants. *Am. J. Biochem. Biotechnol*, 2(3): 97-104.
- Tymoszek, A., Zalewska, M. 2014. In vitro adventitious shoot regeneration from ligulate florets in the aspect of application in *Chrysanthemum* breeding. *Acta.Sci.Pol., Hortorum Cultus* 13 (2): 45-58.
- Vacin, E.F., Went, F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110: 605-613.
- Valenzuela-Sánchez, K.K., Juárez-Hernández, R.E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M.E. and Paredes-Lopez, O., 2006. Plant regeneration of Agave tequilana by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(4): 336-340.
- Vasil, I.K., 2008. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27(9): 1423.
- Verma, S.K., Das, A.K., Cingoz, G.S., Uslu, E. and Gurel, E., 2016. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. *Biotechnology Reports* 10: 66-74.
- von Arnold, S. 2008. Somatic embryogenesis. In EF George, MA Hall, and GJ DeKlerk (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition. Vol 1. The Background. Springer. AA Dordrecht, The Netherlands.
- White, P.R. 1943. *A Handbook of Plant Tissue Culture*. Castell Press. Lancaster, P.A.
- Winkelmann, T. 2016. Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* (pp 25-46). Humana Press, New York, NY.

- Yusnita, Sismanto, Hapsoro, D. 2010. In vitro propagation of *Anthurium plowmanii* cv. Wave of Love and plantlet acclimatization. Proceeding of International Seminar on Horticulture to Support Food Security 2010. Bandar Lampung, Indonesia, 22-23 June 2010 (A-95).
- Yusnita, Y. 2010. Pemuliaan Tanaman untuk Menghasilkan Hibrida Anggrek Unggul Baru. Penerbit LPPM Universitas Lampung. Bandar Lampung. 170 hlm.
- Yusnita, Y. 2014. Perbanyak In Vitro Tanaman Anggrek. Edisi 2. Penerbit Universitas Lampung, Bandar Lampung. 132 hlm.
- Yusnita, Y. 2015. Kultur Jaringan Tanaman sebagai Teknik Penting Bioteknologi untuk Menunjang Pembangunan Pertanian. Orasi Ilmiah Guru Besar Bidang Bioteknologi Pertanian. Fakultas Pertanian Universitas Lampung. 69 hlm.
- Yusnita, Y. Sulistiyawan, B., Karyanto, A., Hapsoro, D. (2017). Organogenesis pada eksplan daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* sebagai respons terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalenasetat (NAA). Prosiding Seminar Nasional BKS PTN Wilayah Barat Bidang Pertanian 2017. (hlm 392-399). Balunijuk, Pangkal Pinang, 20-21 Juli 2017.
- Yusnita, Y., Hapsoro, D. 2011. *In vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. *HAYATI Journal of Biosciences* 18 (2): 61-65.
- Yusnita, Y., Wahyuningsih, T. Sulistiana, P., Hapsoro, D. 2013. Perbanyak *In Vitro Sansevieria trifasciata* 'Lorentii': Regenerasi Tunas, Pengakaran, dan Aklimatisasi Planlet. *J. Agron. Indonesia* 41 (1): 70 - 76.



## Daftar Istilah (Glossary)



- Addenda** Suatu bahan organik yang ditambahkan ke dalam media standar kultur *in vitro* tanaman. Misalnya, homogenat buah pisang, jus tomat, air kelapa, dan lain-lain.
- Aklmatisasi** Pemeliharaan planlet yang disertai suatu perlakuan sedemikian rupa sehingga planlet mampu tumbuh dalam kondisi eksternal (bukan *in vitro*).
- Benih** Biji (*seed*) yang ditanam pada lahan pertanian untuk tujuan budi daya tanaman.
- Bibit** Bagian tanaman bukan biji (setek, *crown*, umbi, dan lain-lain) atau tanaman berukuran kecil yang ditanam di lahan pertanian untuk tujuan budi daya tanaman.
- Bioteknologi tanaman** Teknologi yang diterapkan pada tanaman untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas panen melalui manipulasi secara langsung materi genetik atau manipulasi sel.

Dediferensiasi	Suatu proses perubahan sel atau kumpulan sel dari mempunyai sifat sebagai bagian dari organ ataupun jaringan menjadi sel atau kumpulan sel dengan sifat yang tidak akan berkembang menjadi organ atau jaringan tertentu.
Determinasi	Suatu proses dialami sel atau kumpulan sel berujung pada suatu kondisi fisiologi dan biokimia tertentu sehingga menyebabkan sel atau kumpulan sel itu siap untuk berkembang menjadi jaringan ataupun organ tertentu.
Diferensiasi	Suatu proses perubahan sel atau kumpulan sel dengan sifat tidak berkembang menjadi jaringan atau organ tertentu menjadi sel atau kumpulan sel yang tumbuh dan berkembang menjadi jaringan atau organ tertentu.
Eksplan	Potongan bagian tanaman (daun, ujung tunas, ujung akar, dan lain-lain) yang ditanam untuk dikulturkan pada kultur tanaman secara <i>in vitro</i> .
Ekspresi	Suatu fase dalam proses diferensiasi sel atau kumpulan sel yang sudah mengalami determinasi untuk tumbuh dan berkembang menjadi jaringan ataupun organ tertentu.
Ekspresi gen	Suatu proses biokimia pembentukan protein yang dikode oleh gen tertentu.

Embriogenesis somatik	Suatu proses pembentukan embrio yang bukan hasil perpaduan antara gamet jantan dan betina secara <i>in vitro</i> dari sel-sel somatik.
<i>Embryo rescue</i> (penyelamatan embrio)	Kultur <i>in vitro</i> suatu embrio hasil hibridisasi, yang jika tidak dilakukan akan menyebabkan embrio tersebut tidak mampu berkembang secara normal atau mengalami keguguran.
Fusi protoplas	Penggabungan dua protoplas dari tanaman berbeda yang tidak dapat melakukan hibridisasi. Fusi protoplas bertujuan untuk mendapatkan tanaman dengan karakter-karakter gabungan dari masing-masing tanaman.
Gamet	Sel kelamin. Merupakan sel haploid ( $n$ kromosom) sebagai hasil pembelahan meiosis. Pada proses pembuahan, sel gamet jantan bergabung dengan sel gamet betina untuk membentuk zigot.
Gene gun	Alat untuk menembakkan gen ke sel-sel tanaman dalam proses transformasi genetik sehingga gen yang ditembakkan bergabung dengan gen-gen dari sel-sel yang ditembaki.
Hara makro	Unsur hara yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah banyak.
Hara mikro	Unsur hara yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah sedikit.

HEPA filter	HEPA ( <i>High Efficiency Particulate Air</i> ). Saringan udara yang digunakan pada alat <i>laminar air flow cabinet</i> sehingga diperoleh udara steril di dalam ruang kerja alat tersebut.
Hibrida interspesifik	Satu atau populasi tanaman yang merupakan hasil persilangan antara dua tetua berbeda spesies.
Hibridisasi	Proses persilangan atau penyilangan antara dua tetua tanaman. Hibridisasi disebut juga persilangan atau perkawinan.
Hormon	Zat kimia bukan hara yang disintesis oleh tanaman, di mana dalam konsentrasi sangat rendah dapat memengaruhi pertumbuhan dan perkembangan sel atau tanaman.
<i>In vitro</i>	Secara harfiah berarti dalam "tabung". Tanaman ditumbuhkan secara <i>in vitro</i> , artinya ditumbuhkan pada wadah-wadah kultur dalam kondisi aseptik dan lingkungan terkontrol di dalam ruang kultur.
Induksi	Secara harfiah berarti pemicuan, perangsangan. Istilah ini di antaranya dipakai pada konsep induksi-ekspresi embriogenesis somatik dan organogenesis. Dalam hal ini, induksi adalah suatu proses pada sel tidak terdiferensiasi yang berujung kondisi sel terdeterminasi, misalnya dalam kondisi siap untuk menjadi embrio somatik.

Jaringan	Kumpulan sel yang mempunyai fungsi sama. Misalnya jaringan epidermis, jaringan palisade, dan lain-lain.
Juvenil	Kata sifat yang berarti muda, belum matang, atau belum dewasa. Tanaman juvenil berarti tanaman belum dewasa, ditunjukkan oleh ketidakmampuannya untuk berbunga meskipun kondisi atau perlakuan yang memicu pembungaan dikenakan kepadanya.
Keragaman somaklonal	Keragaman genetik pada populasi tanaman akibat kultur <i>in vitro</i> .
<i>Laminar air flow cabinet</i>	Suatu alat untuk bekerja secara aseptik di dalam laboratorium. Alat ini dilengkapi dengan HEPA filter (lihat HEPA filter).
Larutan stok	Larutan berkonsentrasi relatif tinggi yang dipersiapkan untuk memudahkan dalam membuat media kultur. Larutan ini mengandung satu atau lebih zat yang konsentrasinya bisa sampai 1000 kali dari konsentrasi zat tersebut dalam media kultur. Misalnya $\text{CaCl}_2$ dibutuhkan dalam media 440 mg/l. Larutan stok $\text{CaCl}_2$ bisa dibuat 100x, yaitu 44.000 mg/l (44 g/l). Oleh karena itu, untuk membuat media satu liter dibutuhkan 10 ml larutan stok tersebut. Jadi, setiap kali kita membuat 1 liter media tidak harus menimbang 440 mg $\text{CaCl}_2$ .

<i>Mature/dewasa</i>	Kata sifat. Tanaman dewasa artinya tanaman yang mempunyai kemampuan untuk berbunga (lihat juvenil).
Morfogenesis	Proses pembentukan organ.
Mutagen	Zat kimia yang digunakan sebagai agen untuk memutasi organisme.
Organ	Bagian dari struktur tanaman yang mempunyai fungsi tertentu, misalnya daun, akar, batang, bunga, dan lain-lain.
Organogenesis	Proses pembentukan organ.
Pembelahan meiosis	Disebut juga pembelahan reduksi. Pembelahan sel menghasilkan sel-sel yang masing-masing mempunyai (n) kromosom.
Pembelahan mitosis	Pembelahan sel menghasilkan sel-sel yang masing-masing mempunyai (2n) kromosom.
Pembuluh vaskuler	Pembuluh xilem dan floem.
Perbanyakan generatif	Disebut juga perbanyakan kawin. Perbanyakan tanaman melalui perpaduan antara gamet jantan dan gamet betina.
Perbanyakan vegetatif	Disebut juga perbanyakan tak kawin. Perbanyakan tanaman melalui bagian tanaman serta tidak melibatkan perpaduan antara gamet jantan dengan gamet betina.
Planlet/ <i>Plantlet</i>	Tanaman kecil hasil teknik kultur jaringan. Tanaman kecil ini harus dibesarkan dulu di tempat pembibitan sebelum ditanam di lapang.

Propagul	Istilah ini biasa digunakan pada kultur jaringan tanaman. Bagian tanaman hasil kultur <i>in vitro</i> yang dapat digunakan untuk bahan perbanyakan tanaman lebih lanjut secara <i>in vitro</i> , misalnya tunas. Pada waktu disubkultur tunas ini dapat menjadi lebih banyak.
Rekayasa genetika	Suatu teknik memodifikasi sifat genetik tanaman dengan cara mengintegrasikan gen secara langsung ke dalam genom tanaman tersebut. Cara mengintegrasikan gen ini menggunakan suatu teknik transformasi, misalnya dengan bantuan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> atau <i>gene gun</i> (metode biolistik).
Tanaman <i>double haploid</i>	Tanaman ini dapat dihasilkan dari kultur serbuk sari <i>in vitro</i> . Jalur regenerasi yang dijalani adalah melalui pembentukan kalus. Penyebabnya karena berasal dari serbuk sari yang mengandung (n) kromosom maka kalus ini juga mengandung (n) kromosom. Dalam proses selanjutnya akan terjadi penggandaan kromosom secara spontan sehingga terbentuk kalus yang mengandung (2n) kromosom. Apabila kalus (2n) ini berkembang menjadi tanaman maka tanaman ini adalah tanaman <i>double haploid</i> . Keistimewaan tanaman <i>double haploid</i> adalah bahwa tanaman ini homozigot pada setiap lokusnya.

Tanaman haploid	Tanaman yang mengandung (n) kromosom. Tanaman ini dapat dihasilkan dengan mengkulturkan serbuk sari <i>in vitro</i> dan meregenerasikannya menjadi tanaman.
Tanaman transgenik	Tanaman hasil rekayasa genetika.
Teori totipotensi sel	Teori ini menyatakan bahwa setiap sel tumbuhan mempunyai perangkat fisiologis maupun genetik lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tumbuhan utuh pada kondisi yang sesuai.
<i>Ti-plasmid</i>	<i>Tumor-inducing plasmid</i> . Plasmid dari <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (bakteri tanah), bakteri penyebab penyakit puru pada sejumlah tanaman.
<i>True-to-type</i>	Suatu individu tanaman dikatakan <i>true-to-type</i> jika tanaman tersebut memiliki komposisi genetik tertentu yang sama dengan induknya. Demikian juga, suatu populasi tanaman dikatakan <i>true-to-type</i> jika individu-individu tanaman dalam populasi tersebut mempunyai komposisi genetik tertentu yang sama satu dengan lainnya dan sama dengan induknya.



Tunas adventif	Tunas yang tumbuh bukan dari mata tunas, tetapi dari sel-sel yang “nasibnya” tidak akan berkembang menjadi tunas. Misalnya, secara <i>in vitro</i> tunas dapat tumbuh dari daun. Dalam hal ini, sel-sel daun tumbuh dan berkembang menjadi tunas. Tunas ini berasal dari sel-sel yang “nasibnya” adalah sel-sel daun, bukan sel-sel tunas.
Tunas aksilar	Tunas samping. Tunas yang tumbuh dan berkembang dari mata tunas yang ada di ketiak daun. Tunas yang tumbuh dan berkembang dari mata-mata tunas pada buku-buku batang.
Umur fisiologi	Menggambarkan seberapa tua atau muda umur bagian tanaman. Misalnya, daun tanaman kedelai bagian atas mempunyai umur fisiologi yang lebih muda daripada daun bagian bawah.
Umur ontogenetik	Umur ontogeni. Menggambarkan seberapa dewasa suatu tanaman. Misalnya, tanaman mangga ini sudah dewasa, tetapi tanaman mangga itu belum dewasa. Pernyataan tersebut menggambarkan umur ontogenetik. Tanaman mangga yang sudah cukup umur dan pernah berbuah maka dikatakan bahwa tanaman mangga itu adalah tanaman dewasa.

Zigot Suatu sel ( $2n$ ) kromosom yang merupakan hasil penggabungan antara gamet jantan dan gamet betina.

ZPT Zat Pengatur Tumbuh. Zat bukan hara alami ataupun sintetik yang dalam konsentrasi rendah dapat memengaruhi pertumbuhan dan perkembangan bagian tanaman atau tanaman secara utuh, baik *ex vitro* maupun *in vitro*.

## Tentang Penulis



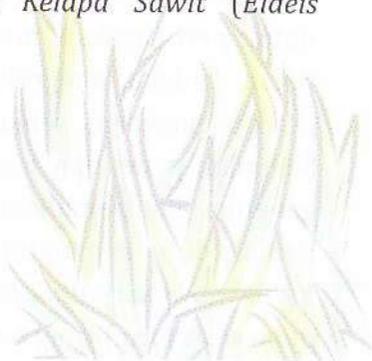
**Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.** lahir di Pematang, 2 April 1961, lulus sebagai Sarjana Pertanian dari Departemen Agronomi Institut Pertanian Bogor (IPB Bogor) pada tahun 1985. Lulus sebagai magister bidang Fisiologi Tanaman dari University of Kentucky, Lexington, Amerika Serikat tahun 1991. Kemudian, lulus sebagai doktor bidang Bioteknologi Tanaman dari IPB Bogor tahun 2005 dengan sebagian penelitian disertasinya dilaksanakan di The University of Queensland, Australia. Seluruh tugas akhir pada masa studinya adalah pada bidang kultur jaringan tanaman atau penggunaan kultur jaringan tanaman untuk mempelajari aspek perbanyakan, fisiologi, dan bioteknologi tanaman. Penulis adalah dosen pada Program Studi Agroteknologi, Agronomi, dan Hortikultura; Magister Agronomi; serta Doktor Ilmu Pertanian di Universitas Lampung. Penelitian yang telah serta sedang dilakukan berfokus pada kultur jaringan untuk perbanyakan, meliputi tanaman-tanaman vanili, kacang tanah, kedelai, anggrek, pisang, duku, melinjo, kelapa sawit, jarak pagar, nanas, semangka, kopi, krisan, *anthurium*, dan tebu. Sejumlah penelitian mengenai kultur jaringan untuk rekayasa genetika dan pemuliaan mutasi. Buku ini adalah buku kedua penulis di bidang kultur jaringan. Buku yang pertama berjudul *Kultur Jaringan untuk Perbanyakan Klonal Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.)* yang terbit tahun 2016.





**Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.** lahir di Jombang, 3 Agustus 1961, merupakan guru besar pada Program Studi Agroteknologi; Agronomi dan Hortikultura; Magister Agronomi; serta Program Doktor Ilmu Pertanian Universitas Lampung. Pendidikan sarjana diperoleh dari Departemen Agronomi Fakultas

Pertanian Institut Pertanian Bogor (IPB Bogor), lulus tahun 1984. Pendidikan magister bidang Hortikultura diperoleh dari University of Kentucky, Lexington, Amerika Serikat, lulus tahun 1990. Pendidikan doktor bidang Bioteknologi Tanaman diperoleh dari IPB Bogor, lulus tahun 2005. Pengalaman penelitian penulis meliputi kultur jaringan untuk perbanyakan beragam tanaman, seperti vanili, anggrek, kacang tanah, stroberi, krisan, tebu, pisang, nanas, *anthurium*, melinjo, kelapa sawit, dan kopi. Penulis juga meneliti mengenai perbanyakan vegetatif sejumlah tanaman, misalnya tanaman lada, sirih merah, ananas, anggrek, aglaonema, dan jambu. Buku ini adalah buku ke-7 yang ditulisnya. Sebelumnya, penulis telah menulis sejumlah buku yang berjudul *kultur jaringan: Cara Memperbanyak Tanaman secara Efisien* (2003), *Perbanyak In Vitro Tanaman Anggrek* (2010), *Pemuliaan Tanaman untuk Menghasilkan Anggrek Hibrida Unggul* (2012), *Kultur Jaringan Tanaman Pisang* (2015), *Kultur Jaringan Tanaman sebagai Teknik Penting Bioteknologi untuk Menunjang Pembangunan Pertanian* (2015), dan *Kultur Jaringan untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.)* (2016).



## Indeks



- A**
- Addenda* 94, 95, 97, 98  
*Agrobacterium tumefaciens* 12, 13  
Aklimatisasi 45, 56, 58, 61, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80  
Akuades 38, 47, 53, 54, 85, 86, 87, 88, 94, 95, 102, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114  
Anakan 18, 19, 74  
Arang aktif 71, 75, 94, 98, 100, 113, 114, 115, 127, 100, 113, 114, 127  
Autotrof 76
- B**
- Bench* 38  
Benih 3, 14, 17, 18, 24, 133  
Bibit 2, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 56, 57, 58, 59, 61, 63, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 95, 133  
Bipolar 132
- C**
- Caulogenesis* 117  
*Crown* 19, 63, 64  
*Culture establishment* 61, 67
- D**
- Dediferensiasi 30, 31, 32, 119, 120, 121, 123, 135, 136  
*De novo* 30, 31, 59, 117, 119, 121  
Determinasi 32, 120, 121  
Diferensiasi 29, 30, 33, 118, 119, 134  
*Differential expression* 135  
Diseksi 40, 69, 86, 87, 90  
Distilator 25, 38
- E**
- Ekspresi 32, 134, 135, 136, 137, 138  
Embriogenesis somatik 59, 133, 134, 135, 140

**F**  
Filter HEPA 7, 28, 67, 88

**G**  
Gamet 17, 132  
*Gelrite* 94, 102

**H**  
Hara makro 95, 105  
Hara mikro 95, 96, 103, 104,  
106, 107, 108  
*Hardening* 77

**I**  
Induksi 2, 32, 97, 119, 121,  
124, 133, 135, 136, 138

**J**  
Juvenil 66, 67

**K**  
Kompeten 31, 32, 120, 121,  
122, 135, 136

**L**  
*Laminar air flow cabinet* 40,  
65, 67, 83, 88  
Larutan baku 104, 107  
Larutan stok 38, 42, 104, 105,  
106, 107, 108, 109, 111,  
112, 113, 114

**M**  
*Magnetic stirrer* 38, 47, 53, 54,  
114

Mature 66  
*Micrografting* 8  
*Micropipet* 47  
Mitosis 29  
Mutagen 12  
Morfogenesis 29, 30, 31, 32,  
34, 98, 119, 120, 121

**N**  
Nanas 19, 63, 98

**O**  
Organogenesis 30, 32, 33, 55,  
58, 59, 64, 117, 118, 119,  
121, 122, 123, 124, 125

**P**  
*Particle bombardment* 13  
Pepton 45, 93, 95, 98  
*Phytagar* 102  
Plastisitas 28, 31  
Prainduksi 119, 120, 135, 140  
*Pre-determined* 136  
Propagul 24, 61, 71  
PVP 71

**R**  
Rekayasa genetika 2, 15, 64,  
124, 133, 163  
*Rhizogenesis* 117  
Ruang transfer 40

**S**  
Septik 1  
Solarisasi 78

Somaklonal 2, 12, 20, 30, 124,  
133  
*Sucker* 63, 64

**T**  
*Ti-plasmid* 11, 12  
Totipotensi 3, 5, 27, 28, 31,  
117  
Transgenik 13, 14  
Trypton 45, 93, 95, 98  
*True-to-type* 24, 58, 63, 64  
Tunas adventif 7, 8, 31, 33, 59,  
99, 117, 118, 122, 124,  
125, 126  
Tunas aksilar 11, 33, 55, 56,  
58, 63, 72, 74, 99

**U**  
Umur Fisiologi 66  
Umur ontogenetik 66

**V**  
*Vacuum pump* 40  
Varietas 3, 14, 17, 20, 66, 133  
Virus 2, 8, 13, 62, 66, 78

**W**  
*Weighting boat* 46

**Z**  
Zigot 17, 29, 119, 132