

KULTUR JARINGAN

Untuk PERBANYAKAN KLONAL

Kelapa Sawit

(*Elaeis guineensis* Jacq.)



Dwi Hapsoro dan Yusnita

UNIVERSITAS LAMPUNG



LEMBAR PENGESAHAN

Judul : **Kultur Jaringan Untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

Penulis : Dwi Hapsoro dan Yusnita

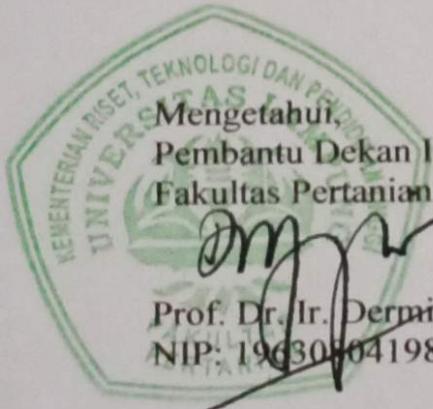
Instansi : Fakultas Pertanian Universitas Lampung

Publikasi : Buku Referensi

ISBN : 978-602-0878-90-4

Penerbit : Aura Publishing
(www.aura-publishing.com)

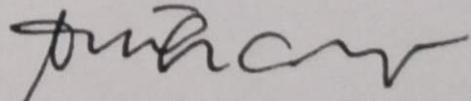
Bandar Lampung, 6 April, 2016

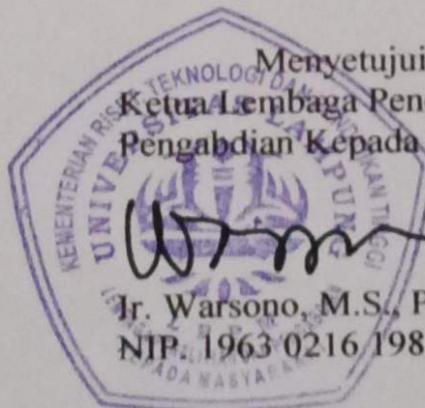


Mengetahui,
Pembantu Dekan I
Fakultas Pertanian Unila

Prof. Dr. Ir. Dermiyati, M.Agr.Sc. 
NIP: 196304041987032002

Penulis


Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.
NIP: 196104021986031003



Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian Dan
Pengabdian Kepada Masyarakat

Ir. Warsono, M.Sc., Ph.D.
NIP: 1963 0216 1987031003

DOCUMENTASI LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT UNIVERSITAS LAMPUNG	
TGL	13 April 2016
NO. INVEN	0003/B/B/N/FP/2016
JENIS	Buku
PARAF	st

KULTUR JARINGAN

Untuk PERBANYAKAN KLONAL

Kelapa Sawit

(*Elaeis guineensis* Jacq.)



Dwi Hapsoro dan Yusnita

UNIVERSITAS LAMPUNG 2016



Hak cipta pada penulis
Hak penerbitan pada penerbit
Tidak boleh diproduksi sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun
Tanpa izin tertulis dari pengarang dan/atau penerbit

Kutipan Pasal 72 :

Sanksi pelanggaran Undang-undang Hak Cipta (UU No. 10 Tahun 2012)

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

KULTUR JARINGAN
Untuk **PERBANYAKAN KLONAL**
Kelapa Sawit
(*Elaeis guineensis* Jacq.)

Dwi Hapsoro dan Yusnita

AURA
ANUGRAH UTAMA RAHARJA

Perpustakaan Nasional RI:
Katalog Dalam Terbitan (KDT)

KULTUR JARINGAN
Untuk PERBANYAKAN KLONAL
Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Penulis :

Dwi Hapsoro
Yusnita

Desain Cover & Layout

Team Aura Creative

Penerbit

CV. Anugrah Utama Raharja (AURA)

Anggota IKAPI

No.003/LPU/2013

Alamat

Jl. Prof. Dr. Soemantri Brojonegoro, Komplek Unila

Gedongmeneng Bandar Lampung

HP. 081281430268

E-mail : aura_print@ymail.com

Website : www.aura-publishing.com

x + 122 hal :15,5 x 23 cm

Cetakan, Februari 2016



Hak Cipta dilindungi Undang-undang

Kata Pengantar

Pertama-tama kami mengucapkan syukur alhamdulillah, segala puji semata-mata hanya untukNya, atas terselesaikannya penulisan buku ini. Buku ini kami beri judul: “Kultur Jaringan untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit”. Alasan utama yang mendorong penerbitan buku ini adalah langkanya publikasi ilmiah mengenai kultur jaringan kelapa sawit. Langkanya publikasi tersebut mungkin disebabkan oleh nilai komersial yang tinggi dari teknologi ini. Perbanyak klonal kelapa sawit dengan kultur jaringan terdiri atas serangkaian tahapan yang semuanya krusial sehingga setiap detil tahapan harus mendapatkan perhatian serius untuk keberhasilannya. Dari sisi inilah penulis mengharapkan buku ini bisa memberikan manfaat, terutama kepada mereka yang akan memulai mengkulturjaringankan kelapa sawit, karena mereka tidak harus memulai dari nol sebab apa yang diuraikan dalam buku ini sudah mencakup tahapan utama dalam menghasilkan bibit klonal kelapa sawit.

Agar pembaca mendapatkan pemahaman yang utuh, maka dalam buku ini juga diuraikan mengenai teori dan praktek kultur jaringan tanaman secara umum beserta contoh-contoh sejumlah tanaman bukan kelapa sawit. Buku ini dimulai dengan uraian mengenai pentingnya tanaman kelapa sawit, morfologinya dan perbanyak bibitnya (Bab 1). Selanjutnya diulas mengenai prinsip dasar kultur jaringan dan pembiakan *in vitro* tanaman (Bab 2). Di bab ini diulas bagaimana bagian tanaman dapat menjadi tanaman utuh. Pemahaman mengenai hal tersebut diharapkan dapat digunakan sebagai dasar untuk menyusun strategi mendapatkan teknologi perbanyak klonal dengan kultur jaringan. Topik-topik yang bersifat teknis diulas di Bab 3 (Fasilitas dan Peralatan Laboratorium) dan Bab 4 (Media Kultur Jaringan: Formulasi dan Cara membuatnya). Kedua bab tersebut diharapkan dapat memberikan panduan

bagi para pihak yang tertarik untuk mempraktekkan kultur jaringan tanaman.

Uraian secara khusus mengenai kultur jaringan tanaman kelapa sawit diuraikan pada Bab 5 (Embriogenesis Kelapa Sawit *In vitro*). Di Bab 5 ini, uraian disajikan dengan sangat teknis dan detil dari mulai pengambilan eksplan sampai pengulturannya, lalu dilanjutkan transfer ke sejumlah media yang komposisinya tersaji dengan jelas. Buku ini ditutup dengan Bab 6 yang mengulas mengenai prospek dan kendala penggunaan bibit klonal kelapa sawit dari kultur jaringan. Bab ini diharapkan memberikan kesadaran bahwa prospek penggunaan bibit klonal kelapa sawit hasil kultur jaringan sangat cerah, tetapi ada sejumlah kendala yang harus dihadapi.

Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Kementerian Ristek yang bekerjasama dengan Masyarakat Perkelapasawitan Indonesia (MAKSI) melalui program Rusnas dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan) melalui program Hibah Kompetensi yang telah menyediakan dana penelitian sehingga dapat dihasilkan protokol kultur jaringan tanaman kelapa sawit yang tertuang dalam buku ini. Ungkapan terima kasih juga kami sampaikan kepada Fakultas Pertanian Universitas Lampung yang telah menyediakan fasilitas penelitian dan biaya penerbitan buku ini.

Tiada gading yang tak retak. Penulis membuka selebar-lebarnya pintu kritik dari pembaca demi perbaikan karya ini. Mudah-mudahan buku ini bermanfaat.

Bandar Lampung, Februari 2016

Penulis

Daftar Isi

	Halaman
Kata Pengantar	
Daftar Isi	
Daftar Tabel	
1 Kelapa Sawit: Kegunaan, Morfologi, dan Perbanyak Bibit	1
Penghasil minyak yang efisien	1
Morfologi	3
Pemuliaan tanaman dan pentingnya perbanyak klonal	13
2 Prinsip Dasar Kultur Jaringan dan Pembiakan <i>In Vitro</i> Tanaman	18
Kultur jaringan: definisi dan kegunaan	18
Karakteristik kultur jaringan tanaman	19
Pertumbuhan dan perkembangan tanaman tergantung pada potensi genetik total dari sel	21
Pola regenerasi pada perbanyak tanaman dengan kultur jaringan	22
Perbanyak tunas samping dan perbanyak buku	23
Morfogenesis sebagai proses perkembangan	25
Pembentukan embrio somatik	28
Tahapan perbanyak <i>in vitro</i>	32
3 Fasilitas dan Peralatan Laboratorium	39

	Ruang pembersihan dan penanganan pertama eksplan	41
	Pembuatan media	42
	Ruangan untuk pekerjaan aseptik	46
	Ruang kultur atau ruang inkubasi	47
4	Media Kultur Jaringan: Formulasi dan Cara Membuatnya	49
	Formulasi dan komponen media	50
	Pembuatan media	67
5	Embriogenesis Somatik Kelapa Sawit	73
	Persiapan eksplan, sterilisasi, dan pematapan kultur	75
	Induksi kalus	78
	Induksi kalus embriogenik dan embriogenesis	82
	Perkembangan embrio somatik dan regenerasi tunas	82
	Pemanjangan tunas, pengakaran, dan aklimatisasi	87
6	Prospek dan Kendala Penggunaan Bibit Klonal Kelapa Sawit dari Kultur Jaringan	90
	Daftar Pustaka	98
	Kamus Istilah	113
	Indeks	118

Daftar Tabel

Tabel		Halaman
3.1.	Peralatan yang dibutuhkan di ruang persiapan media	43
4.1.	Beberapa formulasi media yang digunakan pada kultur <i>in vitro</i> tanaman	51
4.2.	Zat pengatur tumbuh yang umum digunakan dalam kultur jaringan tanaman, bobot molekulnya, dan respons tanaman yang dilaporkan dalam literatur.	65
4.3.	Pengelompokan komponen kimia dalam pembuatan larutan stok untuk membuat media MS	68
5.1.	Formulasi media untuk induksi kalus primer pada eksplan daun pada kultur jaringan tanaman kelapa sawit	84
5.2.	Formulasi media EM untuk induksi kalus embriogenik kelapa sawit	85

1

Kelapa Sawit: Kegunaan, Morfologi, dan Perbanyakan Bibit

Penghasil minyak yang efisien

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var *tenera*) adalah tanaman monokotil dalam famili *Arecaceae*. Saat ini secara ekonomi kelapa sawit merupakan komoditas amat penting, karena merupakan tanaman penghasil minyak paling tinggi di antara tanaman-tanaman penghasil minyak. Nama genus '*Elaeis*' berasal dari bahasa Yunani '*elaion*', yang berarti minyak, yang mencerminkan ciri sebagai penghasil minyak. Kata '*guineensis*' menunjuk pada teluk Guinea di Afrika Barat, yang dipercaya sebagai tempat asal kelapa sawit (Jacquemard, 1998). Nama binomial *Elaeis guineensis* Jacq. diberikan kepada kelapa sawit oleh Jacquin pada tahun 1763 berdasarkan pada sebuah kajian terhadap tanaman ini ketika diintroduksi dari Afrika Barat ke *West Indian island of Martinique* (Pursglove, 1975). Kelapa sawit berasal dari wilayah hutan hujan tropis Afrika Barat, yang menjalar melalui wilayah selatan Sierra Leone, Liberia, Ivory Coast, Ghana, Togo, Benin, Nigeria, Cameroon sampai wilayah katulistiwa negara Zaire dan Angola (Opeke, 1982).

Salah satu ciri paling menonjol dari kelapa sawit adalah tingginya kandungan minyak pada buahnya, baik pada jaringan mesokarp maupun kernel. Sebagai tanaman penghasil minyak tertinggi dan terefisien di antara tanaman-tanaman penghasil minyak, kelapa sawit dewasa ini dibudidayakan dalam luasan lebih dari 10,5 juta hektar sedunia. Inilah yang menjadikannya menduduki nomor satu sebagai sumber minyak makan dunia. Daging buah (mesokarp)nya yang berwarna merah-oranye mengandung 45-55% minyak (Tan, 2009). Sebagai gambaran, satu hektar kelapa sawit menghasilkan kurang lebih 4 metrik ton minyak, dan pada kebun-kebun yang paling produktif, dapat dihasilkan 8 ton minyak. Angka ini kurang lebih delapan kali lipat dari minyak yang dihasilkan tanaman canola dan rapeseed (0,49 metrik ton/ha), hampir sepuluh kali lipat produksi minyak oleh tanaman bunga matahari (0,42 metrik ton/ha), dan sebelas kali lipat produksi minyak oleh tanaman kedele (0,36 metrik ton/ha). Di samping itu, di antara jenis-jenis minyak utama yang dikonsumsi di seluruh dunia, dari total 183,9 juta ton, minyak sawit menduduki peringkat pertama sebagai minyak yang paling banyak dikonsumsi, yaitu sebesar 52,1 juta ton, diikuti oleh minyak kedele 41,7 juta ton, minyak *rapeseed* 24,2 juta ton, dan minyak bunga matahari 14,5 juta ton (Palm Oil Facts and Figures 2014, Sime Darby: http://www.simedarby.com/upload/Palm_Oil_Facts_and_Figures.pdf, diakses 30 Nov 2015).

Sejak berkecambah, tanaman kelapa sawit memerlukan waktu kurang lebih satu tahun di nurseri atau pembibitan hingga bibit siap tanam di lahan. Kelapa sawit mulai berbuah dan dapat dipanen setelah berumur dua tahun dan sepanjang tahun memproduksi hingga tanaman berumur 30 tahun. Limbah dari perkebunan kelapa sawit seperti material biomassa dapat

dimanfaatkan sebagai mulsa. Material biomassa juga dapat dimanfaatkan untuk proses pembangkit energi berbasis biomassa.

Minyak kelapa sawit diekstrak dari buahnya yaitu dari mesokarp (yang dikenal sebagai minyak sawit) dan dari kernel (yang dikenal sebagai minyak inti sawit). Kedua jenis minyak itu dapat dimanfaatkan baik sebagai minyak makan maupun bukan minyak makan. Contoh pemanfaatan sebagai minyak makan adalah untuk minyak goreng, margarin, pengganti cocoa butter, *shortening*, dan es krim. Contoh pemanfaatan sebagai bukan minyak makan adalah untuk lilin, sabun, deterjen, bahan kosmetik, dan biodiesel. Sumbangan minyak sawit terhadap produksi minyak nabati dunia adalah 34,04%, diikuti oleh minyak kedele (27,56%), minyak rapeseed (15,02%), minyak

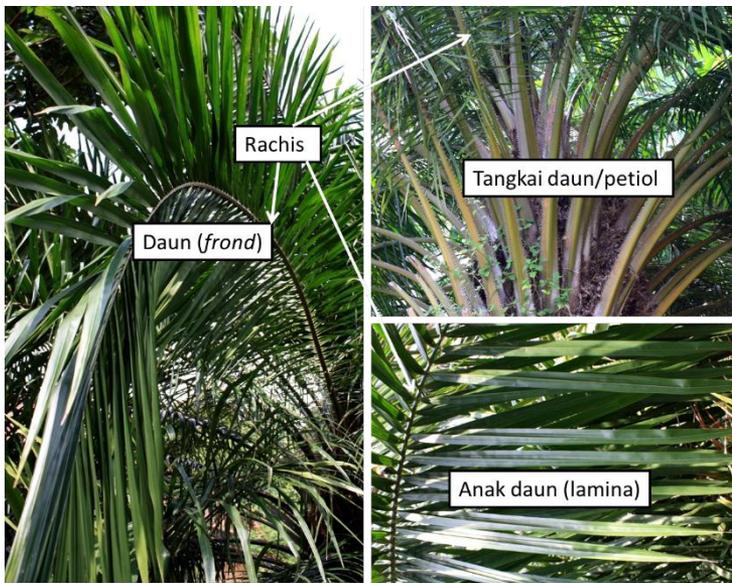
Morfologi

Pengetahuan mengenai morfologi kelapa sawit sangat penting untuk manajemen budidayanya. Pengetahuan morfologi kelapa sawit juga dibutuhkan untuk memahami jaringan atau organ apa yang dapat dikulturkan pada perbanyakan *in vitro* kelapa sawit. Meskipun karakter yang spesifik dari postur kelapa sawit dan laju pertumbuhannya dikontrol secara genetik, morfologi umum dari kelapa sawit dapat diuraikan di bawah ini.

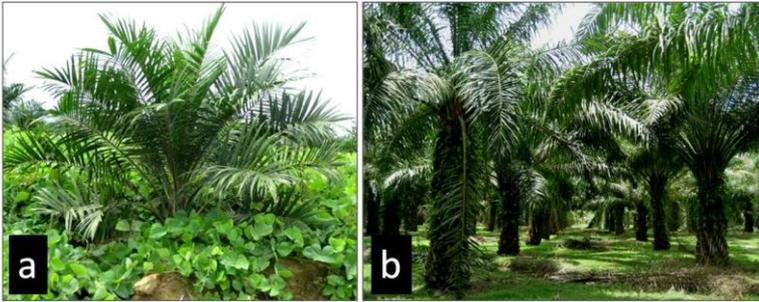
Daun dan Filotaksi. Daun kelapa sawit (*frond*) terdiri atas 150-250 anak daun (*leaflet*) atau lamina yang tersusun berjajar pada suatu poros panjang (5-6,5 m). Bentuk daun kelapa sawit disajikan pada Gambar 1.1. Poros mengandung tangkai daun atau petiol berduri. Panjang petiol 1-1,5 m, diukur dari batang pohon ke posisi anak daun pertama pada rachis. Rachis adalah bagian dari poros daun yang panjangnya 4-5 m dimana terletak

banyak lamina. Anak daun atau lamina panjangnya 70-100 cm dengan tulang daun (*midrib*) berada di tengahnya. Lebar anak daun bagian tengah 3-5 cm. Kelapa sawit muda (Gambar 1.2a) menghasilkan 20-30 daun tiap tahun. Kelapa sawit yang umurnya lebih dari 10 tahun (Gambar 1.2b) menghasilkan rata-rata lebih dari 20 daun per tahun.

Salah satu perawatan penting pada perkebunan komersial kelapa sawit adalah memotong daun-daun tua setelah dilakukan penen buah. Kelapa sawit yang terpelihara dengan baik hanya memiliki 35-40 daun.



Gambar 1.1. Daun kelapa sawit terdiri atas petiol, rachis, dan anak daun.



Gambar 1.2. Kelapa sawit muda (a) menghasilkan jumlah daun per tahun yang lebih banyak daripada kelapa sawit tua (b).

Tata letak daun kelapa sawit pada batang (dalam botani disebut filotaksi) adalah simetris secara radial ke arah luar. Daun nomor satu didefinisikan sebagai daun terbaru yang sudah terbuka penuh. Daun nomor dua muncul berikutnya. Begitu seterusnya dan menunjukkan filotaksi simetris. Daun (*frond*) yang belum terbuka (*spears*) tersusun simetris secara radial ke arah dalam dan diberi nomor sebagai 0, -1, -2, -3 dan seterusnya pada arah yang berlawanan dengan daun yang sudah terbuka (Gambar 1.3). Mengetahui posisi *spears* dalam filotaksi sangat penting untuk menentukan *spears* mana yang akan digunakan sebagai eksplan untuk perbanyakkan *in vitro*, untuk mendapatkan sampel daun untuk analisis hara dan untuk mengetahui posisi daun dimana buah masak.



Gambar 1.3. Filotaksi daun kelapa sawit adalah simetris ke arah luar untuk daun yang sudah membuka dan simetris ke arah dalam untuk daun-daun muda yang belum membuka.

Batang. Batang kelapa sawit berupa silinder besar dengan struktur yang kuat, yang tertutup oleh bekas potongan pangkal petiol yang dipangkas. Kelapa sawit dewasa memiliki hanya satu batang, yang tumbuh tegak ke atas, yang dapat mencapai 25-30 meter, sebagai penyangga kumpulan daun dan buah. Sebagian besar permukaan batang tertutup oleh pangkal-pangkal petiol yang tersisa setelah daun dipangkas. Batang juga berfungsi sebagai struktur yang melingkupi jaringan pembuluh xilem dan floem, yang berfungsi untuk transport air dan hara serta fotosintat ke seluruh bagian tanaman (Ng *et al.*, 2003). Bagian atas batang terdapat ketiak-ketiak daun tempat munculnya rangkaian bunga dan buah yang tersusun dalam tandan (Gambar 1.4).



Gambar 1.4. Pohon kelapa sawit mempunyai satu batang yang bisa tumbuh sampai ketinggian 30 m dan menghasilkan buah yang tersusun dalam tandan.

Selama masa hidupnya, kelapa sawit tumbuh dan berkembang melalui dua tahap. Tahap pertama adalah dari saat tanaman ditanam di lapang sampai tanaman berumur 3,5 tahun. Tahap kedua adalah pada waktu tanaman berumur 3,5 sampai dengan lebih dari 15 tahun. Pada tiga tahun pertama, batang kelapa sawit tumbuh sangat lambat, yaitu ketika terjadi pembentukan dasar batang yang berukuran tinggi 30 cm dan diameter 40-60 cm. Pada tahap kedua (3,5-15 tahun), batang tumbuh dengan lebih cepat, yaitu 30-40 cm per tahun dan menurun menjadi 20-40 cm per tahun pada tanaman kelapa sawit yang lebih tua. Yang batangnya tumbuh lambat lebih disukai daripada yang tumbuh cepat. Kelapa sawit yang batangnya tumbuh lebih cepat mempunyai umur ekonomi yang lebih pendek sebab panen buah masih ekonomis hanya sampai ketika tinggi batang 15 m (Ng *et al.*, 2003). Contoh perkebunan kelapa sawit dengan tanaman dewasa dan tanaman muda disajikan pada Gambar 1.5.



Gambar 1.5. Perkebunan kelapa sawit di Indonesia dengan tanaman kelapa sawit muda (kiri) dan dewasa (kanan)

Rangkaian Bunga. Kelapa sawit adalah tanaman berumah satu, yang mempunyai bunga jantan dan bunga betina pada tanaman yang sama. Kelapa sawit termasuk tanaman menyerbuk silang, sebab bunga jantan dan bunga betina tidak masak dalam waktu yang sama. Pada perkebunan komersial kelapa sawit, polinasi dibantu dengan kumbang *Elaeodobius kamerunicus*, yang diperkenalkan ke Asia Timur pada awal 1980-an (Syed *et al.*, 1982). Setiap ketiak daun secara potensial merupakan tempat munculnya primordia rangkaian bunga yang dapat berkembang menjadi bunga jantan, betina, atau hermafrodit. Rangkaian bunga jantan terdiri dari bulir (*spike*) silindris bunga jantan yang mengandung lebih dari 1000 bunga jantan yang berwarna putih keabu-abuan (Gambar 1.6a). Bulir bunga jantan disangga oleh dasar bunga (*peduncle*) yang panjang. Bunga betina yang sudah diserbuki dan dibuahi lalu berkembang menjadi tandan buah. Bunga-bunga betina tersusun dalam *spike* yang disangga oleh dasar bunga yang kuat dan diselubungi dalam lempengan kayu (*woody spath*) yang terletak pada dasar petiol. Bunga betina tersusun secara spiral yang melingkari poros yang berada di tengah. Lempengan kayu bagian luar terbuka ketika rangkaian bunga betina

berkembang sehingga bunga-bunga betina terpapar keluar (Gambar 1.6b). Sebuah bunga betina tersusun atas 6 perianth dengan ovari 3 karpel dan stigma yang trifid. Dalam satu rangkaian bunga terdapat kurang lebih 150 *spike* dan lebih dari 1500 individu bunga betina.



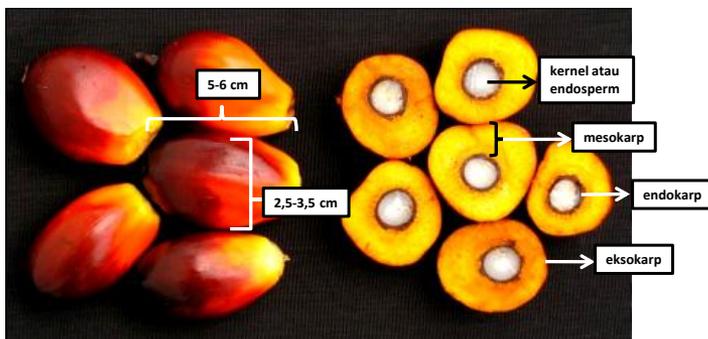
Gambar 1.6. *Spike* bunga jantan (a) dan *spike* bunga betina (b)

Spike bunga betina berkembang menjadi buah setelah dibuahi. Waktu yang dibutuhkan dari antesis sampai buah masak adalah 5-6 bulan. Bunga mungkin mengalami keguguran akibat stres lingkungan atau stres makanan. Proporsi bunga betina terhadap seluruh bunga disebut nisbah seks. Kelapa sawit yang produktivitasnya tinggi mempunyai nisbah seks tinggi. Nisbah seks juga sangat dipengaruhi oleh stres lingkungan seperti kekeringan, kahat hara, hama penyakit atau pemangkasan yang terlalu berat. Berdasarkan uraian di atas maka potensi produksi kelapa sawit ditentukan oleh laju produksi daun, nisbah seks, dan jumlah bunga yang mengalami aborsi. Hal-hal tersebut di antaranya dipengaruhi oleh konstitusi genetik, intersepsi cahaya di antara kanopi, kelembaban udara, temperatur, dan status hara tanaman.

Buah. Buah kelapa sawit hanya memiliki satu biji. Ukuran buah adalah panjang 5-6 cm, lebar 3-3,5 cm. Bentuk buah oval atau hampir bulat. Buah terdiri dari biji yang dikelilingi oleh

mesokarp berdaging dan kaya minyak dan eksokarp berupa kulit tipis di bagian paling luar. Biji terdiri dari endosperm atau kernel yang kaya minyak dan endokarp atau tempurung yang keras (Gambar 1.7). Masing-masing buah kelapa sawit mengandung minyak antara 40-45%, sedangkan setiap tandan buah mengandung minyak sekitar 25%.

Panen pertama dapat dilakukan pada waktu tanaman berumur 2 tahun sejak ditanam di lapang, dan tanaman bisa terus dipanen sampai usianya 30 tahun. Buah muda biasanya berwarna hitam sampai ungu dan ketika sudah matang berwarna merah oranye (Gambar 1.8). Pemanenan buah biasanya dilakukan setiap 10 hari. Standar kematangan buah sangat penting sebab buah yang terlalu matang mengandung banyak asam lemak bebas, sedangkan buah yang belum masak mengandung sedikit minyak. Di samping itu, pemanenan buah yang terlalu matang membutuhkan lebih banyak tenaga kerja. Standar kemasakan yang digunakan adalah, tandan buah dapat dipanen jika terdapat 5 buah rontok ke tanah untuk setiap tandannya, atau, terdapat satu buah yang mudah lepas per satu kilogram tandan buah (Gillbanks, 2003).



Gambar 1.7. Buah kelapa sawit terdiri atas endosperm atau kernel, endokarp, mesokarp dan eksokarp.



Gambar 1.8. Buah-buah kelapa sawit tersusun dalam tandan, berwarna hitam sampai hitam keunguan pada waktu masih muda (a) dan menjadi oranye kemerahan pada waktu masak (b).

Pada standar pemanenan tersebut kandungan minyak adalah maksimum. Tandan buah yang masak biasanya terletak pada ketiak daun nomor 30-32. Bobot setiap tandan buah yang dihasilkan oleh tanaman muda adalah kurang dari 10 kg sedangkan yang dihasilkan oleh tanaman dewasa adalah 15-35 kg. Tandan buah yang dipanen lalu dibawa ke pabrik untuk diekstraksi minyaknya (Gambar 1.9).



Gambar 1.9. Tandan buah kelapa sawit yang sudah dipanen, siap untuk dibawa ke pabrik untuk diekstrak minyaknya.

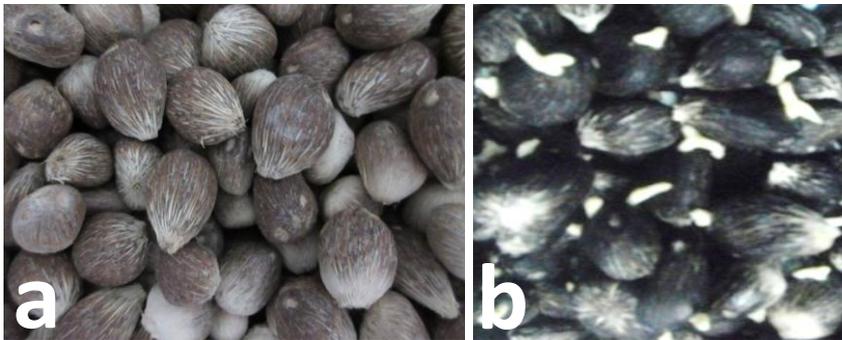
Struktur bagian dalam buah kelapa sawit sangat tergantung pada konstitusi genetik. Kelapa sawit tipe *dura* mempunyai eksokarp tebal (2-8 mm), mesokarp tipis, dan endokarp (*shell*) tebal serta kernel yang besar (Gambar 1.10a). Mesokarp-nya yang tipis menyebabkan tipe *dura* memiliki kandungan minyak yang rendah. Tetapi kernelnya yang besar menyebabkan tipe *dura* cocok untuk produksi minyak inti sawit. Kelapa sawit tipe *pisifera* tidak mempunyai endokarp (Gambar 1.10b) dan cenderung menghasilkan bunga betina yang steril. Tipe yang banyak dibudidayakan, yaitu *tenera*, merupakan hasil persilangan *dura* x *pisifera* dan umumnya mempunyai tebal endokarp yang sedang dan kernel yang cukup besar. Mesokarpnya yang tebal menyebabkan produksi minyaknya tinggi (Gambar 10c). Buah tipe *dura* lebih kecil daripada tipe *tenera*, dimana buah tipe *dura* berukuran panjang $30,25 \pm 5,07$ mm dan lebar $19,94 \pm 2,64$ mm, sedangkan tipe *tenera* mempunyai panjang $35,96 \pm 4,08$ mm dan lebar $20,15 \pm 3,79$ mm (Owolarafe *et al.*, 2007).



Figure 1.10. Bentuk biji kelapa sawit tipe (a) *dura*, (b) *pisifera* dan (c) *tenera*, hasil silangan antara tipe *dura* dan *pisifera*.

Biji. Biji kelapa sawit berwarna coklat tua dan keras (Gambar 1.11a). Panjangnya 2-4 cm, terdiri atas endokarp yang tebal dan endosperm yang keras yang berwarna putih keabu-abuan

dan berminyak serta di dalamnya terdapat embrio. Panjang embrio sekitar 3 mm. Pengecambahan biji membutuhkan perlakuan fungisida, perendaman dan pengocokan dalam air untuk meningkatkan kadar airnya menjadi 22%, stratifikasi panas, dan pembungkusan di dalam kantong polietilen. Pada umumnya biji mulai berkecambah 7-10 hari setelah perlakuan panas kemudian berlanjut sampai 40 hari setelah perlakuan panas (Gillbanks, 2003). Kecambah yang mempunyai radikula dan plumula normal (Gambar 1.11b) siap untuk ditanam di pembibitan.



Gambar 1.11. Biji kelapa sawit (a) dan biji yang sedang berkecambah (b).

Pemuliaan tanaman dan pentingnya perbanyak klonal kelapa sawit

Tujuan utama pemuliaan tanaman kelapa sawit adalah untuk meningkatkan produksi minyak per pohon per hektar. Beberapa karakter agronomi penting terkait adalah produksi tandan buah per pohon yang tinggi, buah dan biji berukuran besar, cangkang tipis. Di samping itu, karakter lain yang menjadi sasaran pemuliaan adalah pertumbuhan batang yang

lambat, daun yang pendek, ketahanan terhadap penyakit busuk batang *Ganoderma*, ketahanan terhadap stress kekeringan, dan kualitas minyak sawit yang dicerminkan oleh *iodine value* (IV), kandungan β -karoten, kandungan vitamin E dan kandungan asam lemak tak jenuh (asam oleat) yang tinggi (Jalani *et al.*, 1997; Din, 2009).

Tanaman yang mempunyai sosok kompak menjadi pilihan. Tanaman kelapa sawit kompak adalah tanaman kelapa sawit yang batangnya tumbuh lambat dan berdaun pendek. Penanaman kelapa sawit dengan daun yang lebih pendek memungkinkan penggunaan populasi tanaman yang lebih besar per hektar dengan tetap mempertahankan kompetisi antartanaman yang masih sama. Populasi tanaman standar yang dipakai perkebunan kelapa sawit adalah 110-160 tanaman per hektar (Gillbanks, 2003). Penanaman kelapa sawit yang berdaun lebih pendek dapat meningkatkan populasi tanaman per hektar dan dapat meningkatkan produksi tandan buah.

Potensi hasil tanaman kelapa sawit, yaitu hasil maksimum yang didapatkan pada lingkungan yang baik setelah penutupan kanopi secara penuh diperkirakan mencapai 17 ton minyak per hektar per tahun (Corley, 1985), atau dengan angka yang lebih realistik 10-11 ton minyak per hektar per tahun (Breure, 2003). Plot-plot percobaan terbaik kelapa sawit dapat menghasilkan 8,6 ton minyak per hektar per tahun (Corley *et al.*, 1976), sedangkan progeni-progeni terpilih mampu menghasilkan 12,2 ton per hektar per tahun (Rajainadu *et al.*, 1990). Angka-angka tersebut masih jauh di atas produksi rata-rata perkebunan kelapa sawit di Asia Tenggara, yaitu hanya 2,6 ton minyak per hektar di Indonesia, 3,6 ton minyak per hektar di Malaysia dan 5-7 ton minyak per hektar di perkebunan terbaik (Ng *et al.*, 2003b).

Salah satu cara untuk mengurangi kesenjangan antara produktivitas potensial dan aktual adalah dengan menggunakan bibit klonal (hasil kultur jaringan) yang berasal dari sekelompok tanaman yang berproduksi tertinggi, yang merupakan 2-5% dari populasi tanaman secara keseluruhan pada perkebunan komersial (Ng *et al.*, 2003b).

Sebagian besar perkebunan komersial kelapa sawit dewasa ini menggunakan bibit yang berasal dari biji tanaman kelapa sawit tipe *tenera*, dengan tebal cangkang (endokarp) sedang, yang merupakan hasil hibridisasi antara kelapa sawit tipe *dura* dan tipe *pisifera*. Tetua betina tipe *dura* (D) mempunyai cangkang sangat tebal yang dikontrol oleh gen tunggal *D* (bergenotipe *DD*), sedangkan tetua jantannya adalah tipe *pisifera* (P), yang biasanya mempunyai organ betina steril, tidak mempunyai cangkang dan dikontrol oleh gen *d* (bergenotipe *dd*). Hasil persilangan dari kedua tipe tersebut, hasil dari *D* x *P*, yaitu *tenera*, dengan demikian mempunyai genotipe *Dd*. Buah dari kelapa sawit tipe *tenera* ini mengandung minyak 30% lebih tinggi daripada tipe *dura*, tetuanya (Beirnaert, 1940 dalam Ng *et al.*, 2003a). Namun demikian populasi tanaman tipe *tenera* (*Dd*) pada banyak perkebunan komersial menunjukkan keragaman tinggi pada pertumbuhan vegetatif dan produktivitasnya. Sebuah studi yang dilakukan di Malaysia menunjukkan, populasi tanaman yang berasal dari bibit *tenera* klonal yang produktivitasnya tinggi menghasilkan tandan buah yang 20-40% lebih tinggi daripada populasi tanaman yang berasal dari biji *tenera* hasil persilangan *D* X *P* (Ng *et al.*, 2003b). Jadi, di antara upaya untuk mencapai potensi hasil tertinggi dari suatu genotipe kelapa sawit adalah dengan cara memperbanyak bibit secara vegetatif atau klonal dari tanaman ortet *elite* hasil program pemuliaan yang produksinya

tinggi, atau menghasilkan benih hasil silangan tetua-tetua klonal yang mempunyai daya gabung khusus terbaik (Kushairi *et al.*, 2010).

Oleh karena pembiakan vegetatif kelapa sawit tidak dapat dilakukan secara konvensional, maka kultur jaringan menjadi satu-satunya cara untuk membiakkan kelapa sawit secara vegetatif sehingga bibit klonal dapat dihasilkan. Studi mengenai pembiakan *in vitro* tanaman kelapa sawit sudah dilakukan sejak tahun 1970-an oleh perkebunan Unilever, perkebunan Harrison & Crossfields, sebuah kelompok usaha perkebunan di Malaysia (Smith dan Jones, 1970; Corley *et al.*, 1977), dan IRHO/ORSTOM di Perancis (Rival dan Parveez, 2005). Sekarang ini, IOPRI (Indonesian Oil Palm Research Institute) atau PPKS (Pusat Penelitian Kelapa Sawit), MPOB (Malaysian Palm Oil Board), dan sejumlah perkebunan komersial di Malaysia, Indonesia dan Papua New Guinea, sudah mendapatkan protokol pembiakan klonal *in vitro* yang efisien untuk tanaman kelapa sawit dan teknik ini telah mereka gunakan untuk menghasilkan jutaan bibit klonal kelapa sawit. Namun informasi detail mengenai teknik tersebut sangat terbatas, mungkin karena nilai komersialnya yang tinggi (Rival dan Parveez, 2005).

Pada tahun 1986, Corley *et al.* (1986) melaporkan terjadinya abnormalitas pada buah yang dihasilkan oleh tanaman klonal kelapa sawit. Buah abnormal ini disebut buah mantel (*mantled fruits*). Buah kelapa sawit mantel mempunyai kandungan minyak yang lebih rendah daripada buah normal. Oleh karena itu, fenomena abnormalitas karena keragaman somaklonal ini, walaupun keterjadiannya relatif rendah (yaitu sekitar 5% dari tanaman regenerasi) dan sebagian dapat mengalami perubahan menjadi normal (Rival & Parveez, 2005),

namun telah menghambat minat untuk memproduksi dan menggunakan bibit klonal kelapa sawit secara besar-besaran.

Seiring dengan lebih banyaknya studi, informasi dan pemahaman akan proses kultur jaringan dan biologi molekuler yang didapat oleh para peneliti untuk memecahkan masalah-masalah yang dihadapi selama beberapa dekade terakhir, permasalahan abnormalitas buah tampaknya sudah lebih diketahui penyebabnya dan dapat ditekan sekecil mungkin, sehingga akhir-akhir ini timbul lagi minat yang kuat dari berbagai perkebunan untuk memproduksi bibit klonal kelapa sawit (Shearman *et al.*, 2013; CIRAD, 2014; Ong-Abdullah *et al.*, 2015).

Buku ini memaparkan hasil penelitian kami mengenai pembiakan *in vitro* tanaman kelapa sawit dan mengkaji perkembangan penelitian kultur *in vitro* kelapa sawit. Agar informasi yang disajikan lebih utuh, maka dalam buku ini juga dikemukakan aspek teori kultur *in vitro* tanaman dan prakteknya di laboratorium.

2

Prinsip Dasar Kultur Jaringan dan Pembiakan *In Vitro* Tanaman

Kultur Jaringan: Definisi dan Kegunaan

Kultur jaringan tanaman adalah istilah umum untuk ilmu dan seni mengkulturkan bagian tanaman (sel, protoplas, jaringan, atau organ) secara aseptik dalam kondisi lingkungan terkontrol yang disuplai hara mineral yang lengkap dari media buatan. Media tersebut bisa berwujud cairan atau semi-padat, yang biasanya terdiri atas semua hara mineral esensial, sumber karbon, vitamin, komponen organik lainnya, dan zat pengatur tumbuh yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan bagian tanaman yang dikulturkan. Teknik kultur *in vitro* sudah dimulai lebih dari seabad yang lalu yaitu tahun 1902, dengan pionirnya Godlieb Haberland. Tujuannya mulai dari sebagai alat untuk mempelajari biologi tanaman sampai untuk diaplikasikan di dunia pertanian. Sekarang ini, kultur jaringan tanaman sudah banyak dimanfaatkan sebagai teknik yang efisien untuk memperbanyak tanaman secara vegetatif, untuk menghasilkan tanaman yang bebas patogen, produksi bahan-bahan obat, produksi tanaman haploid serta

untuk membantu rekayasa genetika dan pemuliaan molekuler (*molecular breeding*) (Winkelman *et al.*, 2006). Penggunaan teknik kultur jaringan untuk memperbanyak tanaman sering disebut *micropropagation* atau perbanyakan tanaman *in vitro*.

Karakteristik kultur jaringan tanaman

Apapun tujuannya, teknik kultur jaringan tanaman mempunyai karakteristik penting sebagai berikut:

1. Kondisi *in vitro* yang aseptik dari bagian tanaman yang dikulturkan.
2. Pemeliharaan pada medium buatan yang mengarahkan eksplan agar mengalami regenerasi jalur tertentu.
3. Kondisi lingkungan terkontrol yang cocok.

Bagian tanaman yang digunakan untuk memulai suatu kultur dinamakan eksplan. Eksplan dapat berupa ujung tunas, bagian batang, bagian daun, bagian bunga, ujung akar, bagian dari biji, atau biji yang sangat kecil. Pemilihan eksplan sangat penting karena tidak semua bagian tanaman mempunyai kemampuan sama untuk berregenerasi *in vitro*. Jaringan muda yang meristematik biasanya merupakan pilihan terbaik sebagai eksplan karena mempunyai kemampuan tinggi untuk berregenerasi *in vitro*.

Dituntutnya kondisi aseptik pada kultur menyebabkan sterilisasi eksplan menjadi langkah awal yang kritis untuk menghilangkan kontaminasi eksplan tersebut sebab cendawan, bakteri, dan organisme lainnya. Jadi, kultur harus aseptik sebelum eksplan berkembang ke arah pola regenerasi tertentu. Pembebasan eksplan dari mikroorganisme dapat dilakukan dengan melakukan sterilisasi permukaan eksplan. Sterilisasi

dari bakteri dan cendawan yang menempel pada permukaan eksplan biasanya dilakukan, *pertama*, dengan mencuci eksplan dengan air kran yang mengalir. *Kedua*, dengan mencuci eksplan dengan satu atau lebih jenis zat antiseptik, misalnya alkohol (metanol atau etanol), sodium hipoklorit (NaOCl), kalsium hipoklorit (CaOCl_2), hidrogen peroksida (H_2O_2), perak nitrat (AgNO_3), atau merkuri klorida (HgCl_2). *Ketiga*, dengan membilas dengan air steril sedikitnya sebanyak tiga kali. Media hara juga harus disterilkan, yaitu dengan mengautoklafnya pada suhu 121°C dan tekanan 1 kg cm^{-2} selama 10 menit atau lebih. Peletakan eksplan dan subkultur juga dilakukan secara aseptik di dalam kotak-pindah steril, atau lebih baik di *laminar-air-flow cabinet* (LAFC) yang diperlengkapi dengan filter HEPA (*high efficiency particulate air*). Setelah eksplan diletakkan secara aseptik pada media, maka wadah kultur harus ditutup dengan tutup poliureten, alumunium foil, atau lembaran plastik polietilen steril. Selanjutnya wadah kultur berisi medium dan eksplan diletakkan pada ruang kultur yang bersih dan terkontrol kondisi lingkungannya agar terhindar dari kontaminasi mikroorganisme.

Media dasar kultur jaringan tanaman harus berisi semua unsur-unsur hara mineral esensial dan sumber energi, yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Sejumlah vitamin dan suplemen organik seringkali harus ditambahkan ke dalam media. Selain itu, zat pengatur tumbuh (ZPT) tertentu dengan konsentrasi tertentu seringkali harus ditambahkan ke dalam media untuk mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Sitokinin atau campuran antara sitokinin dan auksin lemah biasanya dibutuhkan untuk merangsang pembentukan tunas. Auksin sering dibutuhkan untuk merangsang pembentukan akar.

Auksin atau campuran antara auksin dan sitokinin dalam konsentrasi rendah sering dibutuhkan untuk pembentukan kalus dan pembentukan embrio somatik.

Kondisi kultur yang paling umum pada kultur jaringan tanaman adalah, cahaya putih disuplai dari lampu fluoresens dengan kuat penerangan 1000-4000 lux, fotoperiodisitas 16 jam terang 8 jam gelap, dan suhu diatur pada suhu $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan mesin pendingin (AC).

Pertumbuhan dan perkembangan tanaman tergantung pada potensi genetik total dari sel

Pertumbuhan dan perkembangan bagian kecil tanaman *in vitro* dan dalam kondisi aseptik untuk membentuk tanaman utuh dimungkinkan karena potensi genetik total dari sel-sel, atau karena karakter totipotensi dari setiap sel tanaman. Teori sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden pada 1839 menyatakan bahwa setiap sel mempunyai informasi genetik dan perangkat fisiologi yang lengkap untuk beregenerasi menjadi tanaman utuh jika berada dalam kondisi yang menguntungkan. Tampaknya kondisi yang menguntungkan itu sebagian terpenuhi dengan ditemukannya zat pengatur tumbuh oleh Went pada tahun 1930-an khususnya asam indolasetat (IAA), sebuah hormon auksin, lalu furfural aminopurin (kinetin), sebuah hormon sitokinin, oleh Carlos Miller bersama timnya dari *University of Wisconsin* pada tahun 1955. Pada tahun 1957 Skoog dan Miller mempublikasikan hasil penelitian mereka pada kultur jaringan tanaman tembakau yang menyimpulkan bahwa nisbah sitokinin/auksin yang tinggi mendorong pembentukan tunas tetapi menghambat pembentukan akar, sedangkan nisbah sitokinin/auksin yang rendah mendorong pembentukan akar tetapi menghambat pembentukan tunas.

Hasil temuan lainnya adalah bahwa konsentrasi yang seimbang antara auksin dan sitokinin dapat menyebabkan pembentukan kalus (Skoog & Miller, 1957). Temuan itu monumental dan dikenal sebagai teori klasik mengenai pengaturan oleh auksin dan sitokinin pada perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan. Kelompok peneliti yang sama secara konsisten meneliti kultur jaringan tanaman, dan pada tahun 1962 Toshio Murashige and Folke Skoog mempublikasikan formulasi media MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang dewasa ini digunakan pada kultur jaringan hampir semua tanaman.

Pola regenerasi pada perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan

Perbanyakan *in vitro* tanaman atau perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan merupakan aplikasi kultur jaringan dengan cara mengkulturkan bagian tanaman sehingga berkembangbiak dengan cepat menjadi populasi besar tanaman yang secara genetik sama dan sama dengan induknya (*true-to-type*). Pola regenerasi dari bagian tanaman yang dikulturkan itu ada 4 pola, yaitu: (1) perbanyakan tunas samping, lalu dilanjutkan dengan pengakaran masing-masing tunas, (2) kultur tunas yang mengandung buku sehingga buku tumbuh menjadi tunas yang mengandung lebih banyak buku, begitu seterusnya, (3) perbanyakan tunas adventif, kemudian masing-masing tunas diakarkan, dan (4) perbanyakan embrio somatik dan masing-masing embrio somatik lalu dikecambahkan (Kane, 2000). Pola 1 dan 2 dikenal sebagai pola perbanyakan atau regenerasi yang berawal dari meristem yang sebelumnya memang sudah ada. Sedangkan pola 3 dan 4 berawal dari eksplan yang tidak bermeristem, sehingga struktur yang terbentuk yaitu tunas (suatu organ) dan embrio adalah

bentukan baru (*de novo synthesis*). Masing-masing pola itu disebut organogenesis untuk proses pembentukan organ (pola 3) dan embriogenesis somatik untuk proses pembentukan embrio somatik (pola 4). Organogenesis dapat berupa pembentukan tunas (*caulogenesis*) atau akar (*rhizogenesis*) (Gahan & George, 2008). Organogenesis dan embriogenesis, semuanya bisa disebut sebagai morfogenesis atau diferensiasi (Thorpe and Kumar, 1993).

Perbanyak tunas samping dan perbanyak buku

Pola regenerasi ini memanfaatkan mata tunas samping yang memang sudah ada pada eksplan, lalu distimulasi untuk tumbuh dan memperbanyak diri. Metode perbanyak *in vitro* yang memanfaatkan pola ini dianggap sebagai perbanyak *in vitro* terbaik karena kemungkinan terjadinya penyimpangan genetik pada individu-individu hasil perbanyak sangat kecil. Oleh karena itu pola ini banyak digunakan pada perbanyak tanaman *in vitro*. Pada prinsipnya, eksplan dapat berupa ujung tunas atau potongan batang berbuku (*nodal explants*). Lalu eksplan dikulturkan pada media yang mengandung sitokinin sehingga mata tunas terstimulasi untuk pecah dan menghasilkan tunas samping majemuk atau satu tunas samping yang tidak bercabang. Masing-masing tunas atau buku dapat disubkultur beberapa kali pada media baru yang mengandung sitokinin agar dihasilkan tunas lebih banyak. Lalu masing-masing tunas diakarkan dan planlet (tanaman kecil) yang dihasilkan siap untuk diaklimatisasi. Contoh pembentukan tunas samping majemuk (pada kultur tanaman pisang) dan tunas-tunas yang tidak bercabang (pada kultur tanaman jati) dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Pada kasus ketika pada dasar tunas majemuk terbentuk kalus, kadang-kadang mata-mata tunas adventif juga terbentuk.



Gambar 2.1. Kultur tunas majemuk pada tanaman pisang (a) dan kultur tunas-tunas tidak bercabang pada tanaman jati (b).

Jadi, tunas majemuk yang terbentuk merupakan campuran antara tunas-tunas samping dan tunas-tunas adventif. Fenomena ini tampaknya terjadi pada tanaman nanas yang kami kulturkan. Meskipun tujuan kultur tanaman nanas adalah untuk memperbanyak tunas samping pada eksplan ujung mahkota, beberapa subkultur pada media yang mengandung sitokinin menyebabkan terbentuknya kalus pada dasar tunas majemuk. Dari kalus itu lalu muncul tunas-tunas adventif. Oleh karena itu tunas majemuk yang muncul merupakan campuran antara tunas samping dan tunas adventif (Gambar 2.2)



Gambar 2.2. Tunas majemuk pada kultur jaringan tanaman nanas (kiri). Tunas majemuk yang terbentuk kemungkinan tidak hanya terdiri atas tunas-tunas aksilar, tetapi sudah tercampur dengan tunas-tunas adventif jika pada dasar tunas majemuk terbentuk kalus; dari kalus lalu muncul tunas adventif (kanan, tanda anak panah).

Morfogenesis sebagai proses perkembangan

Organogenesis dan embriogenesis somatik dapat terjadi melalui dua jalur yang berbeda, yaitu terjadi secara langsung dan yang terjadi secara tidak langsung yaitu melalui pembentukan kalus (Hicks, 1980; Williams dan Maheswaran, 1986). Pada level sel, organogenesis (baik pembentukan organ maupun embrio) yang terjadi secara *in vitro* dapat dilihat sebagai proses perkembangan (Christianson dan Warnick, 1985; Hicks, 1994) yang terdiri dari 3 fase, yaitu:

1. Dediferensiasi sel-sel pada eksplan untuk mencapai kondisi kompeten.
2. Induksi, yaitu induksi sel kompeten untuk mengalami determinasi.

3. Diferensiasi menjadi organ atau disebut juga fase ekspresi, yaitu bahwa sel-sel yang sudah mengalami determinasi mengalami diferensiasi menjadi organ.

Fase *pertama* adalah dediferensiasi. Jika kita membicarakan sel yang mengalami dediferensiasi berarti kita membicarakan sel yang awalnya berada dalam kondisi terdiferensiasi. Dalam bahasa Inggris sel-sel yang terdiferensiasi disebut *differentiated cells*, kadang-kadang disebut *specialized cells*. Pada organ daun, sel-sel seperti itu misalnya adalah sel palisade, sel bunga karang, atau sel epidermis daun. Sel-sel tersebut sudah dalam kondisi terdiferensiasi. Dengan perkataan lain, sel-sel seperti itu sudah jelas 'nasib'-nya, yaitu sebagai sel palisade, bunga karang, dan sel epidermis daun. Ketika mengalami dediferensiasi, sel-sel itu kembali pada kondisi ketika belum mengalami diferensiasi. Sel yang sudah mengalami dediferensiasi dikatakan kembali pada kondisi 'belum akan menjadi apa-apa'. Sel-sel seperti itu belum mempunyai komitmen untuk menjadi sel tertentu. Bisa juga dikatakan, sel-sel seperti itu bisa menjadi jenis sel apapun. Proses dediferensiasi ini, bisa melalui pembentukan kalus atau tidak

Ketika sudah mengalami dediferensiasi, maka dalam kondisi itu sel dapat memiliki kemampuan untuk merespons stimulus morfogenik tertentu. Stimulus itu dapat berupa zat pengatur tumbuh dalam media atau kondisi kultur. Jika suatu sel sudah mempunyai kemampuan untuk merespons stimulus morfogenik tertentu, maka dikatakan sel itu berada dalam kondisi kompeten. Hicks (1994) menyebut sel seperti itu sebagai sel yang mampu mengenali sinyal hormonal maupun sinyal lain, untuk kemudian meresponsnya dalam bentuk perubahan menuju pola perkembangan tertentu. Namun

demikian kondisi kompeten hanya menggambarkan kemampuan, bukan realisasi dari kemampuan itu. Fase dediferensiasi dari suatu sel dikatakan berakhir ketika sel itu menjadi kompeten.

Fase kedua adalah induksi. Ketika sel yang kompeten itu merealisasikan kemampuannya dengan merespons sinyal hormonal atau sinyal lain yang tersedia, maka sel yang kompeten itu mengalami fase induksi untuk menjadi terdeterminasi, menuju pola perkembangan tertentu. Jadi fase induksi menghasilkan populasi sel yang terdeterminasi, yaitu sel dengan nasib yang sudah pasti akan menjadi apa, yaitu sudah pasti arah perkembangannya. Determinasi dapat terjadi pada individu sel atau kumpulan sel, yang berada dalam status kompeten, untuk secara tidak dapat balik mengarah menuju pola perkembangan tertentu, berupa organogenesis atau embriogenesis. Begitu sel atau kumpulan sel sudah mengalami determinasi, maka kondisi ini akan tetap bertahan meskipun sinyal induksi untuk terdeterminasi sudah tidak ada lagi (Christianson, 1987). Ketika sel sudah mengalami determinasi, maka fase induksi dikatakan sudah berakhir.

Fase *ketiga* adalah *fase diferensiasi*, atau disebut juga *fase ekspresi*. Pada fase ini sel-sel sudah mengalami determinasi untuk menjadi suatu struktur morfologi, misalnya menjadi suatu organ (pada organogenesis) atau embrio (pada embriogenesis). Pada organogenesis, pada akhir fase ini dihasilkan primordia organ. Pada inisiasi primordia organ, dengan cepat sel berubah arah perkembangannya menuju ke keadaan polar, lalu polaritas itu secara perlahan-lahan berlangsung sampai terjadi keadaan organisasi sel yang simetri secara radial, lalu sel tumbuh sepanjang poros radial itu untuk membentuk organ (McDaniel, 1984).

Salah satu contoh proses organogenesis terjadi pada kultur potongan daun *Sansevieria trifasciata* 'Lorentii' (Gambar 2.3a) pada media MS yang mengandung 0,3 mg/l 2,4-D selama 2 minggu, lalu disubkultur ke media tanpa ZPT selama 2 minggu, lalu dipindahkan ke media MS + 2 mg/l BA. Terjadinya dediferensiasi dapat diamati dengan terbentuknya kalus pada bekas potongan setelah eksplan dikulturkan selama 2 minggu pada media penginduksi kalus yang mengandung 2,4-D dan dilanjutkan pada media tanpa ZPT selama 2 minggu (Gambar 2.3b). Selanjutnya terjadi inisiasi tunas adventif pada kalus setelah eksplan disubkultur pada media yang mengandung BA (Gambar 2.3c) (Yusnita dan Hapsoro, 2011a).



Gambar 2.3. Organogenesis pada eksplan kultur potongan daun *Sansevieria trifasciata* 'Lorentii'(a). Dediferensiasi terjadi dengan terbentuknya kalus pada bekas potongan (b). Setelah kalus dipindahkan ke media yang mengandung BA, terjadi pembentukan tunas (c).

Pembentukan embrio somatik

Struktur embrio somatik adalah bipolar (dua kutub), yaitu mempunyai kutub akar dan kutub tajuk dan tidak memiliki jaringan pembuluh yang secara struktural terhubung dengan jaringan induknya, sedangkan tunas adventif tidak bipolar, tetapi hanya mempunyai satu kutub yaitu kutub tajuk

saja dan mempunyai jaringan pembuluh yang terhubung dengan jaringan induknya (George, 1993). Diferensiasi embrio somatik dari eksplan dapat terjadi secara langsung, yaitu tanpa diperantarai terbentuknya kalus, atau secara tidak langsung, yaitu melalui pembentukan kalus terlebih dahulu. Yang sering terjadi adalah bahwa embrio somatik terbentuk pada permukaan kalus dan dengan mudah dapat dipisahkan dari sel-sel di sekelilingnya. Pada umumnya para pakar kultur jaringan menerima pendapat bahwa embrio somatik berasal dari satu sel dan tidak berhubungan langsung secara struktural dengan jaringan induknya (Haccius, 1978; Gray, 2000). Namun demikian, ada laporan penelitian yang menunjukkan bahwa embrio somatik dapat berasal dari sekumpulan sel. Dengan perkataan lain, asal embrio dapat bersifat multiseluler. Dari hasil penelitian mereka, Williams and Maheswaran (1986) menyimpulkan bahwa embrio somatik pada kultur tanaman *Trifolium repens* sebagian besar berasal dari sekumpulan sel, bukan dari satu sel. Hal ini dapat terjadi mungkin karena sekelompok sel yang berdekatan berada pada fase induksi embriogenesis yang sama. Indikasi bahwa embrio somatik berasal dari sekumpulan sel adalah suspensor yang lebar pada embrio somatik.

Kalus yang diinduksi dari eksplan dapat bersifat embriogenik atau non-embriogenik. Kalus embriogenik tampak seperti nodul-nodul, sedangkan non-embriogenik tidak. Pada kelapa sawit, kalus primer yang non-embriogenik dapat diinduksi menjadi embriogenik dengan cara subkultur ke media yang cocok sampai akhirnya kalus tersebut mampu membentuk embrio somatik (Yusnita dan Hapsoro, 2011b).

Banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa ada kemiripan struktur antara embrio somatik dan embrio zigotik

(Gahan & George, 2008). Perkembangan embrio somatik dapat dibagi menjadi beberapa tahap. Beberapa tahap perkembangan yang terjadi pada tanaman dikotil berbeda dengan yang terjadi pada tanaman monokotil. Perkembangan embrio somatik pada tanaman dikotil terdiri atas beberapa tahap, yang dimulai dengan terbentuknya sekelompok kecil sel-sel meristematik yang disebut pro-embrio yang kelak membentuk embrio somatik. *Tahap pertama* adalah tahap globular. Pada tahap ini kelompok yang lebih besar dari sel membentuk suatu struktur kecil berbentuk bulat (*globe*) pada permukaan kalus atau pada jaringan terdediferensiasi pada eksplan. *Tahap kedua* adalah tahap hati, karena bentuk somatik embrio mirip dengan hati. Embrio lalu berkembang lebih lanjut menuju *tahap ketiga* yaitu tahap torpedo, yang merupakan pertumbuhan memanjang dari embrio pada tahap hati. *Tahap keempat* adalah tahap kotiledon. Pada tahap ini terlihat primordia tajuk dan tampak sepasang kotiledon. Contoh perkembangan embrio somatik pada kacang tanah (tanaman dikotil) yang memperlihatkan tahap globular sampai tahap hati dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Embrio somatik pada kacang tanah pada beberapa tahap perkembangan.

Perkembangan embrio somatik tanaman monokotil sedikit berbeda dengan tanaman dikotil. Perkembangannya dimulai dengan pembentukan suatu struktur yang tampak seperti pro-embrio lalu tampak berkembang seperti menuju tahap globular, selanjutnya segera membentuk suatu struktur mirip skutelum dengan *notch* pada pusat bagian ujungnya dan koleoptilnya. Tahap ini bisa disamakan dengan tahap hati pada embriogenesis somatik pada tanaman dikotil. Pada tahap yang lebih lanjut akan tampak struktur yang lebih jelas berupa koleoptil dan skutelum yang lebih besar. Kadang-kadang muncul daun yang memanjang. Seringkali beragam tahapan dari embriogenesis somatik dapat dijumpai pada *clump* kalus embriogenik yang sama, sebagaimana dijumpai pada tanaman tebu (Gambar 2.5).



Gambar 2.5. Beragam tahapan embriogenesis somatik pada tanaman tebu, yang menunjukkan tahap globular (g), *scutellar* (s), koleoptil (c) dan daun (l).

Tahapan perbanyakan *in vitro*

Profesor Toshio Murashige dari The University of California Riverside membagi perbanyakan *in vitro* menjadi tiga tahap, yaitu Tahap I: pemantapan eksplan, Tahap II: multiplikasi, dan Tahap III: pre-transplanting (Murashige, 1974). Kemudian Debergh and Maene (1981) mengusulkan adanya Tahap 0 sebagai tahap persiapan eksplan dan Tahap IV sebagai tahap aklimatisasi planlet ke kondisi lingkungan eksternal. Dewasa ini banyak literatur membagi perbanyakan *in vitro* menjadi lima tahap, yaitu Tahap 0: pemilihan tanaman induk sebagai sumber eksplan dan perlakuannya, Tahap I: pemantapan kultur, Tahap II: multiplikasi propagul, Tahap III: pemanjangan tunas, pengakaran, dan penguatan planlet, dan Tahap IV: aklimatisasi planlet ke kondisi eksternal atau kondisi *ex vitro*.

Tahap 0. Tujuan dari tahap ini adalah untuk menyeleksi dan memelihara tanaman induk (tanaman donor) yang sehat sebagai sumber eksplan yang secara genetik terpilih. Harus dipastikan bahwa tanaman donor betul-betul mempunyai karakter agronomi yang diinginkan yang akan diperbanyak menjadi ratusan, ribuan, atau bahkan lebih regeneran yang seragam dan sama secara genetik dengan induknya. Tanaman donor ini misalnya adalah suatu kultivar atau klon yang unggul. Kesalahan dalam memilih tanaman donor dapat mengakibatkan kerugian yang besar.

Untuk mendapatkan eksplan yang aseptik dan responsif, eksplan harus diambil dari bagian tanaman yang muda dan sehat. Kualitas eksplan dan tanggapnya *in vitro* tergantung dari kondisi fisiologi dan kesehatan tanaman donor (Debergh and Maene, 1981). Oleh karena itu, selain pemilihan tanaman donor, pemeliharannya pada kondisi yang bersih dan terkontrol

menentukan keberhasilan perbanyakan *in vitro*. Seringkali tanaman donor perlu diperlakukan dengan pemangkasan, pemupukan, dan penyemprotan dengan pestisida, serta penyemprotan dengan zat pengatur tumbuh untuk merangsang pertumbuhan tunas-tunas baru yang muda dan sehat. Jika diperlukan, tanaman donor dipelihara di dalam *screenhouse* dalam kondisi kelembaban rendah untuk mencegah penyebaran penyakit oleh aphid dan serangga lain. Harus dilakukan pengujian kemungkinan keberadaan penyakit pada tanaman donor sebelum diperbanyak. Tunas-tunas muda yang baru muncul dan bebas dari hama dan penyakit dapat digunakan sebagai eksplan.

Tahap I. Tahap pertama perbanyakan *in vitro* adalah pematapan kultur. Pada tahap in eksplan disterilisasi, lalu dikulturkan pada media aseptik, dan menunjukkan pertumbuhan awal yang baik. Tahap ini dikatakan berhasil jika eksplan dalam jumlah cukup telah terbebas dari kontaminasi mikroba dan menunjukkan pertumbuhan awal. Pemilihan eksplan dan prosedur sterilisasinya sangat menentukan keberhasilan pada Tahap I ini.

Sudah jamak diketahui bahwa permukaan tanaman merupakan habitat bagi mikroorganisme, misalnya bakteri, fungi, mikoplasma, dan spiroplasma (Bove, 1988). Jasad renik ini dapat menempati permukaan tanaman atau secara sistemik menghuni jaringan tanaman (Cassels, 1994). Pembebasan mikroorganisme-mikroorganisme yang menempati permukaan eksplan membutuhkan prosedur sterilisasi permukaan yang meliputi pencucian dengan air secara seksama, perlakuan dengan larutan antiseptik, lalu diikuti dengan pembilasan dengan air steril.

Masalah yang umum dijumpai pada Tahap I ini adalah kontaminasi oleh mikroorganisme dan pencoklatan dan penghitaman jaringan dan media yang disebabkan oleh oksidasi senyawa polifenol. Media yang digunakan pada kultur jaringan juga sangat mendukung kehidupan mikroorganisme. Begitu kontaminasi terjadi maka kemungkinan besar bakteri, fungi, atau jasad renik lainnya tumbuh sangat cepat sehingga mengalahkan pertumbuhan eksplan dan menekan laju multiplikasi propagul. Bisa terjadi, ketika eksplan tampak sehat dan sudah terbebas dari kontaminasi permukaan, mungkin eksplan itu secara internal mengandung inokulum mikroba. Oleh karena itu, sebelum digunakan pada Tahap II, kultur pada Tahap I sebaiknya diindeks untuk menguji apakah mengandung inokulum mikroba atau tidak.

Pencoklatan dan penghitaman eksplan dan media kultur sering merupakan problem yang serius, yang dijumpai pada Tahap I. Pencoklatan dan penghitaman itu disebabkan oleh keluarnya senyawa polifenol dari eksplan yang terluka dan terjadinya pengaktifan enzim polifenol oksidase. Proses oksidasi senyawa polifenol menghasilkan produk reaksi yang toksik yang menyebabkan eksplan dan media menjadi hitam dan coklat yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan dan bahkan dapat menyebabkan kematian eksplan. Pencoklatan dan penghitaman jaringan dapat diatasi dengan merendam eksplan dalam larutan antioksidan (misalnya asam sitrat, asam askorbat) atau dengan penambahan polivinilpirolidon (PVP) ke dalam media kultur. Penambahan arang aktif dalam media atau penempatan kultur dalam ruang gelap juga sering dilakukan untuk mengatasi pencoklatan dan penghitaman.

Tahap II. Setelah pemantapan kultur pada Tahap I berhasil dicapai, maka bahan tanaman dari Tahap I selanjutnya

digunakan pada Tahap II untuk mendapatkan jumlah propagul dalam jumlah yang dianggap memadai. Perbanyak propagul dapat dilakukan melalui jalur perbanyak tunas samping, perbanyak tunas adventif, atau perbanyak somatik embrio. Yang dimaksud dengan propagul adalah bahan tanaman pada tahap II yang dapat mengalami perbanyak (multiplikasi), misalnya tunas atau mata tunas baik yang adventif maupun yang tidak adventif dan embrio somatik atau kalus embriogenik.

Keberhasilan perbanyak propagul sangat tergantung pada ZPT yang digunakan, yang cocok dengan jalur perbanyak yang digunakan. Sitokinin biasanya merupakan ZPT yang esensial untuk perbanyak tunas samping dan perbanyak tunas adventif. Sejak hasil penelitian Skoog dan Miller (1957) dipublikasikan, sudah jamak diterima di kalangan peneliti kultur jaringan bahwa rasio tinggi sitokinin/auksin merangsang pembentukan tunas. Benziladenin, kinetin (*furfuryl aminopurine*), 2,iP (*isopentenyl adenine*) dan thidiazuron (TDZ) merupakan sitokinin yang sering digunakan untuk multiplikasi propagul melalui perbanyak tunas samping dan perbanyak tunas adventif. Pada umumnya semakin tinggi konsentrasi sitokinin yang digunakan semakin banyak tunas atau mata tunas dihasilkan (Yusnita, *et al.* 1990; Hapsoro dan Yusnita, 1997; Hapsoro *et al.*, 2012; Hapsoro *et al.*, 2015).

Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan untuk induksi embrio somatik dan proliferasinya adalah auksin atau campuran antara auksin dan sitokinin. Auksin yang paling sering digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik adalah 2,4-D (*2,4-dichlorophenoxy acetic acid*), pikloram (4-amino-3,4,6-trichloropicolinic acid), dikamba (*3,6-dichloro-2-*

methoxybenzoic acid), NAA (*naphthaleneacetic acid*), dan IBA (*indolebutyric acid*) (Beyl, 2000; Rival and Parveez, 2005).

Sejumlah propagul yang dihasilkan pada awal Tahap II dapat digunakan sebagai eksplan atau disubkultur untuk siklus perbanyakan selanjutnya sampai diperoleh jumlah tunas atau embrio somatik yang dikehendaki. Selanjutnya tunas bisa dipanjangkan dan embrio bisa dikecambahkan pada Tahap III.

Yang harus diperhatikan pada Tahap II adalah jalur regenerasi tunas yang digunakan, jumlah subkultur, dan nisbah perbanyakannya. Secara umum, perbanyakan mata tunas atau tunas yang sebelumnya sudah ada berpeluang paling kecil mengakibatkan penyimpangan genetik pada populasi planlet hasil perbanyakan, kemudian diikuti embriogenesis somatik langsung. Sedangkan embriogenesis somatik dan organogenesis yang didahului dengan pembentukan kalus (embriogenesis somatik dan organogenesis tidak langsung) berpeluang lebih besar untuk mengakibatkan penyimpangan genetik pada populasi planlet yang dihasilkan. Subkultur adalah membagi propagul (tunas masjemuk, *clumps* embrio somatik atau kalus embriogenik) menjadi bagian yang lebih kecil lalu mentransfernya ke media baru untuk diperbanyak lagi. Bergantung pada kecepatan perbanyakan propagul, subkultur biasanya dilakukan setiap 2-8 minggu. Banyaknya subkultur pada Tahap II mempengaruhi kemampuan propagul untuk memperbanyak diri dan mempengaruhi kualitasnya. Pada umumnya, semakin banyak subkultur maka semakin besar kemampuan propagul untuk memperbanyak diri. Dengan perkataan lain, semakin banyak subkultur maka semakin besar nisbah perbanyakannya (Yusnita, 1990; Hapsoro *et al.*, 2006) (Nisbah perbanyakan adalah rata-rata jumlah propagul yang dihasilkan tiap subkultur). Namun demikian, semakin besar

nisbah perbanyakkan semakin besar peluang terjadinya penyimpangan genetik pada populasi planlet yang dihasilkan (Hartmann, *et al.* 2011). Pada perbanyakkan *in vitro* tanaman nanas Smooth Cayenne misalnya, semakin banyak subkultur semakin besar persen mutasi yang terjadi, yaitu berupa pemunculan duri pada daun (Hapsoro *et al.*, 2006).

Tahap III. Pada tahap ini propagul dipersiapkan agar siap untuk aklimatisasi ke kondisi luar atau kondisi *ex vitro*. Jika dibutuhkan, masing-masing tunas dipanjangkan agar ukurannya memadai untuk diakarkan, selanjutnya pengakaran dilakukan pada tahap berikutnya. Debergh dan Maene (1981) membagi Tahap III menjadi Tahap IIIa (pemanjangan tunas), dan Tahap IIIb (pengakaran tunas). Kadang-kadang tunas-tunas yang tidak berakar diambil dari kondisi *in vitro* dan diakarkan di luar wadah kultur untuk mengurangi biaya (George & Debergh, 2008; Hartmann *et al.*, 2011). ZPT yang sering digunakan untuk merangsang pengakaran adalah IBA atau NAA. Kadang-kadang *in vitro hardening* dibutuhkan untuk meningkatkan daya hidup planlet ketika diaklimatisasi. *In vitro hardening* dapat dilakukan dengan meletakkan kultur di bawah cahaya matahari redup pada temperatur kamar selama beberapa hari.

Tahap IV. Aklimatisasi planlet. Perbanyakkan *in vitro* dikatakan berhasil jika planlet dalam jumlah memadai mampu bertahan hidup menghadapi aklimatisasi dan kemudian mampu tumbuh dengan baik di luar wadah kultur. Tujuan dari Tahap IV adalah untuk mentransfer planlet yang dihasilkan pada tahap sebelumnya ke kondisi rumah kaca dan kondisi lapang. Aklimatisasi sangat penting untuk daya hidup planlet sebab kondisi *in vitro* mempunyai kelembaban relatif yang hampir 100% dan intensitas cahaya rendah (1000-4000 lux), sementara

itu kondisi rumah kaca dan kondisi lapang memiliki kelembaban relatif 40-50% dan intensitas cahaya tinggi (lebih dari 10.000 lux). Planlet yang ditumbuhkan dalam waktu lama *in vitro* biasanya mempunyai lapisan lilin epikutikular yang tipis (Sutter and Langhans, 1982) dan stomata yang abnormal (Lee, *et al.*, 1988; Capellades *et al.*, 1990) dibandingkan dengan tanaman yang tumbuh di rumah kaca atau kondisi lapang. Oleh karena itu, ketika dipindahkan ke kondisi dengan kelembaban relatif rendah dan intensitas cahaya tinggi, planlet seperti itu cepat mengalami kehilangan air. Lagi pula, oleh karena planlet yang tumbuh *in vitro* disuplai dengan sukrosa sebagai sumber karbon, maka planlet yang tumbuh *in vitro* cenderung bersifat heterotrofik daripada autotrofik. Jika aklimatisasi tidak dilakukan secara hati-hati, maka daya hidup planlet bisa rendah sehingga mengakibatkan kerugian besar.

Aklimatisasi dilakukan dengan mengeluarkan planlet dari wadah kultur lalu membersihkan perakaran dari agar yang menempel. Mula-mula, planlet ditanam dalam pot yang berisi media campuran pasir dan kompos (1:1) atau pasir, kompos, dan arang sekam (1:1:1) dalam kondisi kelembaban relatif yang tinggi dan intensitas cahaya yang rendah. Selanjutnya sedikit demi sedikit kelembaban relatifnya diturunkan dan intensitas cahayanya dinaikkan. Setelah 4-6 minggu, akar dan tunas baru terbentuk dan planlet menjadi fotoautotrofik atau sudah mampu berfotosintesis secara aktif. Akan tetapi, agar mampu hidup dalam kondisi lapang, planlet harus diaklimatisasi lebih lanjut selama beberapa minggu sehingga planlet mampu tumbuh dengan baik pada kondisi cahaya matahari penuh.

3

Fasilitas dan Peralatan Laboratorium

Pekerjaan kultur jaringan tanaman membutuhkan kondisi lingkungan kultur yang aseptik dan terkontrol. Kondisi ini bisa dipenuhi oleh sebuah laboratorium yang diperlengkapi dengan fasilitas dan peralatan khusus. Bangunan laboratorium sebaiknya terletak pada daerah yang bersih, yang jauh dari debu, polutan, kontaminan kimia dan mikroba, dan tidak dilewati oleh hembusan angin yang keras. Berapapun propagul yang dihasilkan dan apapun tujuan kultur jaringan yang dilakukan, laboratorium kultur jaringan harus mampu mengakomodasi aktivitas berikut ini:

1. Pencucian dan pembersihan
2. Pembuatan media kultur
3. Penanganan pertama eksplan
4. Penyimpanan zat kimia dan alat-alat gelas
5. Pekerjaan aseptik
6. Inkubasi kultur
7. Aklimatisasi dan pemeliharaan bibit tanaman
8. Administrasi

Laboratorium kultur jaringan harus didukung oleh sarana dan prasarana yang menjamin tersedianya listrik yang stabil, gas, dan air dalam kuantitas yang memadai. Air dengan kualitas baik dan tersedia secara kontinyu sangat esensial bagi laboratorium kultur jaringan. Dari pipa air utama, air dapat disalurkan ke tempat pencucian (*sink*), peralatan pemurnian air, toilet, dan rumah kaca. Fasilitas penting lainnya adalah sistem transportasi dan komunikasi yang baik dan dapat diandalkan. Tergantung besarnya laboratorium, setiap aktivitas dapat dilakukan pada ruang tersendiri. Atau, dua atau lebih aktivitas dilakukan dalam ruang yang sama yang relatif besar. Laboratorium kultur jaringan komersial atau laboratorium riset dan laboratorium pendidikan yang baik pada umumnya menyediakan ruangan tersendiri untuk masing-masing kegiatan pembersihan dan pencucian, pembuatan media, penanganan eksplan dan isolasinya, inkubasi kultur, dan pekerjaan aseptik untuk penanaman dan subkultur yang terpisah dari aktivitas lain agar kontaminasi kultur seminim mungkin.

Desain sejumlah laboratorium yang berukuran sedang sudah dibahas oleh George (1993). Ruang-ruang harus diatur sedemikian rupa agar ruang-ruang yang terletak lebih dekat ke lingkungan luar misalnya kantor, ruang pembersihan, penanganan pertama eksplan, adalah lebih kotor daripada ruang-ruang yang terletak lebih ke dalam seperti ruang pembuatan media dan sterilisasi, ruang simpan, ruang untuk pekerjaan aseptik, dan ruang kultur. Idealnya, terdapat sebuah ruangan sebelum ke pintu masuk laboratorium yang merupakan tempat *screening* bagi orang yang masuk laboratorium. Pekerja laboratorium atau tamu harus mengikuti prosedur tertentu misalnya harus memakai jas lab, alas kaki

khusus, dan masker. Frekuensi orang keluar-masuk ruang bersih seperti ruang kultur dan ruang transfer harus seminimal mungkin. Atau, yang boleh keluar-masuk ruangan itu dibatasi hanya untuk orang-orang tertentu yang mempunyai otoritas, misalnya peneliti, teknisi dan kepala lab. Untuk mencegah kontaminasi dari ruang yang lebih kotor ke ruang yang lebih bersih, maka biasanya kedua ruang itu dihubungkan dengan dua pintu yang antarkeduanya terdapat sebuah ruang kecil. Pada waktu orang keluar dari atau masuk ke ruang bersih, maka ketika pintu pertama terbuka maka pintu kedua masih tertutup. Ketika pintu kedua terbuka maka pintu pertama tertutup. Kedua pintu itu tidak pernah terbuka dalam waktu bersamaan yang memungkinkan terjadinya aliran udara dari kedua ruang itu. Pintu dan ruang antarmeja harus cukup lebar sehingga bisa dengan leluasa dilewati oleh troli atau kereta untuk membawa kultur, media, peralatan tanam, atau alat-alat gelas.

Ruang pembersihan dan penanganan pertama eksplan

Ruang pembersihan sebaiknya terletak di dekat autoklaf karena wadah kultur yang berisi kontaminan harus disterilisasi sebelum dibuang atau dicuci kembali. Setidaknya di ruang itu harus tersedia satu *sink* yang besar atau ember besar yang disuplai dengan air panas dan air bersuhu kamar. Sebaiknya alat-alat gelas tidak dibiarkan kering setelah dipakai, tetapi segera direndam dalam larutan detergen, lalu dicuci, lalu dibilas dengan air bersih. Alat-alat gelas yang sangat kotor sebaiknya direndam dalam larutan bikromat sebelum dicuci dan dibilas. Alat-alat gelas yang sudah bersih sebaiknya dibilas dengan air bebas ion, lalu ditiriskan. Sebelum digunakan, wadah-wadah atau botol-botol kultur dikeringkan, diautoklaf, lalu disimpan di

lemari tertutup. Kegiatan pembersihan dan kegiatan penanganan pertama eksplan seringkali dilakukan dalam satu ruangan. Dalam kondisi seperti itu maka dibutuhkan meja kerja dan sink khusus untuk penanganan pertama eksplan sebelum disterilisasi.

Pembuatan media

Ruang ini seperti dapur di rumah kita, kecuali bahwa harus ada peralatan tertentu untuk bekerjanya laboratorium kultur jaringan (Tabel 3.1), yang memungkinkan kita dapat membuat larutan zat kimia seperti larutan stok hara makro dan mikro, zat pengatur tumbuh, dan larutan media dengan komponen yang tertakar dengan tepat. Larutan media harus dibuat sesuai dengan formulasi khusus tertentu, pH ditetapkan, lalu larutan dipanaskan dengan agen pemadat media, dituangkan ke wadah kultur, kemudian disterilisasi dengan autoklaf. Oleh karena itu sebaiknya tersedia cukup meja untuk membuat larutan dan menuangkan larutan ke wadah-wadah kultur dan cukup ruang untuk menghantarkannya ke autoklaf dan ke tempat penyimpanan media setelah sterilisasi. Gambar 3.1 menunjukkan meja kerja dengan wadah kultur yang siap-pakai untuk pembuatan media kultur. Gambar 3.2 menunjukkan sejumlah peralatan yang sangat dibutuhkan pada waktu pembuatan media seperti alat-alat gelas, kereta, timbangan analitik, distilator air, dan autoklaf.

Sejumlah larutan zat kimia misalnya NaOH, KOH, HCl, DMSO, etanol 95% dan 70% dibutuhkan untuk melarutkan zat pengatur tumbuh dan untuk menetapkan pH larutan. Larutan-larutan tersebut harus tersedia di meja laboratorium sehingga selalu siap untuk digunakan. Zat-zat kimia dapat disimpan

dalam ruangan khusus tersendiri, atau cukup dalam almari. Larutan stok disimpan di kulkas (Gambar 3.3). Media kultur yang sudah disterilkan dapat disimpan dalam ruangan khusus tersendiri atau cukup diletakkan di meja laboratorium di ruang persiapan media (Gambar 3.4)

Tabel 3.1. Peralatan yang dibutuhkan di ruang persiapan media

No	Nama Alat
1	Timbangan (ketelitian 2 desimal)
2	Timbangan analitik (ketelitian 4 desimal)
3	Distilator air dan penampung akuades
4	Beragam pipet.
5	Alat-alat gelas: Wadah kultur beragam ukuran dan tutupnya, botol untuk larutan stok, gelas piala beragam ukuran (50, 100, 500, 1000 dan 2000 ml), gelas ukur beragam ukuran (25, 50, 100, 250, 500, 1000 dan 2000 ml), labu takar (100, 250, 500 dan 1000 ml), cawan petri, corong, spatula gelas.
6	pH-meter
7	Hot plate with magnetic stirrers
8	Autoklaf
9	Kompor gas
10	Microwave
11	Kulkas
12	Sink dan rak alat-alat gelas
13	Centrifuge
14	Almari atau rak untuk menyimpan zat kimia
15	Nampan dan kereta pengangkut
6	Tutup dari plastik atau logam
17	Lemari asap
18	Sendok dan spatula anti karat
19	Kertas atau plastik timbang
20	Desikator yang terhubung dengan pompa vakum



Gambar 3.1. Meja kerja dengan botol-botol kultur yang siap dipakai untuk pembuatan media kultur.



Gambar 3.2. Beberapa peralatan yang dibutuhkan di ruang persiapan media: kereta dengan akuades steril, alat-alat gelas dan alat-alat diseksi, timbangan, distilator air, dan autoklaf.



Gambar 3.3.
Zat-zat kimia disimpan di almari zat dan larutan stok disimpan di kulkas.



Gambar 3.4. Setelah diautoklaf, media kultur dapat diletakkan di atas meja di dalam ruang persiapan media.

Ruangan untuk pekerjaan aseptik

Ruangan ini memfasilitasi pekerjaan aseptik, yaitu sterilisasi eksplan, isolasi eksplan, dan subkultur. Pada awal pemantapan kultur, eksplan disterilisasi, lalu diisolasi dalam ruangan dengan udara steril. Kondisi yang sama dibutuhkan pada waktu propagul ditransfer ke media agar mikroorganisme tidak mengkontaminasi propagul atau masuk ke wadah kultur pada waktu dilakukan transfer. Untuk membuat kondisi steril seperti itu, alat yang paling efektif dan efisien untuk digunakan adalah *laminar-air flow cabinet* (L AFC). Alat ini pada umumnya memiliki dua jenis filter, yaitu filter bagian luar (yang sewaktu-waktu bisa dicuci) dan filter bagian dalam yaitu filter HEPA (*high efficiency particulate air*). Suatu penghembus udara (semacam kipas angin) mengalirkan udara secara horizontal melalui filter HEPA, sehingga udara yang masuk ke ruangan untuk bekerja menjadi steril karena sudah tersaring. Desain L AFC pada umumnya dilengkapi dengan dinding dari kaca yang terletak di atas dan dua sisi sampingnya serta permukaan tempat bekerja yang mudah dibersihkan. L AFC sebaiknya dihidupkan setidaknya 15 menit sebelum digunakan untuk memastikan ruang udara tempat bekerja sudah benar-benar steril. Sebelum digunakan, seluruh permukaan dilap dengan alkohol 70%. Peralatan lain yang dibutuhkan adalah bunsen atau lampu alkohol (bisa juga digunakan spiritus), botol steril yang berisi alkohol 95% untuk merendam alat-alat diseksi, kereta dorong tempat meletakkan dan untuk mengangkut media, kultur, dan alat-alat diseksi seperti skalpel, forsep, serta cawan petri. Gambar 3.5 menunjukkan seorang peneliti pada lab riset universitas yang sedang bekerja secara aseptik dengan L AFC mengkulturkan eksplan daun kelapa sawit.



Gambar 3.5.
*Laminar air
flow cabinet*
(untuk
pekerjaan
aseptik)

Ruang kultur atau ruang inkubasi

Terdapat dua jenis ruang kultur, yaitu ruang kultur gelap dan ruang kultur terang. Keduanya diperlengkapi dengan rak-rak kultur tempat meletakkan kultur. Jika suatu laboratorium hanya memiliki satu ruang kultur, maka kondisi gelap dapat diperoleh dengan menutup rak-rak kultur dengan kain hitam atau plastik polietilen yang tidak tembus cahaya. Rak kultur dalam ruang kultur terang diperlengkapi dengan lampu fluoresens (Gambar 3.6) dengan kuat penerangan 1000-2000 lux. Untuk menetapkan fotoperiodisitas tertentu, digunakan alat timer dengan menghubungkannya ke saklar lampu. Untuk menetapkan suhu ruang kultur, digunakan mesin pendingin udara (*air conditioner*) (24-28 °C). Ruang kultur harus dijaga kebersihannya, selalu kering, dan bebas dari serangga (terutama kutu) untuk menghindari kontaminasi.



Gambar 3.6. Rak-rak kultur dalam ruang kultur yang dilengkapi dengan lampu fluoresens.

4

Media Kultur Jaringan: Formulasi dan Cara Membuatnya

Salah satu penentu keberhasilan pembiakan tanaman dengan kultur jaringan adalah penggunaan media yang tepat untuk setiap tahap. Sebagian besar media kultur jaringan terdiri atas air sebagai pelarut bagi semua komponen media, yaitu hara makro dan mikro esensial, gula sebagai sumber karbon, vitamin-vitamin, asam-asam amino dan sumber nitrogen lainnya, zat pengatur tumbuh, dan kadang-kadang adenda organik seperti air kelapa, homogenat buah pisang, jus buah dan sebagainya. Untuk media cair, maka digunakan sistem penyangga (*support system*) misalnya kertas saring atau perahu polietilen agar eksplan memperoleh oksigen dalam jumlah cukup dalam kondisi eksplan bersentuhan dengan permukaan media. Jika tidak digunakan sistem penyangga seperti itu, maka media cair harus digoyang secara terus-menerus untuk menjamin terjadinya aerasi yang baik. Untuk media semi padat, maka pada umumnya digunakan agar-agar atau gelrite sebagai bahan penggel media (*gelling agents*). Penggunaan media semi-padat memungkinkan eksplan dapat dengan stabil berada di permukaan media dan memperoleh aerasi dengan baik.

Formulasi dan komponen media

Formulasi media yang paling banyak digunakan pada kultur *in vitro* adalah formulasi media Murashige dan Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) yang semula dirancang untuk kultur *in vitro* tanaman tembakau. Dikenal formulasi media lain, misalnya Knudson C (Knudson, 1946) dan Vacin dan Went (1949) yang cocok untuk kultur *in vitro* tanaman anggrek, media Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968) untuk kultur *in vitro* kalus tanaman kedele, media Nitsch dan Nitsch (1969) untuk kultur anter, media Schenk and Hildebrandt (1972) (SH) untuk kultur kalus tanaman monokotil, medium Anderson (1975) untuk kultur tanaman rhododendron, dan media WPM (woody plant medium) (Lloyd and McCown, 1980) untuk kultur *in vitro* tanaman berkayu. Beberapa formulasi media kultur yang sering dipakai dalam kultur *in vitro* tanaman disajikan pada Tabel 4.1.

Air. Air merupakan komponen utama yang berfungsi sebagai pelarut bagi komponen lainnya pada media kultur jaringan. Air berkualitas tinggi seperti air bebas ion, air destilasi, air destilasi ganda, atau air osmosis terbalik banyak digunakan dalam media kultur jaringan. Air kran atau air sumur pada umumnya tidak bisa digunakan sebagai bahan untuk membuat media karena mengandung berbagai macam kation, anion, atau partikel lain.

Hara makro dan mikro. Semua tanaman, termasuk yang dikulturkan secara *in vitro*, membutuhkan unsur-unsur esensial, yang terdiri atas dua kelompok yaitu yang berfungsi sebagai komponen molekul yang menyusun sel tanaman dan yang berfungsi sebagai aktivator enzim.

Table 4.1. Beberapa formulasi media yang digunakan pada kultur *in vitro* tanaman

Nama zat kimia	Rumus kimia	Murashige dan Skoog (1962)	Gamborg B5 (Gamborg <i>et al.</i> 1968)	Schenk & Hildebrandt (1972)	Anderson (1975)	WPM (Lloyd dan McCown, 1980)
		Konsentrasi dalam mg/l dan (mM)				
Hara makro	mg/l					
Amonium nitrat	NH_4NO_3	1650 (20,6)	-		400 (5,0)	400 (5,0)
Amonium sulfat	NH_4SO_4	-	134	-	-	-
Amonium dihidrogen fosfat	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	300	-	-
Potassium nitrate	KNO_3	1900 (18,8)	2500	2500	480	-
Potassium sulfat	K_2SO_4	-	-	-	-	990
Potassium dihidrogen orthofosfat	KH_2PO_4	170 (1,3)	-	-	-	170 (1,3)
Magnesium sulfat hepta hidrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 (1,5)	250	400	370	370 (1,5)
Sodium dihidrogen ortofosfat	NaH_2PO_4	-	130,5	-	-	-
Sodium dihidrogen orthofosfat monohidrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	-	380	-
Kalsium klorida dihidrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	151	440	96
Kalsium nitrat tetra hidrat	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	556

Table 4.1. (Lanjutan)

Nama zat kimia	Rumus kimia	Murashige dan Skoog (1962)	Gamborg B5 (Gamborg <i>et al.</i> 1968)	Schenk & Hildebrandt (1972)	Anderson (1975)	WPM (Lloyd dan McCown, 1980)
		Konsentrasi dalam mg/l dan (mM)				
Hara mikro						
Asam borat	H ₃ BO ₃	6,2	3	5	6,2	6,2
Mangan sulfat monohidrat	MnSO ₄ · H ₂ O	16,9	10	10	16,9	22,3
Seng sulfat tetrahidrat	ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6	2	1	8,6	8,6
Potassium iodida	KI	0,83	0,75	0,1	0,3	-
Sodium molibdat dihidrate	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,1	0,25	0,25
Kupri sulfat pentahidrat	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,025	0,2	0,025	0,25
Kobal klorida heksahidrat	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025	0,1	0,025	-
Besi						
Fero sulfat heptahidrat	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8	27,8	15	55,7	27,8
Disodium EDTA	Na ₂ EDTA	37,3 (100)	37,3	20,1	74,5	37,3
Vitamin dan senyawa organik lain						
Tiamin-HCl	-	0,1	10,0	5	0,4	1
Piridoksin-HCl	-	0,5	0,1	0,5	-	0,5
Asam nikotinat	-	0,5	1	5	-	0,5
Glisin	-	2	-	-	-	2
Myo-inositol	-	100	100	1000	100	100
Sumber karbon						
g/l						
Sukrosa	-	20 – 30	20 – 30	20 – 30	20 – 30	20 – 30

Berdasarkan jumlah yang dibutuhkan tanaman untuk tumbuh dan berkembang, unsur-unsur esensial itu dapat dibagi menjadi unsur makro dan unsur mikro. Unsur makro dibutuhkan dalam jumlah banyak, yaitu 1000 ppm (1000 mg/kg bobot kering jaringan) atau lebih; unsur mikro dibutuhkan dalam jumlah

sedikit, yaitu 100 ppm (100 mg/kg bobot kering jaringan) atau kurang (Hopkins, 2009).

Nitrogen (N), fosfor (P), potassium (K), kalsium (Ca), magnesium (Mg), dan sulfur (S) dikenal sebagai unsur makro. Media Murashige dan Skoog (MS), media Gamborg (B5), dan media Schenk and Hildebrandt (SH) mengandung unsur makro dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan media-media lain. Media MS mengandung 60 mM N, 1,25 mM P, 20,04 mM K, 1,5 mM Mg, 3 mM Ca, dan 1,6 mM S.

Nitrogen ditambahkan dalam media dalam jumlah yang relatif lebih banyak dibandingkan unsur hara lainnya. Nitrogen merupakan salah satu komponen dari banyak senyawa esensial tanaman, yang diantaranya meliputi asam nukleat, protein (termasuk semua enzim) dan klorofil. Nitrogen ditambahkan dalam media dalam bentuk nitrat, bentuk yang sangat teroksidasi, atau amonium, bentuk yang sangat tereduksi. Amina dan amida merupakan bentuk sumber N yang juga sering ditambahkan dalam media. Amonium adalah bentuk yang mudah tersedia bagi metabolisme tanaman tetapi dapat bersifat toksik jika tersedia dalam konsentrasi tinggi. Nitrat sangat penting, sumber nitrogen yang tidak toksik dan ditransport ke seluruh bagian tanaman untuk dimanfaatkan melalui proses asimilasi. Agar segera bisa digunakan dalam metabolisme, nitrat harus diubah menjadi bentuk yang tereduksi yaitu nitrit dengan bantuan enzim nitrat reduktase. Nitrit kemudian direduksi lagi menjadi amonium dengan bantuan enzim nitrit reduktase. Akumulasi nitrit dalam media dapat bersifat toksik. Banyak bukti menunjukkan bahwa keberadaan amonium dan nitrat dalam media, konsentrasi totalnya, dan proporsinya sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan morfogenesis. Penggunaan senyawa sumber

nitrogen, amonium saja atau nitrat saja, pada umumnya tidak dianjurkan. Untuk ulasan mendalam mengenai metabolisme nitrogen dalam kultur jaringan tanaman dapat dibaca pada tulisan George dan de Klerk (2008). Kebanyakan media kultur mengandung 20-50 mM total nitrogen dalam bentuk amonium dan nitrat dengan perbandingan yang beragam. Senyawa sumber nitrogen yang sering digunakan dalam media kultur jaringan adalah ammonium nitrat, ammonium sulfat, ammonium fosfat, potasium nitrat, kalsium nitrat, dan urea.

Asam-asam amino, yang merupakan rangka protein, misalnya glisin, L-alanin, L-arginin, L-asparagin, dan L-glutamin, atau beragam sumber kompleks asam amino seperti kasein hidrolisat, pepton dan tripton juga digunakan sebagai sumber nitrogen tambahan. Nitrogen dalam zat-zat tersebut lebih mudah tersedia.

Fosfor merupakan unsur hara esensial untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman karena unsur ini merupakan komponen banyak makromolekul penting, misalnya asam nukleat, banyak gula fosfat, dan fosfolipid. Gula fosfat merupakan zat antara pada banyak reaksi metabolisme seperti fotosintesis, respirasi, dan sintesis karbohidrat. Fosfolipid merupakan komponen membran plasma. Fosfor juga merupakan komponen dari nukleotida (misalnya ATP) yang digunakan pada metabolisme energi (Taiz dan Zeiger, 2010). Fosfor diserap oleh tanaman terutama dalam bentuk anion ortofosfat monovalen H_2PO_4^- pada sistem yang mempunyai pH kurang dari 7 dan dalam bentuk divalen HPO_4^{2-} pada sistem yang mempunyai pH lebih dari 7. Di dalam tanaman, anion fosfat mudah mengalami redistribusi dari daun tua ke daun yang lebih muda. Banyak jenis media kultur menggunakan potasium fosfat atau sodium fosfat sebagai sumber fosfor

dengan konsentrasi fosfor sekitar 1,7 mM (George dan de Klerk, 2008).

Potassium dalam bentuk K^+ berperan penting sebagai aktivator banyak enzim yang terlibat dalam fotosintesis, respirasi, dan sintesis protein dan karbohidrat. Kation ini juga berperan dalam pengaturan potensial osmotik sel tanaman sehingga menentukan turgor sel dan pembukaan stomata. Pada media kultur, potassium seringkali diberikan dalam bentuk potassium nitrat, potassium klorida, potassium sulfat, dan potassium fosfat. Di dalam tanaman, ion potassium mudah ditransport dari jaringan tua ke jaringan yang lebih muda. Kekurangan potassium dapat menyebabkan hiperhidrisitas (Pasqualetto *et al.*, 1988).

Kalsium (Ca) diambil tanaman dalam bentuk Ca^{2+} dan memegang peran penting dalam pembentukan mikrotubul dan lamela tengah. Oleh karena itu, unsur tersebut sangat esensial untuk pembelahan sel pada zona meristematik, diantaranya ujung tunas dan ujung akar. Ca^{2+} juga dibutuhkan untuk berfungsinya membran. Unsur ini tidak mudah mengalami redistribusi dari jaringan tua ke jaringan yang lebih muda (di floem sangat immobil) sehingga gejala defisiensi sering terdeteksi pada zona meristematik (Hopkins, 2009). Pada kultur tunas atau kultur pucuk (*shoot culture*), kekurangan unsur kalsium berhubungan erat dengan rusaknya ujung tunas. Terjadinya nekrosis ujung tunas dilaporkan terdeteksi pada kultur tunas *Cercis canadensis*, yang terjadi setelah beberapa kali subkultur (Yusnita *et al.*, 1990). Mengikatnya Ca^{2+} pada kalmodulin, sebuah molekul protein kecil yang larut pada sitosol, dapat menyebabkan aktifnya sejumlah enzim, diantaranya enzim-enzim kinase dan fosfatase serta protein-protein yang terlibat dalam penghantaran sinyal (Taiz dan

Zeiger, 2010). Ion kalsium berpengaruh nyata terhadap morfogenesis, karena ion ini dibutuhkan dalam proses respons morfogenik terhadap zat pengatur tumbuh khususnya auksin dan sitokinin (Tanimoto dan Harada, 1986; Capitani dan Altamura, 2004; Jansen *et al.*, 1990). Kalsium ditambahkan dalam media kultur dalam bentuk $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ atau $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan garam-garam sulfat dari Mn, Zn and Cu.

Magnesium diserap tanaman dalam bentuk kation divalen Mg^{2+} . Unsur ini merupakan komponen esensial dari struktur forfirin molekul klorofil. Magnesium juga mengaktifkan banyak enzim yang dibutuhkan dalam transfer fosfat, yang dibutuhkan dalam proses fotosentesis, respirasi dan sintesis asam nukleat (Taiz dan Zeiger, 2010). Oleh karena unsur hara ini bersifat mobil dalam tanaman, magnesium dapat berperan sebagai agen penyeimbang yang menetralkan anion dan asam-asam organik. Unsur hara ini umumnya ditambahkan ke dalam media kultur dalam bentuk $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 1- 3 mM.

Sulfur diserap oleh tanaman dalam bentuk SO_4^{2-} dan diberikan dalam media kultur dalam bentuk $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ juga dalam bentuk garam sulfat dari Zn, Cu dan Mn. Unsur ini adalah komponen dari asam amino sistein dan metionin, yang merupakan komponen dari protein. Kemampuan sulfur membentuk struktur SH, -S-, dan -S-S- berperan penting dalam regulasi beberapa struktur enzim dan aktivitasnya dan juga struktur lipid dan protein (George dan de Klerk, 2008).

Media kultur juga berisi unsur-unsur mikro yang esensial untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Unsur-unsur mikro tersebut adalah besi (Fe), mangan (Mn), boron (B), seng (Zn), tembaga (Cu), dan molibdenum (Mo). Walaupun

tidak selalu dianggap esensial, beberapa unsur mikro seperti kobalt (Co), iodine (I), sodium (Na) dan klorin (Cl) kadang-kadang ditambahkan ke dalam beberapa media kultur. Semua unsur mikro diberikan ke media kultur dalam konsentrasi rendah. Media MS mengandung unsur-unsur mikro 100 μM Fe, 100 μM Mn, 100 μM B, 30 μM Zn, 1 μM Mo dan 0,1 μM Cu.

Besi dalam bentuk tereduksi (Fe^{2+}) dan teroksidasi (Fe^{3+}) merupakan bagian dari protein, yang meliputi enzim-enzim yang berperan penting dalam transport elektron (reaksi oksidasi-reduksi) dalam fotosintesis dan respirasi. Untuk meningkatkan ketersediaan bagi tanaman yang dikulturkan, besi disuplai di media dalam bentuk terkelat, misalnya dengan EDTA.

Mangan dalam bentuk Mn^{2+} dibutuhkan untuk aktivitas beberapa enzim seperti dehidrogenase, dekarboksilase, kinase, oksidase, peroksidase, dan dismutase superoksid. Mn merupakan bagian dari enzim yang terlibat dalam proses pelepasan oksigen dalam proses fotosintesis. Mn^{2+} dengan mudah mengalami oksidasi menjadi Mn^{4+} dan terlibat dalam reaksi redoks dalam fotosintesis. Dalam media kultur Mn diberikan dalam bentuk mangan sulfat monohidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Boron berperan dalam pemanjangan sel, sintesis asam nukleat, dan respons hormonal. Boron juga berperan dalam berfungsinya membran dan pengaturan kekompakan dinding sel. Boron adalah kofaktor beberapa enzim yang terlibat dalam metabolisme asam fenolik dan sintesis lignin. Dalam media kultur, boron diberikan dalam bentuk asam borat (H_3BO_3), suatu bentuk yang diserap oleh tanaman dan bentuk yang tersedia di dalam tanah. Sebagaimana besi dan mangan, media MS mengandung 100 μM boron.

Zn adalah komponen banyak enzim misalnya alkohol dehidrogenase, glutamik dehidrogenase, karbonik anhidrase, superoksid dismutase, dan RNA polimerase. Oleh karena itu Zn berperan penting dalam banyak reaksi metabolisme.

Tembaga tersedia bagi tanaman dalam bentuk tereduksi (Cu^+) atau teroksidasi (Cu^{2+}). Unsur ini merupakan bagian dari beberapa enzim penting, yang kebanyakan mengikat atau bereaksi dengan oksigen. Enzim penting itu diantaranya adalah sistem enzim sitokrom oksidase, yang berperan penting dalam proses respirasi. Cu^{2+} juga berfungsi sebagai aktivator banyak enzim lain yang terlibat dalam transport elektron (George dan de Klerk, 2008).

Molibdenum diserap tanaman dalam bentuk anion molibdat (MoO_4^{2-}) dan ditambahkan dalam media kultur dalam bentuk sodium molibdat. Unsur ini adalah bagian dari enzim-enzim yang esensial pada metabolisme nitrogen, yaitu nitrogenase dan nitrat reduktase.

Gula dan sumber karbon. Sebagian besar eksplan dan kultur yang ditumbuhkan secara *in vitro* tidak mampu berfotosintesis secara optimum. Kultur membutuhkan karbohidrat sebagai sumber karbon dan sumber energi dengan beberapa alasan sebagai berikut.

- Sebagian besar dari eksplan yang berukuran kecil tidak mempunyai daun atau mempunyai jumlah korofil yang sangat sedikit.
- Intensitas cahaya yang tersedia di dalam ruang kultur sangat rendah.
- Konsentrasi karbon dioksida di dalam wadah kultur sangat rendah. Pertukaran gas juga terbatas.

Penambahan gula sebagai sumber karbon dan sumber energi ke dalam media kultur adalah esensial untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Gula yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah sukrosa, suatu disakarida yang terdiri atas glukosa dan fruktosa. Sukrosa adalah jenis gula yang paling banyak ditransport di dalam tanaman. Konsentrasi sukrosa pada banyak kultur adalah 20 g/l – 40 g/l. Jumlah sukrosa yang diberikan dalam media kultur tergantung dari tipe morfogenesis yang diinginkan. Konsentrasi sukrosa yang dibutuhkan oleh kebanyakan kultur jaringan anggrek adalah 20 g/l, sedangkan yang dibutuhkan oleh kultur perbanyakan tunas aksilar pisang dan embriogenesis kelapa sawit adalah 30-40 g/l. Penggunaan jenis gula yang lain seperti maltosa, laktosa, galaktosa, dan rafinosa dilaporkan menghasilkan pertumbuhan kultur yang lebih lambat daripada penggunaan sukrosa dan glukosa (Thorpe *et al.*, 2008). Di samping sebagai sumber energi, gula juga berfungsi sebagai agen osmotikum dalam media kultur.

Vitamin dan zat-zat adenda. Vitamin-vitamin, khususnya vitamin B seperti tiamin (vitamin B1), piridoksin (vitamin B6), dan asam nikotinat atau niasin (vitamin B3), umumnya ditambahkan ke dalam media kultur dengan konsentrasi of 0,1 – 10 mg/l. Diantara vitamin-vitamin tersebut, tiamin adalah esensial, sedangkan lainnya kadang-kadang dibutuhkan untuk mempercepat pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Vitamin terutama berfungsi sebagai koenzim atau kofaktor enzim yang terlibat dalam banyak metabolisme yang penting seperti biosintesis asam amino dan metabolisme karbohidrat. Vitamin lain seperti biotin (vitamin H), asam folat (vitamin M), asam askorbat (vitamin C), riboflavin (vitamin B2), asam pantotenat (vitamin

B₅), Sianokobalamin (vitamin B₁₂) dan tocopherol (vitamin E) kadang-kadang ditambahkan ke dalam media kultur.

Gula alkohol seperti mio-inositol umumnya ditambahkan ke dalam media kultur dengan konsentrasi 100-1000 mg/l dan dalam pembuatan media biasanya dimasukkan dalam stok vitamin. Tidak sebagaimana gula yang disebutkan sebelumnya, peranan mio-inositol tampaknya tidak sebagai sumber energi. Beyl (2000) mengemukakan bahwa inositol dilaporkan berperan dalam sintesis fosfolipid dan sistem membran pada sel.

Adenda kompleks seperti air kelapa dan homogenat buah pisang sering ditambahkan dalam media pada awal-awal perkembangan kultur jaringan dan sampai sekarang masih digunakan pada kultur jaringan tanaman anggrek. Ekstrak yeast, ekstrak kentang, jus tomat, kecambah kacang hijau juga dapat digunakan sebagai suplemen tambahan untuk memacu pertumbuhan tanaman *in vitro*.

Arang aktif dengan konsentrasi 1-3 g/l dapat ditambahkan ke dalam media kultur untuk Tahap I, II, atau III. Pada Tahap I (pemantapan kultur), arang aktif pada umumnya digunakan untuk menyerap eksudat fenolik yang beracun. Pada Tahap II (perbanyakkan propagul), arang aktif dapat digunakan untuk menyerap zat auksin atau sitokinin yang berlebihan pada jaringan propagul (embrio somatik atau tunas) agar pertumbuhannya normal. Tanpa arang aktif, maka pertumbuhan propagul akan terhambat. Arang aktif juga dilaporkan dapat mendorong embriogenesis mikrospora dengan tingkat keberhasilan yang tinggi dan menginduksi pembentukan sel haploid ganda (Prem *et al.*, 2008). Pada Tahap III, arang aktif sering digunakan untuk memberikan

kondisi gelap pada media dan menyerap zat-zat yang menghambat pengakaran untuk mendorong pengakaran tunas.

Hormon dan zat pengatur tumbuh. Hormon tanaman atau fitohormon adalah zat organik yang disintesis oleh tanaman yang dalam konsentrasi sangat rendah (mg/l atau μM) dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Terminologi ini berbeda dengan terminologi zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT adalah zat yang dalam konsentrasi sangat rendah dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Jadi, ZPT meliputi baik yang disintesis oleh tanaman maupun yang tidak disintesis oleh tanaman, yang menunjukkan efek hormonal (Hartmann *et al.*, 2011). Dewasa ini terdapat enam kelas zat yang mempunyai efek hormonal yaitu yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman, yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat, etilen, dan brassinosteroid (Taiz and Zeiger, 2010). Namun demikian, ZPT yang paling penting yang digunakan dalam media kultur karena berpengaruh besar terhadap morfogenesis adalah auksin dan sitokinin. Skoog dan Miller (1957) menunjukkan bahwa pembentukan tunas dari kalus tembakau dapat diinduksi dengan sitokinin konsentrasi relatif tinggi dan auksin konsentrasi relatif rendah, sedangkan pembentukan akar dapat diinduksi dengan auksin konsentrasi relatif tinggi dan sitokinin konsentrasi relatif rendah. Kedua peneliti itu juga menunjukkan bahwa kombinasi auksin dan sitokinin yang mendorong pembentukan tunas menyebabkan penghambatan pembentukan akar dan kombinasi auksin dan sitokinin yang mendorong pembentukan akar menyebabkan penghambatan pembentukan tunas. Hingga kini temuan Skoog dan Miller itu masih digunakan sebagai panduan kultur jaringan tanaman, walaupun tentunya ada keragaman dalam jenis dan konsentrasi ZPT

yang dibutuhkan oleh beragam spesies tanaman, bahkan kultivar tanaman.

Auksin berperan penting dalam merangsang pemanjangan batang, mencegah gugur daun dan buah, merangsang pembungaan, merangsang pembentukan buah partenokarpi, mengatur dominasi apikal, merangsang pembentukan akar adventif, merangsang pembentukan kalus, dan mengatur embriogenesis somatik (Taiz and Zeiger, 2010). Pada kultur jaringan tanaman, auksin konsentrasi relatif rendah bersama-sama dengan sitokinin konsentrasi tinggi digunakan untuk merangsang pembentukan tunas adventif atau merangsang perbanyakan tunas samping. Auksin saja digunakan untuk merangsang pembentukan akar, dan pada konsentrasi relatif tinggi digunakan untuk merangsang pembentukan kalus dan embrio (embriogenesis)

Jenis auksin yang banyak digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah *indole-3-acetic acid* (IAA), *1-naphthaleneacetic acid* (NAA), *indole-3-butyric acid* (IBA), *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), *4-amino-3,4,6-trichloropicolinic acid* (pikloram), and *3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid* (dikamba) (Tamta *et al.*, 2008; Shriram *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2008; Konan *et al.*, 2007; Steinmacher *et al.*, 2007; Purkayastha *et al.*, 2008; Nourissier dan Monteuis, 2008; Janarthanam dan Seshadri, 2008, Perera *et al.*, 2009; Yusnita & Hapsoro, 2011a,b; Yusnita *et al.*, 1990). Dari jenis-jenis auksin tersebut, IAA dan IBA merupakan auksin yang disintesis oleh tanaman, sedangkan lainnya adalah sintetik. Berdasarkan banyak eksperimen, IAA, yang diberikan dalam konsentrasi 0,1 – 10 mg/l adalah auksin yang paling lemah. Auksin lainnya (NAA, IBA, 2,4-D, dikamba dan picloram) secara fisiologi lebih aktif dan pada umumnya

digunakan dengan konsentrasi 0,01 – 10 mg/l, atau 50-100 mg/l jika digunakan bersama-sama dengan arang aktif.

Sitokinin merupakan kelas ZPT yang paling penting yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman selain auksin. Sitokinin dikenal sebagai pengatur pembelahan sel dan berpengaruh terhadap sejumlah proses fisiologi dan perkembangan, diantaranya penundaan senesens daun, mendorong mobilisasi zat makanan dalam tanaman, dan pengaturan sintesis pigmen fotosintesis dan sintesis protein. Bersama-sama dengan auksin, sitokinin mengatur siklus sel dan dibutuhkan untuk pembelahan sel (Taiz dan Zeiger, 2010). Rasio sitokinin/auksin yang tinggi pada sistem kultur jaringan mendorong pembentukan tunas, tetapi menghambat pembentukan akar (Skoog dan Miller, 1957). Sitokinin melawan efek auksin dalam mengontrol dominasi apikal, jadi merangsang pertumbuhan mata tunas. Penambahan sitokinin dalam media kultur pada umumnya menginduksi pembentukan tunas samping dan tunas adventif dari eksplan.

Sitokinin yang umum digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah *6-benzyladenine* (BA) atau *6-benzylamino purine* (BAP), *furfurylamino purine* (kinetin), *N⁶- Δ^2 isopentenyladenine* (2-iP), dan *thidiazuron* (TDZ) (Beyl, 2000; Tamta *et al.* 2008; Purkayastha, *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2008; Shriram *et al.*, 2008; Pacheco, *et al.*, 2008; Perera *et al.* 2009; Yusnita dan Hapsoro, 2011a). Yang kurang banyak digunakan adalah zeatin dan zeatin ribosida. Kinetin, BA, 2-iP, zeatin dan zeatin ribosida adalah sitokinin tipe adenin. Zat pengatur tumbuh tersebut memiliki basa adenin pada struktur molekulnya. Thidiazuron (*N-phenyl-N¹,2,3-thiadiazol-5ylurea*) dikembangkan sebagai perontok daun pada kapas dan diperdagangkan dengan merek Dropp. Thidiazuron menunjukkan aktivitas sitokinin yang

sangat tinggi, yaitu merangsang pembentukan tunas adventif (Van Niewkerk *et al.*, 1986; Yusnita, 1990), merangsang percabangan tunas samping, dan merangsang pembentukan kalus (Mok *et al.*, 1987). Zeatin, zeatin ribosida dan 2-iP adalah sitokinin alami dan menunjukkan aktivitas sitokinin yang lebih rendah daripada sitokinin sintetik BA dan kinetin. Oleh karena mahalnya harga sitokinin alami dan aktivitasnya yang rendah, maka sitokinin alami seperti zeatin, zeatin ribosida dan 2-iP tidak digunakan secara rutin pada kultur jaringan tanaman untuk kepentingan komersial. Adenin, suatu basa nitrogen yang disintesis secara alami oleh tanaman, juga mempunyai aktivitas sitokinin yang rendah dan sering ditambahkan ke dalam media kultur bersama-sama dengan sitokinin lain. BA dan kinetin adalah sitokinin yang paling banyak digunakan pada kultur jaringan tanaman. Konsentrasi yang digunakan adalah 0,01-10 mg/l.

ZPT lain seperti giberelin dan asam absisat jarang digunakan dalam kultur jaringan tanaman. Asam giberelat (GA3) kadang-kadang ditambahkan ke dalam media kultur untuk pemanjangan tunas atau ditambahkan bersama-sama dengan ZPT lain untuk merangsang perkecambahan embrio somatik (Sumaryono *et al.*, 2008). Asam absisat kadang-kadang diberikan ke dalam media untuk mendorong perkembangan, pematangan, dan perkecambahan embrio somatik beberapa tanaman berkayu seperti *interior spruce* (Roberts, *et al.*, 1990), dan *Liriodendron tulipifera* (Merkle, *et al.*, 1993). Tabel 4.2 menyajikan daftar ZPT yang digunakan dalam kultur jaringan, bobot molekulnya, dan respons tanaman yang dilaporkan dalam literatur.

Table 4.2. Zat pengatur tumbuh yang umum digunakan dalam kultur jaringan tanaman, bobot molekulnya, dan respons tanaman yang dilaporkan dalam literatur.

No.	Nama	Singkatan/ Nama lain	Bobot Molekul	Respons tanaman
1	Indole-3-acetic acid	IAA	175,19	Pembentukan akar
2	Indole-3-butyric acid	IBA	203,24	Pembentukan akar dan kalus
3	1-naphthaleneacetic acid	NAA	186,21	Pembentukan akar dan kalus
4	2,4-dichlorophenoxy acetic acid	2,4-D	221,04	Pembentukan kalus dan embrio somatik (embriogenesis)
5	2,4,5- trichloro phenoxyacetic acid	2,4,5-T	225,49	Pembentukan kalus dan embrio somatik (embriogenesis)
6	3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid	dicamba	221,04	Pembentukan kalus dan embrio somatik (embriogenesis)
7	4-amino-3,4,6-trichloropicolinic acid	picloram	241,46	Pembentukan kalus dan embrio somatik (embriogenesis)
8	6-benzyladenine	BA	225,25	Pembentukan tunas adventif dan aksilar
9	furfurylamino purine	kinetin	215,21	Pembentukan tunas adventif dan aksilar
10	N ⁶ - Δ ² isopentenyladenine	2-iP	203,25	Pembentukan tunas adventif dan aksilar
11	6(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylamino) purine	zeatin	219,25	Pembentukan tunas adventif dan aksilar serta memperbaiki embriogenesis
12	N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5ylurea	Thidiazuron	220	Pembentukan kalus dan pembentukan tunas adventif atau tunas aksilar.
13	Gibberellic acid 3	GA3	346,37	Pemanjangan tunas dan perbaikan perkecambahan embrio somatik
14	Abcisic acid	ABA	264,32	perbaikan perkembangan dan pematangan embrio

Pemadat media. Secara fisik media kultur bisa berupa media cair atau semi-padat. Agar bisa berwujud semi-padat, maka dibutuhkan pemadat media (*gelling agent*), yang dapat berupa agar-agar atau *gellan gum*. Agar-agar adalah suatu polisakarida yang berasal dari rumput laut. Agar-agar mempunyai titik cair 80^o-90^oC dan memadat pada suhu 40^o-45^oC. Agar-agar diberikan ke media dengan konsentrasi 6-12 g/l. Secara umum, semakin tinggi konsentrasinya, semakin padat medianya (Scholten dan Pierik, 1998). Kemampuan agar-agar untuk memadat tergantung cara ekstraksi dari rumput laut dan pH larutan media sebelum disterilisasi dengan autoklaf. Agar-agar dengan merek dagang yang berbeda-beda dilaporkan berpengaruh terhadap multiplikasi tunas tanaman vanili *in vitro* (Hapsoro, 1999). Dalam larutan dengan pH rendah (<4,5), maka agar-agar tidak memadat dengan normal sehingga media menjadi terlalu lembek. Agar-agar akan memadat dengan normal jika pH media lebih besar dari 5,0. Semakin padat media, semakin kecil ketersediaan air (Stoltz, 1971). Semakin padat media juga dilaporkan menyebabkan semakin kecil ketersediaan sitokinin sehingga proliferasi tunas semakin menurun (Debergh *et al.*, 1981).

Gellan gum seperti Gelrite™ and Phytigel™ adalah eksopolisakarida yang melingkupi sel bakteri *Sphingomonas paucimobilis* atau *Pseudomonas elodea*. *Gellan gum* diperoleh dari bakteri tersebut dengan fermentasi industri. *Gellan gum* merupakan tetrasakarida linear yang berulang, yang terdiri dari D-glukosa, D-asam glukuronat, D-glukosa dan L-rhamnosa (Thorpe *et al.*, 2008). Kemampuan *gellan gum* untuk memadat tergantung pada pembentukan jembatan kimia karena adanya kation divalen seperti Mg²⁺ atau Ca²⁺. Kelebihan *gellan gum* dibandingkan agar-agar adalah bahwa *gellan gum* relatif lebih murni, lebih transparan, dan dibutuhkan dalam jumlah yang lebih sedikit (1,5 – 3 g/l).

Pembuatan media

Pada dasarnya pembuatan media dapat dilakukan dengan menimbang setiap komponen kimia media, lalu melarutkannya dalam air dengan volume tertentu sesuai resep. Namun karena terlalu banyak senyawa kimia yang harus ditimbang dan jumlah beberapa zat kimia yang dibutuhkan terlalu sedikit untuk bisa ditimbang (misalnya unsur mikro, vitamin dan ZPT), maka untuk praktisnya perlu dibuatkan larutan stok dari zat-zat tersebut yang konsentrasinya 10 – 1000 x dari konsentrasi yang dibutuhkan di media. Penggunaan larutan stok dapat secara signifikan mengurangi pekerjaan sama yang berulang-ulang dan dengan demikian mengurangi kesalahan karena faktor manusia dalam pembuatan media kultur. Ada beberapa cara untuk mengelompokkan komponen kimia media dalam pembuatan larutan stok. Tabel 4.3 menyajikan pengelompokan komponen kimia dalam pembuatan larutan stok, konsentrasi masing-masing zat kimia dalam kelompok, dan bagaimana menggunakan larutan stok untuk membuat 1 liter media MS.

Pembuatan larutan stok. Untuk membuat 1 liter larutan Stok Makro 10x, masing komponen kimia (NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and KH_2PO_4) ditimbang, kemudian satu demi satu masing-masing zat kimia dilarutkan dalam kurang lebih 500 ml akuades di dalam gelas piala 1000 ml. Pelarutan zat kimia dilakukan setelah zat kimia sebelumnya sudah benar-benar larut. Kemudian larutan dituang ke dalam labu takar 1000 ml. Akuades lalu ditambahkan ke dalam larutan sampai volumenya 1000 ml. Pastikan larutan sudah homogen lalu larutan dimasukkan ke dalam botol stok.

Tabel 4.3. Pengelompokan komponen kimia dalam pembuatan larutan stok untuk membuat media MS

Larutan stok	Senyawa kimia	Konsentrasi (mg/l)	Volume untuk 1 liter media MS (ml)
Makro (10 x)	NH ₄ NO ₃	16.500	100
	KNO ₃	19.000	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.700	
	KH ₂ PO ₄	1.700	
Ca (100 x)	CaCl ₂ . 2H ₂ O	44.000	10
Mikro A (100 x)	H ₃ BO ₃	620	10
	MnSO ₄ .H ₂ O	1.690	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	860	
Mikro B (1000 x)	KI	830	1
	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	250	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	25	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	25	
Fe (100 x)	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2.780	10
	Na ₂ EDTA	3.730	
Vitamin (1000 x)	Thiamin-HCl	100	1
	Pyridoxine-HCl	500	
	Nicotinic acid	500	
	Glycine	2.000	
Mio- inositol (10 x)	Mio-inositol	1.000	100

Botol lalu diberi label yang memuat keterangan mengenai tanggal pembuatan, konsentrasi dan berapa kali pemekatannya,

berapa milileter yang harus diambil untuk membuat satu liter suatu media, dan nama orang yang membuat larutan stok.

Larutan stok kalsium (Ca) dibuat dengan melarutkan $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebagai satu-satunya zat yang dilarutkan. Pelarutan bersama-sama dengan zat lain dapat menyebabkan pengendapan. Untuk membuat larutan stok Ca (100x) maka sebanyak 44 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ditimbang, lalu dilarutkan dalam kurang lebih 500 ml akuades dalam gelas piala 1000 ml sampai benar-benar homogen. Lalu larutan dituang ke dalam labu takar 1000 ml dan akuades ditambahkan sampai volume larutan 1000 ml. Pastikan larutan menjadi homogen. Larutan kemudian disimpan dalam botol stok, siap untuk digunakan.

Larutan stok lainnya (Mikro A, Mikro B, vitamin, dan mioinositol) dibuat dengan prosedur yang sama sebagaimana diuraikan sebelumnya. Tetapi untuk pembuatan larutan stok Fe, perlu dilakukan sedikit modifikasi. Untuk membuat 1 liter stok Fe (100x) untuk media MS, perlu disiapkan dua gelas piala 1 liter yang masing-masing berisi kurang lebih 300 ml akuades. Kemudian ke dalam gelas piala dimasukkan masing-masing 2780 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 3730 mg Na_2EDTA , diaduk-aduk sampai merata. Selanjutnya sedikit demi sedikit, sambil diaduk-aduk, larutan Na_2EDTA dituangkan ke dalam gelas piala yang berisi larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sampai kedua larutan bercampur secara homogen. Larutan dari hasil campuran itu berwarna kuning muda dan bening. Larutan lalu dituangkan ke labu takar 1000 ml. Tambahkan akuades sampai volume larutan menjadi 1000 ml. Selanjutnya larutan disimpan di botol berwarna coklat atau botol putih bening yang dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan di kulkas pada suhu 4°C.

Larutan stok vitamin dapat dibuat dengan konsentrasi 100-1000 x dari yang diminta oleh suatu formulasi media, lalu

disimpan pada suhu 4°C. Sebaiknya dihindari penyimpanan yang terlalu lama untuk menghindari kerusakan. Penyimpanan pada suhu 4°C tersebut sebaiknya tidak lebih dari 3 bulan. Oleh karena itu sebaiknya stok vitamin dibuat tidak terlalu banyak tetapi benar-benar sesuai dengan tingkat aktivitas laboratorium. Cara terbaik adalah dengan membuat larutan stok vitamin dengan konsentrasi 1000 x. Kemudian larutan dibagi-bagi dalam volume 1 ml di dalam kantong-kantong plastik atau tabung ukuran 1,5 ml, lalu disimpan beku di dalam kulkas. Setiap kali akan dibuat 1 liter media, satu kantong plastik atau tabung yang berisi larutan tersebut dicairkan dan dimasukkan ke campuran media. Dengan prosedur ini larutan stok vitamin akan jauh lebih awet.

Sebagian besar ZPT tidak larut dalam air. Secara umum, ZPT yang bersifat asam (misalnya IAA, IBA, NAA atau 2,4-D) dapat dilarutkan dengan penambahan sedikit NaOH 1 N atau KOH 1N, lalu ditambahkan air sampai volume yang dikehendaki. Sitokinin (misalnya BA, kinetin, or 2-iP) sebagian besar bersifat basa dan dapat dilarutkan dengan penambahan sedikit HCl 1N sebelum ditambahkan akuades sampai volume yang dikehendaki. Thidiazuron dan sitokinin yang lain dapat dilarutkan dengan penambahan sedikit *dimethylsulfoxide* (DMSO). Sebagian besar auksin dan sitokinin secara kimia stabil, kecuali IAA dan zeatin atau zeatin-ribosida, oleh karena itu dapat disimpan dalam kulkas pada suhu 4°C. Untuk ZPT yang tidak stabil, sebaiknya tidak dibuatkan larutan stoknya, tetapi larutannya dibuat segar pada waktu pembuatan media. Penambahan NaOH 1N, KOH 1N, atau HCl 1N sebaiknya tidak lebih dari 0,3 ml untuk setiap 10 mg ZPT yang dilarutkan. Sebelum disimpan, larutan ditetapkan pH-nya pada 5,5.

Sukrosa, arang aktif, pepton, tripton atau kasein hidrolisat tidak perlu dibuat larutan stoknya, tetapi langsung ditimbang sesuai dengan kebutuhan pada waktu pembuatan media. Mio-inositol dapat langsung ditimbang, atau dibuatkan larutan stoknya pada konsentrasi 10 x dan disimpan di kulkas pada 4°C.

Prosedur pembuatan media. Sebagai ilustrasi di bawah ini diuraikan prosedur pembuatan 1 liter media MS yang mengandung 2 mg/l 2,4-D.

1. Masukkan kurang lebih 500 ml akuades ke dalam gelas piala 1000 ml. Siapkan gelas pengaduk untuk mengaduk secara manual. Atau jika tersedia fasilitas mesin pengaduk (*magnetic stirrer*), masukkan juga batang pengaduk (*stirrer bar*) ke dalam gelas piala. Letakkan gelas piala yang sudah berisi akuades di atas mesin pengaduk. Hidupkan mesin pengaduknya sampai batang pengaduknya berputar secara stabil dan dengan kecepatan yang dikehendaki.
2. Masukkan satu demi satu larutan stok dalam jumlah sesuai yang tercantum pada Tabel 3, yaitu 100 ml Makro (10x), 10 ml Mikro A (100x), 1 ml Mikro B (1000x), 10 ml Fe (100x), 1 ml vitamin (1000x), 100 ml mio-inositol (10x), dan larutan stok 2,4-D sesuai dengan konsentrasinya di dalam media kultur. Misalnya, jika larutan stok 2,4-D tersedia dalam konsentrasi 100 mg/l, dan konsentrasi 2,4-D yang dikehendaki dalam media kultur adalah 2 mg/l maka volume larutan stok yang harus ditambahkan ke dalam campuran media adalah $(2 \text{ mg}/100 \text{ mg}) \times 1000 \text{ ml} = 20 \text{ ml}$.

3. Tuangkan larutan ke dalam labu takar 1000 ml, lalu tambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml. Bolak-balikkan labu takar sehingga larutan homogen.
4. Tuangkan larutan ke gelas piala 1000 ml dan hidupkan mesin pengaduk.
5. Tera pH larutan menjadi 5,8 dengan menambahkan KOH 1N (atau NaOH 1N) atau HCl 1N.
6. Untuk media cair, larutan dapat langsung dimasukkan ke wadah-wadah kultur (erlenmeyer atau lainnya). Volume yang dituangkan sesuai dengan yang diinginkan. Selanjutnya wadah kultur ditutup dengan penutup yang tahan panas. Untuk media semi-padat, tambahkan 7 g/l agar-agar atau 2 g/l gelrite ke dalam larutan. Panaskan media sambil terus diaduk-aduk supaya agar-agar atau gelrite dapat larut merata, tidak menempel lengket di dasar wadah. Sambil terus diaduk, tunggu sampai media mendidih. Selanjutnya media dituangkan dengan volume yang dikehendaki ke botol-botol kultur.

5

Embriogenesis Somatik Kelapa Sawit

Embriogenesis somatik *in vitro* adalah suatu proses pembentukan embrio dari sel-sel somatik dari eksplan yang dikulturkan *in vitro*. Diferensiasi menjadi embrio somatik dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung yaitu melalui pembentukan kalus terlebih dahulu (Williams dan Maheswaran, 1986). Embriogenesis somatik tidak langsung lebih sering dijumpai. Perbanyakkan *in vitro* kelapa sawit sering dilakukan melalui embriogenesis somatik tidak langsung (Rival dan Parveez, 2005). Embriogenesis somatik kelapa sawit terdiri dari beberapa tahap yaitu induksi kalus primer, pembentukan kultur kalus embriogenik, perkembangan embrio somatik, pematangan, dan perkecambahan atau regenerasi tunas (Rival dan Parveez, 2005; Te-chato dan Hilae, 2007). Beberapa macam eksplan telah digunakan, yaitu embrio zigotik, infloresens muda, ujung akar, dan potongan lamina daun muda. Berdasarkan pengalaman kami, eksplan lamina daun muda relatif mudah untuk ditangani dan disterilkan, dengan persentase kontaminasi mikroba yang relatif kecil.

Kalus yang diinduksi dari eksplan disebut kalus primer. Kalus ini dapat bersifat embriogenik atau non-embriogenik. Kalus non-embriogenik dapat diinduksi menjadi kalus embriogenik, dan jika dipindah ke media yang baru kalus

embriogenik tersebut dapat mengalami proliferasi atau berkembang menjadi embrio somatik. Sejumlah embrio somatik ini dapat diperbanyak melalui pembentukan embrio somatik sekunder. Artinya, dari sebuah embrio somatik dapat dihasilkan sejumlah embrio somatik, dan dari masing-masing embrio somatik dihasilkan sejumlah embrio somatik lagi. Proses embriogenesis somatik semacam ini disebut sebagai embriogenesis somatik berulang (*repetitive somatic embryogenesis*). Embrio yang sudah mengalami proses perkembangan dan sudah matang dapat diinduksi untuk berkecambah atau untuk membentuk tunas. Selanjutnya tunas yang dihasilkan dapat diinduksi untuk membentuk perakaran, lalu tanaman kecil (planlet) yang terbentuk dapat diaklimatisasi terhadap kondisi luar.

Banyak laporan menunjukkan bahwa embriogenesis somatik membutuhkan auksin, atau auksin dan sitokinin. Namun demikian, eksplan memberikan respons yang beragam terhadap ZPT tersebut tergantung bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan, umur ontogeninya, genotipe, jarak letak jaringan dari meristem (jika digunakan eksplan daun), dan jenis dan konsentrasi auksin yang digunakan. Pada umumnya eksplan yang diambil dari kecambah atau tanaman yang masih juvenil lebih responsif secara *in vitro* daripada eksplan yang diambil dari tanaman dewasa. Pada Bab ini diuraikan mengenai embriogenesis somatik *in vitro* tanaman kelapa sawit dari eksplan daun muda yang diambil dari tanaman dewasa. Tahap-tahap embriogenesis somatik kelapa sawit adalah sebagai berikut; (1) Persiapan eksplan, sterilisasi, dan pemantapan kultur; (2) Induksi kalus primer; (3) Induksi kalus embriogenik dan embriogenesis; (4) Perkembangan embrio somatik dan

regenerasi tunas; (5) Pemanjangan tunas, pengakaran, dan aklimatisasi.

Persiapan eksplan, sterilisasi, dan pematapan kultur

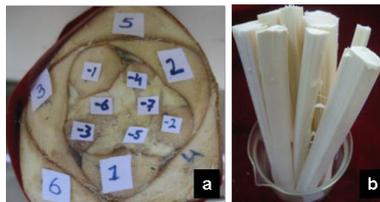
Eksplan yang digunakan adalah potongan lamina daun muda yang diambil dari tanaman dewasa kelapa sawit terseleksi, yang merupakan tanaman unggul. *Fronde* muda diambil dari tanaman dewasa jenis tenera. *Fronde* kelapa sawit secara morfologi adalah struktur daun yang terdiri atas tangkai daun yang panjang yang di kanan dan kirinya melekat anak-anak daun. *Fronde* melekat pada batang dan terlihat mengelilingi dan melingkupi batang. *Fronde-fronde* muda yang berada di ujung batang melekat satu dengan lainnya membentuk bangun mirip silinder. Silinder *fronde* muda inilah yang diambil untuk persiapan eksplan. Sebelum pengambilan silinder *fronde* muda, *fronde* tua yang mengelilinginya dipotong (Gambar 5.1a) sehingga silinder *fronde* muda terlihat (Gambar 5.1b). Silinder *fronde* muda dipotong pada 15 cm dan 85 cm di atas perkiraan letak ujung meristem (Gambar 5.1c), sehingga dihasilkan silinder *fronde* yang panjangnya 70 cm (Gambar 5.1d). Silinder *fronde* ini lalu dibawa ke laboratorium untuk ditangani lebih lanjut.

Pada ujung bawah silinder *fronde*, filotaksi dapat dilihat sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 5.2a. Potongan daun sebagai eksplan diambil dari *fronde* yang merupakan filotaksi no. -4, -5, -6, -7, dan -8. Dengan demikian *fronde-fronde* yang lebih tua (no. 6, 5, 4, 3, 2,1, -1, -2 and -3) harus dilepaskan. Bagian ujung silinder *fronde* dipotong, sehingga tersisa kurang lebih 30 cm silinder *fronde* bagian bawah. Dari silinder inilah daun-daun muda sumber eksplan diperoleh (Gambar 5.2b)

Untuk mencegah pencoklatan, masing-masing *frond* dipotong sepanjang 10-12 cm, lalu direndam dalam larutan antioksidan yaitu campuran 150 mg/l asam askorbat + 50 mg/l asam sitrat sampai saat dilakukan sterilisasi.



Gambar 5.1. Pengambilan silinder *frond* muda kelapa sawit. *Frond* tua yang mengelilingi pucuk batang dipotong (a). Pendugaan posisi meristem pucuk (b). Pemotongan silinder *frond* pada 15 cm di atas perkiraan posisi meristem (c). Pemotongan dilakukan pada 85 cm di atas perkiraan posisi meristem pucuk. Pemotongan tersebut menghasilkan silinder *frond* muda yang panjangnya 70 cm (d).



Gambar 5.2. Penampang melintang silinder *frond*; nomor menunjukkan konfigurasi *frond* daun pada filotaksi. (b) *Frond* muda kelapa sawit yang digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi dilakukan dengan merendam-kocok selama 15 menit dalam 20% larutan pemutih komersial (mengandung 5,25% NaOCl) plus beberapa tetes detergen Tween 20. Selanjutnya bahan tanaman dibilas dengan akuades steril setidaknya tiga kali. Di dalam *laminar air flow cabinet*, blok daun (*frond*) yang masing-masing terdiri atas 15-20 helai daun dipotong sepanjang 1,5 cm, sehingga dihasilkan potongan-potongan lamina daun yang berbentuk segi empat yang salah satu sisinya 1,5 cm. Potongan lamina daun ini lalu dikulturkan secara aseptik dalam media induksi kalus (MIK) (Gambar 5.3a-d). Prosedur penanganan eksplan, sterilisasi, dan pemantapan kultur yang diuraikan tersebut relatif sederhana, yang menghasilkan tingkat kontaminasi mikroba yang relatif rendah, yaitu kurang dari 5%.



Gambar 5.3. Penanaman eksplan pada media kultur. Masing-masing batangan daun, yang terdiri dari 15-20 lamina daun, diletakkan di cawan petri (a). Lamina daun dipotong-potong sepanjang 1,5 cm sehingga diperoleh potongan daun yang berbentuk persegi empat (b, c, d). Eksplan dikulturkan pada media induksi kalus (d).

Induksi Kalus

Induksi kalus terjadi jika eksplan dikulturkan pada media MS atau $\frac{1}{2}$ MS (Murashige and Skoog, 1962) yang mengandung auksin (Rival and Parveez 2005). Beragam konsentrasi auksin dilaporkan dapat merangsang pembentukan kalus dari eksplan yang berbeda-beda. Secara umum konsentrasi auksin yang tinggi digunakan bersamaan dengan penggunaan arang aktif, sedangkan konsentrasi auksin yang rendah digunakan bersamaan dengan penggunaan antioksidan seperti asam askorbat dan asam sitrat (Moshkov *et al.*, 2008; Hilae dan Te Chato, 2005). Penggunaan arang aktif dan antioksidan dimaksudkan untuk mengatasi masalah pencoklatan jaringan dan media yang umum terjadi pada kultur jaringan kelapa sawit (Rao dan Ganapathi, 1993; Teixeira *et al.*, 1994; Patcharapisutsin dan Kanchanapoom 1996). Walaupun demikian pencoklatan yang terjadi tidak selalu merugikan. Kadang-kadang kalus dapat muncul dari eksplan yang berwarna coklat atau bahkan hitam. Arang aktif dapat mencegah pencoklatan karena arang aktif mungkin menyerap zat-zat yang berwarna coklat atau hitam akibat dari sterilisasi media dengan autoklaf atau yang dikeluarkan oleh jaringan eksplan. Jika digunakan arang aktif maka konsentrasi auksin yang digunakan harus jauh lebih tinggi daripada jika tidak digunakan arang aktif. Hal ini karena sebagai penyerap non-selektif (artinya menyerap apa saja) arang aktif juga menyerap ZPT (Fridborg *et al.*, 1978; Ebert dan Taylor, 1990; Ebert *et al.*, 1993, Toering dan Pullman, 2005).

Beberapa laporan mengenai kultur jaringan tanaman kelapa sawit melaporkan penggunaan auksin konsentrasi tinggi plus arang aktif atau auksin konsentrasi rendah plus antioksidan tanpa arang aktif. Teixeira *et al.* (1994) melaporkan

bahwa pembentukan kalus dari eksplan infloresens bunga betina kelapa sawit diperoleh setelah eksplan dikulturkan selama 30 minggu pada media $\frac{1}{2}$ MS yang mengandung 475-550 μM 2,4-D+3 g/l arang aktif. Patcharapisutsin dan Kanchanapoom (1996) melaporkan bahwa kalus dari eksplan embrio zigotik dewasa diperoleh dengan mengulturkan eksplan pada media $\frac{1}{2}$ MS yang berisi 0,5 g/l arang aktif dan 30 mg/l *naphthaleneacetic acid* (NAA) atau 3 mg/l 2,4-D. Teixeira *et al.* (1999) berhasil mendapatkan kultur kalus dari eksplan embrio zigotik dewasa kelapa sawit dengan menggunakan media Y3 atau MS yang mengandung 475 – 500 μM 2,4-D atau 250 μM picloram plus 3 g/l arang aktif. Hilae dan Te Chato (2005) berhasil mendapatkan kalus dari eksplan daun kelapa sawit pada media MS yang mengandung 5 mg/l dikamba dan 200 mg/l asam askorbat tanpa arang aktif.

Pada penelitian pendahuluan kami, kami mempelajari pengaruh NAA, pikloram atau 2,4-D saja, terhadap induksi kalus primer. Masing-masing jenis auksin, dengan beberapa konsentrasi (50, 100, 200, 300 and 400 μM), ditambahkan pada media MS plus 2 g/l arang aktif. Media juga berisi 100 mg/l mio-inositol, 1 mg/l Ca-pantotenat, 1 mg/l asam nikotinat, 1 mg/l piridoksin-HCl, 1 mg/l tiamin-HCl, 0,01 mg/l biotin, 30 g/l sukrose, 200 mg/l asam askorbat, 50 mg/l asam sitrat, dan 15% air kelapa. Hasil percobaan menunjukkan bahwa hanya 2,4-D 400 μM yang dapat menginduksi pembentukan kalus primer, dengan persen eksplan yang membentuk kalus kurang dari 10%. Selanjutnya tiga eksperimen terpisah kami lakukan yaitu mempelajari pengaruh (1) konsentrasi 2,4-D (400 dan 450 μM) dengan penambahan arang aktif, (2) pengaruh konsentrasi 2,4-D (5, 10, 15, 20, 30 and 50 μM) tanpa arang aktif, dan (3) pengaruh konsentrasi 2,4-D (1, 2, 3, 4 dan 5 μM) dengan dan

tanpa pikloram 1 μM , tanpa arang aktif. Persen pembentukan kalus diamati setiap bulan selama 7 bulan.

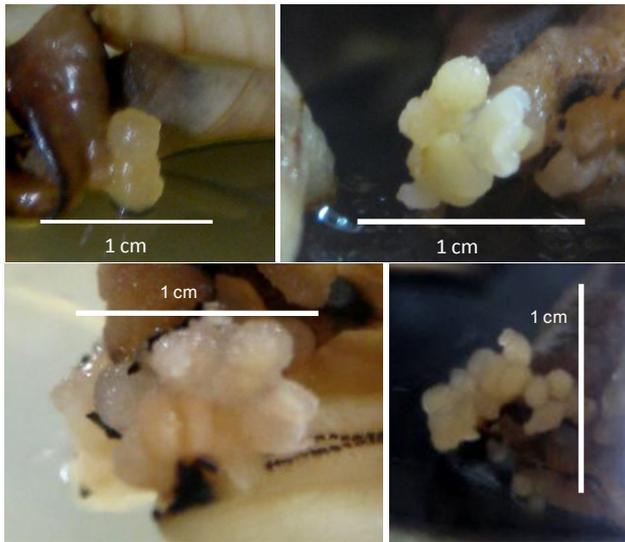
Kultur diinkubasi pada ruang kultur dalam kondisi gelap dengan suhu $25\pm 2^\circ\text{C}$. Subkultur dilakukan setiap 8 minggu. Hasil percobaan menunjukkan bahwa pembentukan kalus membutuhkan waktu yang sangat bervariasi. Kalus yang pertama kali terbentuk terjadi pada 8 minggu setelah tanam dengan persentase pembentukan kalus yang rendah. Kalus terus terbentuk secara sporadis sampai kultur berumur satu tahun atau lebih. Pada 7 bulan setelah tanam, hasil percobaan yang pertama menunjukkan bahwa pembentukan kalus pada media 2,4-D 450 μM menghasilkan persen pembentukan kalus yang lebih tinggi, yaitu 19.8%, dibandingkan media 2,4-D 400 μM , yaitu 7.5 %. Pada umumnya kalus yang terbentuk berstruktur kompak, berbentuk nodul, warna putih sampai putih kekuningan (Gambar 5.4).



Gambar 5.4. Penampakan kalus yang terbentuk pada media MS yang mengandung 2,4-D 450 μM dan arang aktif (Yusnita dan Hapsoro, 2011b).

Hasil percobaan yang kedua menunjukkan bahwa tanpa arang aktif media 2,4-D 10, 15 or 20 μM menghasilkan persen pembentukan kalus tertinggi (27% - 34%). Penambahan pikloram 1 μM pada medium MS 2,4-D 4 μM dan 5 μM menghasilkan persen pembentukan kalus, masing-masing 28%

dan 34 %. Penampakan kalus pada media MS tanpa arang aktif dengan 2,4-D saja atau dikombinasi dengan pikloram 1 μ M dapat dilihat pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5. Penampakan kalus pada kultur potongan daun kelapa sawit pada media MS dengan penambahan 2,4-D saja atau 2,4-D dan pikloram tanpa arang aktif (Yusnita dan Hapsoro, 2013).

Sebagian besar kalus berbentuk nodul, kompak, berwarna putih sampai kuning, dan beberapa tampak lunak dan transparan. Berdasarkan pengalaman kami, hanya kalus yang berbentuk nodul yang dapat diinduksi menjadi embriogenik, yang kemudian berkembang menjadi embrio somatik (mengalami embriogenesis). Kami menyarankan agar digunakan media CIM1, CIM 2 and CIM3 untuk menginduksi kalus embriogenik (Tabel 5.1). Tingkat keasaman (pH) media ditetapkan sebesar

5,8 sebelum diberi pematat media. Pematat media yang digunakan adalah 8 g/l agar-agar.

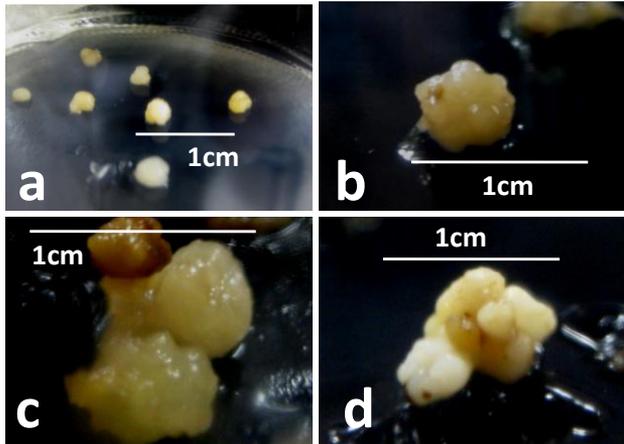
Induksi kalus embriogenik dan embriogenesis

Kalus yang berbentuk nodul dan kompak selanjutnya dipisahkan dari jaringan eksplan dan dikulturkan pada media segar (Gambar 5.6a) agar menjadi embriogenik. Media ini disebut media induksi embriogenesis (EM). Formula dasar media EM sama dengan media CIM, tetapi mengandung 450 μM 2,4-D dan 4.4 μM benziladenin (BA), 18 mg/l adenin dan 3g/l arang aktif (Tabel 5.2). Subkultur kalus ke media EM dilakukan 2-4 kali dengan interval 6 minggu sampai terbentuk kalus yang embriogenik. Setelah dua, tiga, atau empat subkultur pada media EM, beberapa kalus menjadi kalus embriogenik dan dari kalus yang embriogenik itu sejumlah klaster mulai berkembang menjadi embrio somatik (Gambar 5.6b,c,d). Proliferasi embriogenesis sekunder terjadi jika klaster kalus embriogenik yang mengandung embrio somatik dipecah menjadi klaster yang lebih kecil dan disubkultur beberapa kali di media EM (Gambar 5.7)

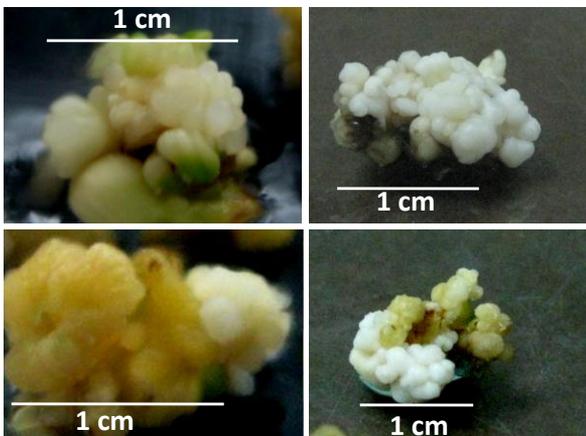
Perkembangan embrio somatik dan regenerasi tunas

Agar embrio somatik mengalami perkembangan dan pematangan, maka embrio somatik pada tahap perkembangan awal disubkultur ke media MS sebagaimana diuraikan sebelumnya, tetapi tanpa penambahan ZPT, dan ditambahkan 2 g/l arang aktif (EDM1). Atau bisa juga embrio somatik itu disubkultur ke media MS dengan penambahan 1 μM BA (EDM2). Dalam waktu sekitar 8 minggu, embrio somatik akan

berkembang dan berada pada berbagai tahap perkembangan sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 5.8.



Gambar 5.6. Setelah dua, tiga, atau empat kali subkultur dengan interval 6 minggu pada media EM, kalus menjadi embriogenik (a-d) dan sejumlah kalus mulai membentuk embrio somatik (d) (Yusnita dan Hapsoro, 2013).



Gambar 5.7. Proliferasi embrio somatik sekunder terjadi jika kluster kalus dipisahkan menjadi kluster yang lebih kecil dan disubkulturkan beberapa kali pada media EM.

Table 5.1. Formulasi media untuk induksi kalus primer pada eksplan daun pada kultur jaringan tanaman kelapa sawit

No	Komponen Media	CIM1	CIM2	CIM3
1	NH ₄ NO ₃	1 650	1 650	1 650
2	KNO ₃	1 900	1 900	1 900
3	KH ₂ PO ₄	170	170	170
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370
5	CaCL ₂ . 2H ₂ O	440	440	440
6	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
7	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	16,9	16,9
8	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
9	KI	0,83	0,83	0,83
10	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0,25	0,25	0,25
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
12	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
13	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
14	Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
15	Mio-inositol	100	100	100
16	Asam nikotinat	1	1	1
17	Piridoksin-HCl	1	1	1
18	Thiamin-HCl	1	1	1
19	Ca-pantotenat	1	1	1
20	Glisin	2	2	2
21	Biotin	0,01	0,01	0,01
22	Sukrosa	30 000	30 000	30 000
23	Air kelapa	150 ml	150 ml	150 ml
24	Arang aktif	2 000	-	-
25	Asam asorbat	150	150	150
26	Asam sitrat	50	50	50
27	2,4-D	450 µM	15 atau 20 µM	5 µM
28	Pikloram	-	-	1 µM

CIM = *Callus-inducing media*

Table 5.2. Formulasi media EM untuk induksi kalus embriogenik kelapa sawit

No.	Komponen media	Konsentrasi (mg/l)
1	NH ₄ NO ₃	1 650
2	KNO ₃	1 900
3	KH ₂ PO ₄	170
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
5	CaCL ₂ . 2H ₂ O	440
6	H ₃ BO ₃	6,2
7	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
8	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
9	KI	0,83
10	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0,25
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
12	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
13	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
14	Na ₂ EDTA	37,3
15	Mio-inositol	100
16	Asam nikotinat	1
17	Piridoksin-HCl	1
18	Tiamin-HCl	1
19	Ca-pantotenat	1
20	Glisin	2
21	Biotin	0,01
22	Sukrosa	30 000
23	Arang aktif	3 000
24	Adenin	18
25	Asam askorbat	150
26	Asam sitrat	50
27	2,4-D	100 (450 μM)
28	Benziladenin	1 (4,4 μM)

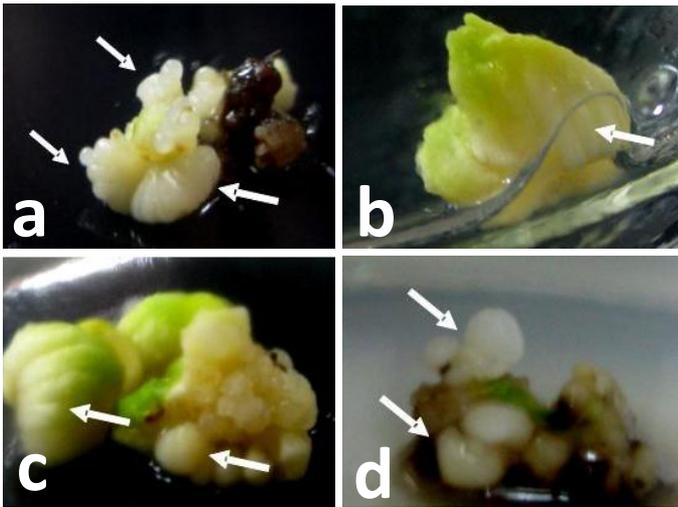
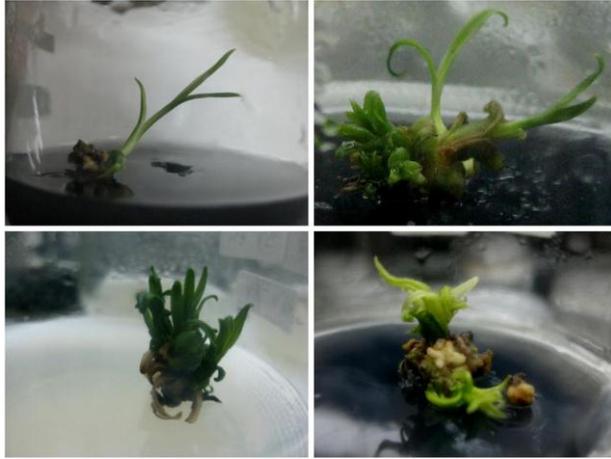


Figure 5.8. Kluster embrio somatik kelapa sawit pada beberapa tahap perkembangan (lihat anak panah) pada media EDM1, yaitu media MS tanpa ZPT (a, b, c) dan EDM2, yaitu media MS dengan BA 1 μM) (d)(Yusnita dan Hapsoro, 2011b).

Pada waktu embrio somatik yang sudah matang dikecambahkan pada media MS tanpa ZPT atau dengan penambahan BA atau BA+ GA3 +IBA, tunas muncul, tetapi tidak memanjang. Pembentukan dan pemanjangan tunas dapat terjadi jika embrio somatik diperlakukan *pulse treatment* terlebih dulu dengan 4.4 μM (1mg/L) BA + 4.65 μM (1mg/L) kinetin dalam media MS selama 2 minggu, lalu embrio dikulturkan pada media MS tanpa ZPT dengan atau tanpa arang aktif (Gambar 5.9).

Kultur untuk induksi kalus embriogenik, inisiasi embrio somatik, perkembangan, dan regenerasi tunas, diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ dengan pencahayaan 1500 lux dari lampu fluoresens putih dan dengan fotoperiodisitas 16 jam terang 8 jam gelap.

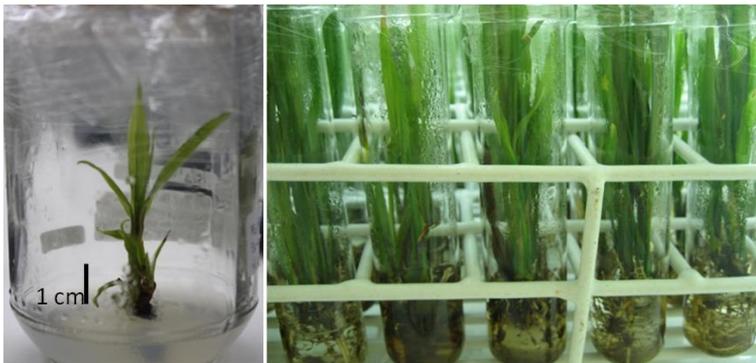


Gambar 5.9. Pembentukan tunas pada embrio somatik kelapa sawit dengan cara diperlakukan dengan *pulse treatment* pada media MS yang berisi 1 mg/L BA + 1 mg/L kinetin selama 2 minggu, lalu dikulturkan pada media MS tanpa ZPT, dengan atau tanpa arang aktif (Yusnita dan Hapsoro, 2013).

Pemanjangan tunas, pengakaran dan aklimatisasi.

Pemanjangan tunas dapat dilakukan dengan mengkulturkan tunas atau kelompok tunas pada media tanpa ZPT (Gambar 5.10). Tunas-tunas yang panjangnya 5 cm atau lebih dapat diakarkan. Rival *et al.* (1997) melaporkan penggunaan dua tahap untuk pengakaran *in vitro* tanaman kelapa sawit, yaitu pertama pengakaran tunas diinduksi pada media yang mengandung auksin konsentrasi tinggi selama 1-7 hari, kedua pemanjangan akar pada media tanpa ZPT sebab konsentrasi auksin yang tinggi dapat menghambat pemanjangan akar (Hausman *et al.*, 1995). Penggunaan auksin konsentrasi rendah secara terus-menerus dilaporkan oleh Konan *et al.* (2007) untuk mengakarkan tunas kelapa sawit *in*

in vitro dalam satu tahap saja. *Naphthaleneacetic acid* (NAA) dan *indole-3-butyric acid* (IBA) adalah auksin yang sering digunakan untuk pengakaran *in vitro* setek mikro (Yusnita *et al.*, 1990; Baksha *et al.* 2003; Qaddoury dan Amssa 2004). Pada tanaman kelapa sawit, penggunaan NAA untuk pengakaran *in vitro* dilaporkan oleh Euwens *et al.* (2002) dan Konan *et al.* (2007), sedangkan untuk pengakaran *ex vitro* dilaporkan oleh Sumaryono dan Riyadi (2011). Penggunaan IBA baik untuk pengakaran *in vitro* maupun *ex vitro* dilaporkan oleh Rajesh *et al.* (2003). Perlakuan dengan auksin dapat dilakukan dengan media cair (Rajesh *et al.*, 2003), media semi-padat (Euwens *et al.*, 2002; Rival dan Parveez, 2005; Konan *et al.*, 2007), atau dengan mencelupkan dasar tunas ke dalam larutan auksin konsentrasi tinggi untuk pengakaran *ex vitro* (Sumaryono dan Riyadi, 2011). Pada waktu planlet mempunyai perakaran dan tunas yang sudah tumbuh dengan baik dan seimbang, maka planlet siap untuk diaklimatisasi.



Gambar 5.10. Pemanjangan tunas pada media tanpa ZPT (kiri). Pengakaran tunas dilakukan pada media cair yang mengandung auksin (kanan) (Yusnita dan Hapsoro, 2013).

Aklimatisasi dilakukan dengan cara yaitu planlet diambil dari wadah kultur, dibersihkan dengan air dari sisa-sisa agar yang menempel, diperlakukan dengan larutan fungisida, lalu ditanam pada pot-pot atau nampan yang berisi campuran media tanah. Pada awalnya planlet ditumbuhkan dalam kondisi kelembaban tinggi dan intensitas cahaya rendah. Untuk itu planlet ditumbuhkan di bawah naungan berupa tenda plastik atau warnet dengan terus disuplai dengan kabut air untuk menjaga iklim mikro agar kelembabannya cukup tinggi dan intensitas cahayanya rendah (Gambar 5.11). Beberapa hari sampai empat minggu dibutuhkan untuk membuka naungan sedemikian rupa agar secara gradual kelembaban turun dan intensitas cahayanya naik sampai terbentuk akar baru dan daun baru. Selanjutnya planlet dipindahkan ke media dalam polibeg atau pot, lalu secara gradual dipaparkan pada intensitas cahaya yang lebih tinggi dan kelembaban udara normal (Gambar 5.11).



Gambar 5.11. Pada saat aklimatisasi, kelembaban nisbi yang tinggi dan intensitas cahaya yang rendah dapat dibuat menggunakan sungkup plastik (KIRI). Setelah planlet teraklimatisasi bibit dapat dipindahkan ke polibeg dan secara bertahap diadaptasikan ke intensitas cahaya lebih tinggi dengan kelembaban nisbi normal (KANAN)

6

Prospek dan Kendala Penggunaan Bibit Klonal Kelapa Sawit Dari Kultur Jaringan

Kelapa sawit adalah salah satu komoditas penting bagi perekonomian Indonesia, karena merupakan tanaman penghasil minyak paling efisien, dan berpotensi untuk menjadi sumber minyak utama baik untuk minyak makan maupun bahan baku industri terbarukan. Sejak tahun 2006 Indonesia telah menjadi produsen minyak sawit terbesar di dunia. Pada tahun 2013, produksi minyak sawit Indonesia diperkirakan sebesar 26 juta ton. Dari total produksi tersebut, 21,2 juta ton diekspor dalam bentuk *crude palm oil* (CPO), *palm kernel oil* (PKO) dan turunannya (GAPKI, 2014). Menurut prediksi USDA GAIN Report (2015), produksi CPO Indonesia pada tahun 2015/2016 mencapai 35 juta ton, dengan volume ekspor mencapai 22,7 juta ton. Prediksi hasil ini diproyeksikan dari luas areal pertanaman kelapa sawit sebesar 10,8 juta hektar dengan luas panen sebesar 8,9 juta hektar.

Namun demikian, rata-rata produktivitas minyak sawit di Indonesia dan di Malaysia tergolong masih rendah. Selama lebih dari dua dekade, produktivitas kelapa sawit di Indonesia maupun di Malaysia mengalami stagnasi, yaitu hanya 3,4 ton CPO/ha, sedangkan produktivitasnya di kebanyakan

perkebunan di Malaysia 3,5-3,9 ton CPO/ha (Kushairi *et al.*, 2010). Potensi produksi kelapa sawit, yang didefinisikan sebagai produksi dari suatu kultivar yang ditanam dalam lingkungan optimal dengan kecukupan air dan hara mineral tanpa adanya stress hama dan penyakit diperkirakan mencapai 17 ton CPO/ha/th (Ng *et al.*, 2003). Peningkatan yang drastis akan permintaan minyak sayur dunia dan besarnya tantangan upaya peningkatan produksi melalui perluasan areal pertanaman kelapa sawit karena isu perusakan lingkungan menuntut peningkatan produktivitas secara signifikan.

Kesenjangan produktivitas antara potensi produksi dengan kenyataannya, di antaranya disebabkan oleh penggunaan bahan tanaman yang berasal dari benih *dura* x *pisifera* (D x P) atau *tenera* yang produktivitasnya mayoritas masih rendah. Bahan tanaman *tenera* mempunyai keseragaman pada karakter ketebalan cangkang yang sedang, namun mempunyai keragaman yang tinggi dari segi pertumbuhan vegetatif dan produktivitas tandan buah segar (TBS) per ha per tahun (Gillbank, 2003).

Peningkatan produktivitas yang signifikan diperlukan untuk mencapai potensi produksi. Di samping pemupukan yang tepat dan kultur teknis lain yang intensif, tindakan lain yang dapat meningkatkan produktivitas adalah penggunaan bahan tanaman klonal dari induk (ortet) berproduktivitas tinggi yang dihasilkan melalui kultur jaringan. Penggunaan bahan tanaman klonal berproduksi tinggi (*high yielding clonal planting materials*) menyebabkan rata-rata produksi kelapa sawit antar-populasi lebih seragam dan terjadi pergeseran ke kanan pada puncak kurva distribusi produksi atau peningkatan produksi tandan buah (kg/pohon) yang signifikan. Dari hasil studi di Malaysia dilaporkan bahwa penggunaan bibit klonal kelapa

sawit dari induk (ortet) yang berproduksi tinggi menghasilkan produksi tandan buah segar 20-40% lebih tinggi dan produksi minyak per hektar 30% lebih tinggi dibandingkan dengan populasi tanaman yang menggunakan bibit asal benih DxP (Ng *et al*, 2003). Peningkatan produksi tandan buah segar per hektar karena penggunaan bibit klonal juga dilaporkan oleh Alwee *et al.* (2010). Berdasarkan percobaan terhadap 50 klon kelapa sawit koleksi FELDA yang ditanam menggunakan bibit klonal dan hasilnya dibandingkan dengan hasil dari penggunaan bibit D x P, terbukti bahwa 98% dari klon-klon yang menggunakan bibit klonal menghasilkan 6 ton minyak sawit/ha atau lebih dan sebanyak 48% dari klon yang ditanam menggunakan bibit klonal mampu menghasilkan 8 ton minyak sawit per hektar atau lebih dibandingkan dengan penggunaan bibit D x P (Alwee *et al.*, 2010).

Di samping untuk perbanyak tanaman *tenera* elit berproduksi tinggi, manfaat lain penggunaan perbanyak klonal kelapa sawit melalui kultur jaringan di antaranya adalah untuk (1) perbanyak tanaman *interspecific hybrids Elaeis guineensis* x *E. oleifera* yang hanya sebagian yang fertil namun seringkali tahan terhadap hama dan penyakit; (2) perbanyak tetua *dura* dan *pisifera* unggul untuk produksi benih kelapa sawit biklonal atau semi-klonal, serta (3) untuk memfasilitasi rekayasa genetika (Kushairi *et al.*, 2010). Benih biklonal adalah benih yang dihasilkan dari hibridisasi tetua klon *dura* dan klon *pisifera* terpilih, sedangkan benih semi-klonal diproduksi dari klon *dura* terpilih dan *pisifera* normal. Penggunaan benih semi klonal yang dihasilkan dari satu tetua klonal ini lebih ekonomis dibandingkan dengan benih biklonal karena penggunaan fasilitas kultur jaringan dibatasi. Di samping itu, benih semi klonal ini masih menghasilkan produksi minyak 10-20% lebih

tinggi daripada tanaman DxP normal, dan produsen benih kelapa sawit dapat mengeksploitir daya gabung umum terbaik dari tetua-tetua *dura* dan *pisifera* terpilih (Kushairi *et al.*, 2010).

Di samping berbagai kelebihan dari penggunaan bibit klonal kelapa sawit, teknologi ini masih menghadapi berbagai kendala. Teknik perbanyakan kelapa sawit melalui embriogenesis somatik *in vitro* terdiri dari beberapa tahap yang masing-masing memerlukan pengerjaan yang intensif dan memerlukan operator berkeahlian khusus. Di samping itu, secara umum efisiensi proses dari awal hingga akhir tergolong masih sangat rendah.

Keberhasilan produksi bibit klonal kelapa sawit berproduksi tinggi sangat tergantung dari program pemuliaan yang menghasilkan benih dan bibit kelapa sawit berproduksi tinggi yang nantinya diseleksi untuk digunakan sebagai ortet atau tanaman induk sumber eksplan. Proses perbanyakan klonal kelapa sawit melalui kultur jaringan dimulai dari seleksi dan penanganan ortet elite. Pemilihan ortet harus dilakukan dengan kriteria tertentu yang mencerminkannya sebagai pohon kelapa sawit yang benar-benar berproduksi tinggi, misalnya FELDA dari Malaysia menggunakan kriteria ortet yang secara konsisten menghasilkan minyak sawit 9 ton/ha/th atau lebih, mempunyai nisbah oil/bunch > 30%, dengan pertambahan tinggi tanaman < 0.5 m/tahun (Alwee *et al.*, 2010).

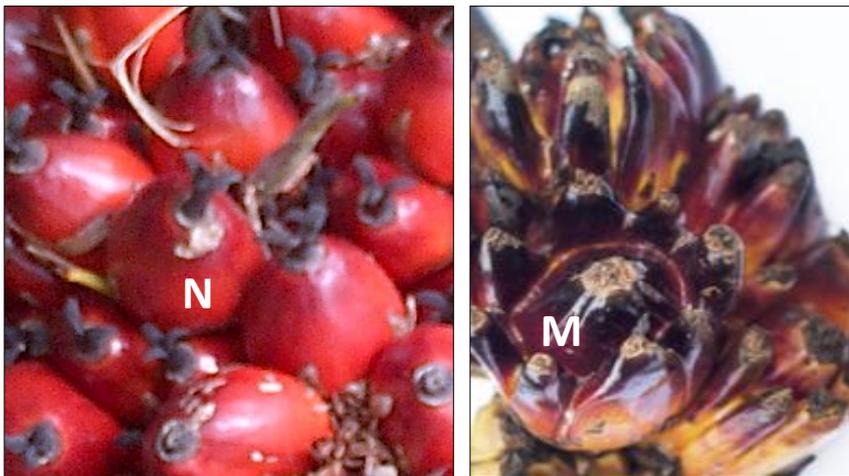
Jumlah planlet yang dihasilkan dari satu ortet sangat bervariasi karena rendahnya efisiensi dan tingginya pengaruh faktor genetik ortet terhadap daya regenerasinya melalui embriogenesis. Alwee *et al.* (2010) melaporkan bahwa dari satu ortet, planlet yang dihasilkan berkisar antara 100 hingga 10 000. Di samping itu, karena lambatnya pertumbuhan pucuk kelapa sawit, maka setelah pengambilan 'umbut' atau spear dari

ortet sebagai bahan eksplan, maka dengan perawatan yang intensif, dari ortet tersebut baru dapat dipanen lagi 'umbut'nya sebagai sumber eksplan setelah tiga hingga lima tahun. Dengan demikian, untuk *scaling up* produksi bibit klonal, ketersediaan ortet yang berkualitas dalam jumlah yang cukup banyak harus terpenuhi untuk menjamin produksi panlet dalam jumlah tertentu secara kontinyu. Persyaratan seperti ini hanya dapat dipenuhi jika program pemuliaan berjalan dengan baik dan menghasilkan benih DxP berproduksi tinggi secara berkelanjutan.

Kendala berikutnya adalah pada rendahnya efisiensi proses embriogenesis somatik dari eksplan daun, tingkat keahlian operator, dan persyaratan yang ketat untuk *quality control* pada setiap tahapan kultur jaringan. Proses regenerasi tanaman dari eksplan daun kelapa sawit melalui embriogenesis somatik bersifat padat karya, perlu keahlian dan ketelitian operator pada setiap tahapan dan tergolong lambat. Tingkat keberhasilan eksplan daun kelapa sawit membentuk kalus umumnya hanya sekitar 17-23 % (Yusnita dan Hapsoro, 2011b); Alwee *et al.*, 2010). Selanjutnya kalus primer harus disubkultur beberapa kali agar menjadi embriogenik dan menghasilkan embrio somatik atau embrioid. Persentase diferensiasi embrio somatik dari kalus hanya sekitar 5%. Setelah terbentuk kalus embriogenik, subkultur dapat dilakukan untuk proliferasi atau perbanyakan embrio somatik, sehingga dapat dihasilkan tunas-tunas, yang selanjutnya dapat diakarkan dan membentuk planlet.

Sejak ditemukannya protokol kultur jaringan kelapa sawit dan upaya produksi bibit klonal berskala besar akibat meningkatnya minat penanaman bibit klonal oleh berbagai perusahaan perkebunan kelapa sawit, pada tahun 1986 telah

teridentifikasi terjadinya keragaman somaklonal, yaitu abnormalitas pada buah tanaman kelapa sawit hasil kultur jaringan. Corley *et al.* (1986) menyebut abnormalitas tersebut dengan sebutan buah mantel. Buah sawit mantel memiliki struktur berdaging mirip karpel yang menggantikan stamen sehingga menyebabkan bentuk khusus seperti mahkota pada ujung buah kelapa sawit (Gambar 6.1b).



Gambar 6.1. Fenotipe buah mantel kelapa sawit *tenera* normal (N) dan buah abnormal mantel (M) (https://www.google.com/search?q=mantled+fruit+oil+palm&biw=1366&bih=657&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi51c-xjfnKAhXFBY4KHeunCIsQ_AUIBigB diakses 15 Februari 2016)

Pengaruh abnormalitas buah terhadap penurunan produksi minyak bisa sangat drastis, karena akumulasi minyak pada mesokarpnya jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan pada buah normal (Rival, 2000; Rival & Parveez, 2005). Abnormalitas buah mantel ini telah disimpulkan sebagai fenomena epigenetik dan tergantung pada tingkat

keparahannya. Tanaman abnormal dapat sembuh menjadi normal seiring dengan berjalannya waktu. Namun demikian, karena proses penyembuhan yang cukup lama, ditambah dengan proses pengulturan *in vitro* pada saat produksi bibit klonal (2-4 tahun) dan juvenil kelapa sawit yang lama serta belum ditemukannya metode identifikasi dini buah mantel, maka terjadinya abnormalitas buah mantel ini dianggap telah menyebabkan defisit dan ketidakefisienan dari segi produksi minyak, penggunaan infrastruktur bioteknologi, area tanam, waktu dan tenaga terampil (Jaligot *et al.*, 2011). Untuk menguak misteri penyebab abnormalitas, mendapatkan marker molekuler pengidentifikasi dini abnormalitas dan mengatasi terjadinya abnormalitas buah mantel, berbagai penelitian mendalam telah dilakukan dan banyak data telah terkumpul. Beberapa group peneliti dan konsorsium, telah mengumumkan sekuens lengkap dari genom kelapa sawit (Zieler *et al.*, 2010; Wahid, 2009). Terlepas dari masih banyak pertanyaan yang belum terjawab, beberapa hasil penting mengarah pada kesimpulan bahwa walaupun masih mempunyai banyak karakter aslinya, tanaman yang mempunyai buah mantel secara morfologi maupun molekuler mengalami mutasi pada gen-gen MADS-box, yaitu gen-gen penyandi protein kunci dalam perkembangan bunga dan buah dan adanya kemungkinan keterlibatan *transposable element* (Jaligot *et al.*, 2011). Analisis transkriptom dari bunga dan buah normal vs buah mantel juga telah dilakukan (Shearman *et al.*, 2013). Hasil penelitian monumental terkini telah dipublikasi oleh Ong-Abdullah *et al.* (2015), yang menyimpulkan bahwa varian somaklonal buah mantel pada kelapa sawit disebabkan oleh hipo-metilasi pada retrotransposon LINE (yang ada kaitannya dengan transposon Karma pada padi), yaitu pada intron gen homeotic

DEFICIENS, serta terkait dengan intron *splicing* dan penghentian transkripsi (*termination*). Metilasi yang padat pada sisi epialel Karma Bagus (*the Good Karma epiallele*) diduga menghasilkan buah normal.

Untuk meningkatkan efisiensi produksi bibit klonal, para peneliti telah menemukan dan terus mengembangkan sistem kultur suspensi sel dengan media cair (Tarmizi & Zaiton, 2007) dan *temporary immersion system* (Sumaryono *et al.*, 2008) yang jauh lebih cepat dan efisien menghasilkan propagul serta menghasilkan bibit klonal dengan persen abnormalitas yang lebih rendah. Peningkatan efisiensi produksi bibit klonal tentunya juga bermakna peningkatan efisiensi dari segi biaya, sehingga produksi bibit klonal kelapa sawit menjadi layak secara ekonomi.

Daftar Pustaka

- Alwee SSRS, SH.Roowi, AK Teng, AZ Othman. 2010. Progress of oil palm tissue culture in FELDA and its challenges. Paper presented in International Seminar of Advances in Oil Palm Tissue Culture. International Society of Oil Palm Breeders. Yogyakarta, 2010.
- Anderson WC. 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture.I. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Comb.Proc. Int Plant Prop Soc 25: 129-135.
- Baksha R, R Alam, MZ Karim, SA Mannan, BP Podder, ABMM Rahman. 2003. Effect of auxin, sucrose and pH level on in vitro rooting of callus induced micro shoots of sugarcane (*Saccharum officinarum*). J Biol Sci 3(10):915-920.
- Beyl CA. 2000. Getting started with tissue culture- media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises* (Chapter3). 2nd Edition. Trigiano, RN and DJ Gray (Eds). CRC Press LLC. Boca Raton, Florida. p: 21-38 of 454p.
- Bové J. 1988. Plant mollicutes: phloem-restricted agents and surface contaminants. Acta Hort 225:163-166.

- Breure K. 2003. The search for yield in oil palm: basic principles. In: *Oil Palm, Management for large and Sustainable yields*. H von Uexküll & R Härdter (Eds). International Potash Institute. Kassel. Germany. p:59-98.
- Capellades M, M Fontarnau, C Carulla, P Debergh. 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J Am Soc Hort Sci* 115:141-145.
- Capitani F & MM Altamura. 2004. Exogenous calcium enhances the formation of vegetative buds, flowers and roots in tobacco pith explants cultured in the absence of exogenous hormones. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77: 1-10.
- Cassels AC. 1994. Problem in tissue culture: culture contamination. In: *Micropropagation, technology and Application*. PC Debergh & RH Zimmerman (Eds). Kluwer Academics Publishers. 484p.
- Christianson ML. 1987. Causal events in morphogenesis. In: *Plant Tissue and Cell Culture*, Alan R Liss, New York, pp 45-55.
- Christianson ML & DA Warnick. 1985. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis. *In Vitro Dev Biol-Plant* 112: 494-497.
- Christianson ML & DA Warnick. 1988. Organogenesis in vitro as a developmental process. *HortSci*. 23: 515-519.
- Corley, RHV, JN Barrett, LH Jones. 1977. Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. *Oil Palm News* 22:2-8.
- Corley RHV.1985. Yield potentials of plantation crops. In: *Potassium in the Agricultural system of the humid tropics. 19th Colloquium of the International Potash Institute. Bangkok. Thailand 1985*. IPI, Basel. Switzerland, pp: 61-80.

- Corley RHV, CH Lee, LH Law, CY Wong. 1986. Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter (Kuala Lumpur)* 62:7.
- Debergh PC & LJ Maene. 1981. A scheme for the commercial propagation of ornamental plant by tissue culture. *Sci Hortic* 14: 335-445.
- Debergh PC, Y Harbaoui, R Lemour. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant* 53: 181-187.
- Din AK. 2009. Role of oil palm breeding in wealth creation and quality of life. Keynote Paper. Proceedings of the 8th Malaysia Congress on Genetics, 4-6 August 2009. Genting Highlands, Malaysia.
- Ebert A & HF Taylor. 1990. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss Org Cult* 20: 165-172
- Ebert A, F Taylor, J Blake. 1993. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss Org Cult* 33: 157-162.
- Eeuwens CJ, S Lord, CR Donough, V Rao, G Vallejo, S Nelson. 2002. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70: 311-323.
- Fridborg G, M Pedersen, L-E Landstrom, T Eriksson. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol Plant* 43: 104-106.

- Fu XP, SH Yang, MZ Bao. 2008. Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). In *Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 44:194–202.
- GAPKI. 2014. Refleksi Industri Kelapa Sawit 2013 dan Prospek 2014. <http://www.gapki.or.id/Page/PressReleaseDetail?guid=d414bf22-e99e-4cbd-9305-1deb5d019f4e>. Diakses 1 Desember 2015.
- Gahan PB & EF George. 2008. Adventitious regeneration. In: *Plant Propagation By Tissue Culture*. 3rd edition. Volume 1. The Background. George EF, M.A. Hall and G-J De Klerk (Eds). Springer. Dordrecht, The Netherland. 501p.
- Gamborg OL, RA Miller, K Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*. 50: 151-158.
- George EF & G-J de Klerk. 2008. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In: *Plant Propagation By Tissue Culture*. 3rd edition. Volume 1. The Background. George EF, MA Hall and G-J de Klerk (Eds). Springer. Dordrecht, The Netherland. 501p.
- George EF & PC Debergh. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. In: *Plant Propagation By Tissue Culture*. 3rd edition. Volume 1. The Background. George EF, M.A. Hall and G-J de Klerk (Eds). Springer. Dordrecht, The Netherland. 501p.
- George EF. 1993. *Plant Propagation Through Tissue Culture*. Exegetic Press. The Netherlands.
- Gillbanks RA. 2003. Standard agronomic procedures and practices. In: *Oil Palm, Management for large and Sustainable yields*. International Potash Institute. Kassel. Germany. p: 115-150.

- Gray DJ. 2000. Nonzygotic embryogenesis. In: *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. 2nd Edition. Trigiano, RN and DJ Gray (Eds). CRC Press LLC. Boca Raton, Florida. 454p.
- Haccius B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorph*. 28: 74-81.
- Hapsoro D & Yusnita, 1997. Micropropagation of vanilla using apical meristems. *Jurnal Agrotropika* II(1):1-5.
- Hapsoro D. 1999. Effects of gelling agents and sucrose concentrations on in vitro shoot proliferation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.)
- Hapsoro D, S Lukito, TE Sukmaratri, Herwindarti, Yusnita. 2006. Perbanyak in vitro nanas Smooth Cayenne (*Ananas comosus* L.): Pengaruh jenis klon dan subkultur, produksi bibit dan keragaman tanaman di lapangan. Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman . Institut Pertanian Bogor. Bogor, 1-2 Agustus 2006.
- Hapsoro D, AP Febrianie, Yusnita. 2012. In vitro shoot formation on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus as affected by benzyladenine concentrations. *J. Agron. Indonesia* 40(1): 56-61
- Hapsoro D, HFK Jannah, Yusnita. 2015. Multiplikasi tunas pisang 'Raja Bulu' (*Musa spp.* AAB) in vitro pada media yang mengandung benziladenin dan kinetin. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi VI: Inovasi Sains dan Teknologi untuk Ketahanan Pangan dan Kemandirian Energi. Bandar Lampung, 3 November 2015. LPPM Universitas Lampung.
- Hartmann HT, DE Kester, FT Davies Jr., RL Geneve. 2011. *Plant Propagation: Principles and Practices*. Eighth edition. Prentice Hall. Boston, Columbus, Indianapolis, New York, San Francisco, Tokyo. 913p.

- Hausman JF, C Kevers, T Gaspar. 1995. Auxin-polyamine interaction in the induction rooting phase of poplar shoots raised in vitro. *Physiol Plant* 92:201–206; 1995.
- Hicks GS. 1994. Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 301:10-15.
- Hicks GS. 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *Bot Rev* 46:1-23.
- Hilae A & S Te-Chato. 2005. 2005. Effect of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Songklanarin J Sci Tech* (Supplement 3): 629-635.
- Hopkins WG & NPA Hüner. 2009. *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Son, Inc. NJ-USA. 503p.
- Jacquemard JC. 1998. *Oil Palm* (The Tropical Agriculturalist). Macmillan Education Ltd.in cooperation with CTA, London, UK. 144p.
- Jalani BS, SC Cheah, N Rajainadu, A Darus. 1997. Improvement of palm oil through breeding and biotechnology. *J Amer Oil Chem Soc* 74(11): 1451-1455.
- Jaligot E, S Adler, E Debladis, T Beule, F Richaud, P Ilbert, EJ Finnegan, A Rival. 2011. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the *in vitro*-regenerated oil pal *Elaeis guineensis*. *Annals of Bot.* doi:10.1093/aob/mcq266:1-10.
www.aob.oxfordjournals.org. Diakses 10 Desember 2015.
- Janarthanam B & S Seshadri. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 44:84–89.
- Jansen MAK, H Booij, JHN Schel, SC De Vries. 1990. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep* 9:221-223.

- Kane M. 2000. Propagation from preexisting meristems. In: *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. 2nd Edition. Trigiano, RN and DJ Gray (Eds). CRC Press LLC. Boca Raton, Florida. 454p.
- Knudson 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *Amer Orchid Soc Bull* 15: 214-217.
- Konan EK, JY Kouadio, A Flori, T Durand-Gasselin, A Rival. 2007. Evidence for an interaction effect during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 43:456-466.
- Kushairi A, AH Tarmizi, I Zamzuri, M Ong-Abdullah, RS Kamal, SE Ooi, N Rajainadu. 2010. Production , performance and advances in oil palm tissue culture. Paper presented at the International Seminar on Advances in Oil Palm Tissue Culture, organized by the International Society for Oil Palm Breeders (ISOPB), held on 29 May 2010, Yogyakarta.
- Lee N, HY Wetzein, HE Sommer. 1988. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*- and *in vivo*-developed sweetgum leaves. *J Am Soc Hort Sci* 113: 167-171.
- Lloyd G & B McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Intl Plant Prop Soc Proc* 30:421-427.
- Machakova I, E Zazimalova, EF George. 2008. Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors. In: *Plant Propagation By Tissue Culture*. 3rd edition. Volume 1. *The Background*. George EF, M.A. Hall and G-J De Klerk (Eds). Springer. Dordrecht, The Netherland. 501p.
- McDaniel CN. 1984. Competence, determination, and induction in plant development. In: *Pattern Formation, a Primer in Developmental Biology*, GM Malacinski and SV Bryant, Eds. MacMilan, New York. Pp 393-411.

- Merkle SA, HD Wilde, HE Sommer.1993. In vitro culture of *Liriodendron tulipifera*. In. *Micropropagation of Woody Plants*. MR Ahuja (Ed). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.p 281-302.
- Mok MC, DWS Mok, JE Turner, CV Mujer. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortSci*. 22(1): 1194-1197.
- Moshkov IE, GV Novikova, MA Hall, EF George. 2008. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic acid, their analogues and inhibitors; Miscellaneous compounds. In: EF George, MA Hall and G-J De Klerk (Eds). *Plant Propagation By Tissue Culture* 3rd Edition Volume 1. Springer. Dordrecht,The Netherland. p 227-281.
- Murashige T & F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann Rev Plant Physiol* 25: 135-166.
- Murphy DJ. 2009. Global oil yield: Have we got it seriously wrong?. *AOCS Newsletters*, August, 2009.
- Ng SK, H von Uexküll, R Härdter. 2003a. Botanical aspects of the oil palm relevant to crop management. In: *Oil Palm, Management for large and Sustainable yields*. H. von Uexküll & R Härdter (Eds). International Potash Institute. Kassel. Germany. p:1-26.
- Ng SK, TK Cheong, KC Haw, HSH Oii, LK Yee, P Kayaroganam, H von Uexküll, R Härdter. 2003b. Clonal Oil Palm: Production, yield performance and nutritional. In: *Oil Palm, Management for large and Sustainable yields*. H. von Uexküll & R Härdter (Eds). International Potash Institute. Kassel. Germany. p:99-114.

- Nitsch JP & C Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Nourissier S & O Monteuis. 2008. In vitro rooting of two *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis* mature clones. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 44:263-272.
- Ong-Abdullah M, JM Ordway, N Jiang, SE Ooi, SY Kok, N Sarpan, N Azimi, AT Hashim, Z Ishak, SK Rosli, FA Malike, NA Bakar, M Marjuni, N Abdullah, Z Yaakub, MD Amiruddin, R Nookiah, R Singh, ET Low, KL Chan, N Azizi, SW Smith, B Bacher, MA Budiman, A Van Brunt, C Wischmeyer, M Beil, M Hogan, N Lakey, CC Lim, X Arulandoo, CK Wong, CN Choo, WC Wong, YY Kwan, SS Alwee, R Sambanthamurthi, RA Martienssen. 2015. *Nature* 525 (7570): 533-7.
- Opeke LK. 1982. *Tropical Tree Crops*. John Wiley and Sons. Chichester, New York, Toronto, Singapore, Brisbane (Chapter 13).
- Owolarafe OK, MT Olabige, MO Faborode. 2007. Physical and mechanical properties of two varieties of fresh oil palm fruit. *Journal of Food Engineering* 78: 1228-1232.
- Pacheco G, RF Gagliardi, LA Carneiro, J FM Valls, E Mansur. 2008. Plant regeneration in *Arachis stenosperma* Krapov. and W. C. Gregory from roots and calluses derived from leaflets of *in vitro* plants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 44(1):14-17.
- Pasqualetto PL, RH Zimmerman, I Fordham. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 14:31-40.
- Palm Oil Facts and Figures 2014, Sime Darby: http://www.simedarby.com/upload/Palm_Oil_Facts_and_Figures.pdf, diakses 30 Nov 2015).

- Patcharapisutsin W & K Kanchanapoom. 1996. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) callus. *J Sci Soc Thailand* 22: 13-20.
- Perera PIP, DMD Yakandawala, V Hoher , J-L. Verdeil, LK Weerakoon. 2009. Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96:171-180.
- Prem D, K Gupta, G Sarkar, A Agnihotri. 2008. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 93:269-282.
- Purkayastha J, T. Sugla, A Paul, S Solleti, L. Sahoo. 2008. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev.Biol Plant* 44(5):442-447.
- Purseglove JW. 1975. *Tropical Crops : Monocotyledons*. English Language Book Society/ Longman. England. 609p.
- Qaddoury A & M Amssa. 2004. Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxydase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date palm offshoots. *Bot Bull Acad Sin* 45:127-131; 2004.
- Rajesh MK, E Radha, A Karun, VA Parthasarathy. 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm-The effect of exogenous polyamines. *Plant Cell Tiss Org Cult* 75: 41-47.
- Rao PS & TR Ganapathi. 1993. Micropropagation of palms. In: *Micropropagation of Woody Plants*. MR Ahuja (Ed). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/ London. 507p.

- Rival A, F Bernard, Y Mathieu. 1997. Changes in peroxidase activity during in vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Scientia Hort.* 71:103–112..
- Rival A, L Bertrand, T Beule, P Trouslot, P Lashermes. 1998. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breeding* 117 (1):73-76.
- Rival A 2000. Somatic embryogenesis in oil palm. In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. SM Jain, PK Gupta, RJ Newton (Eds.). Kluwer Academic Publisher. Dordrecht.
- Rival A & M Parveez. 2005. *Elaeis guineensis*, Oil Palm. In: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. R Litz (ed.). *Biotechnology in Agriculture Series* no 29. Wallingford, UK: CABI Publishing. USA. p113-143.
- Roberts DR, BS Flinn, DT Webb, FB webster, BC Sutton. 1990. Abscisic acid and indole-3 butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiol Plant* 78: 355-360.
- Schenk RV & AC Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.
- Scholten HJ & RLM Pierik. 1998. Agar as gelling agent: differential biological effects in vitro. *Sci Hortic* 77:109-116.
- Shearman JR, C Jantasuriyarat, D Sangsrakru, T Yoocha, A Vannavichit, S Tragoonrung, S Tangphatsornruang. 2013. Transcriptome analysis of normal and mantled developing oil palm flower and fruit. *Genomics* 101: 306-312.
- Shriram V, V Kumar, MG Shitole. 2008. Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 44(3):186-193.

- Skoog F & CO Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11: 118-131.
- Smith WK & LH Jones. 1970. Plant propagation through cell culture. *Chemistry and Industry* 44:1399-1401.
- Steinmacher DA, CR Clement, MP Guerra. 2007. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 89:15-22.
- Stoltz LP. 1971. Agar restriction of the growth of excised mature irish embryos. *J Amer Soc Hort Sci* 96: 611-614.
- Sumaryono, I Riyadi, PD Kasi, G Ginting. 2008. Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in temporary immersion system. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 1 (2): 109-114.
- Sumaryono & I Riyadi. 2011. *Ex vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) derived from tissue culture. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 12 (2): 57-62.
- Sutter E & RW Langhans. 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.
- Syed RA, IH Law, RHV Corley. 1982. Insect pollination in oil palm: introduction, establishment and pollinating efficiency of *Elaeidobius kamerunicus* in Malaysia. *The Planter* 58: 567-561.
- Taiz L & E Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. Sinauer Associates Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 782p.
- Tamta S & LMS Palni & VK Purohit & SK Nandi. 2008. In vitro propagation of brown oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from seedling explants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 44:136-141.

- Tan CP. 2009. Overview current researches to improve competitiveness of palm oil products. Keynote article of the Annual Seminar & Results of National Strategic Researchs in Palm Oil Industries, held by Indonesian Oil Palm Society (MAKSI). Bogor IPB ICC, November 24-25th 2009. P 1-9.
- Tanimoto S & H Harada. 1986. Involvement of calcium in adventitious bud initiation in *Torenia* stem segments. *Plant Cell Physiol* 27: 1-10.
- Tarmizi AH & R Zaiton. 2007. Development of the MPOB fast transfer technique (MoFaTT) system for maintenance and maturation of oil palm culture aggregates. *J. Oil Palm Res* 19:435-439.
- Te-chato S, A Hilae, I Yeedum. 2004. Induction of embryogenic callus and plantlet regeneration from young leaves of high yielding mature oil palm. *Songklanakarinn J Sci Tech* 26: 617-628.
- Te-chato S & Hilae A. 2007. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. tenera). *J Ag Tech* 3(2): 345-357.
- Teixeira JB, MR Sondahl, EB Kirby. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell Tiss Org Cult* 34: 227-233.
- Teixeira JB, MR Sondahl, EG Kirby. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Rep* 13 : 247-250.
- Teixeira JB, MR Sondahl, T Nakamura, EG Kirby. 1999. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Org Cult* 40 (2): 105-111.
- Thorpe T, C Stasolla, EC Yeung, G-J de Klerk, A Roberts, EF George. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotics and pH effects, and support systems. In: *Plant Propagation By Tissue Culture*.

- 3rd edition. Volume 1. *The Background*. EF George, M.A. Hall and G-J De Klerk (Eds). Springer. Dordrecht, The Netherland. 501p.
- Thorpe TA & IS Kumar. 1993. Application of micropropagation to forestry. In: *Micropropagation, technology and Application*. PC Debergh & RH Zimmerman (Eds). Kluwer Academic Publishers. 484p.
- Toering A & GS Pullman, 2005. Modeling available 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a tissue culture medium containing activated carbon. *Plant Cell Tiss and Org Cult* 82: 179–188.
- USDA (United States Department of Agriculture) foreign Agricultural Service GAIN (global Agricultural Information Network) Report No. ID1508. 2013. Indonesia, Oilseed and Products Annual Report 2015. USA.
<http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Oilseeds%20and%20Products%20Annual%20Report%20Indonesia%203-20-2015.pdf>. Diakses tanggal 1 Desember 2015.
- Vacin EF & FW Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot Gaz* 110: 605-613.
- Van Niewkerk JP, RH Zimmerman, I Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. *HortSci* 21(3):516-518.
- Von Arnold S. 2008. Somatic embryogenesis. In: *Plant Propagation By Tissue Culture*. 3rd edition. Volume 1. The Background. George EF, M.A. Hall and G-J De Klerk (Eds). Springer. Dordrecht, The Netherland. pp 335-354.
- Wahid M. 2009. Sequencing the oil palm genome: the beginning. *Palm Oil: the balancing ecologies with economics*. PIPOC 2009 MPOB international Palm Oil Congress. Kuala Lumpur. Malaysia.

- Wang SY, GL Steffens, M Faust. 1986. Breaking bud dormancy in apple with plant bioregulator thidiazuron. *Phytochem* 25: 311-317.
- Williams EG & G Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57:443-462.
- Winkelman T, T Geier, W Preil. 2006. Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86:319-327.
- Yusnita & D Hapsoro. 2013. Embriogenesis somatik dan regenerasi tunas in vitro pada tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Poster disajikan pada Seminar Tahunan MAKSI, Bogor, 25 September 2013.
- Yusnita & D Hapsoro. 2011a. *In vitro* organogenesis of two *Sansevieria* cultivars on different concentrations of benzyladenine (BA). *Agrivita Journal of Agric Sci* 33(2): 147-153.
- Yusnita & D Hapsoro. 2011b. *In vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. *Hayati J Biosci* 8(2): 61-65.
- Yusnita S, RL Geneve, ST Kester. 1990. Micropropagation of a white flowering form of eastern redbud. *J Environ Hort* 8: 177-179.
- Yusnita. 1990. Micropropagation of white flowering eastern redbud (*Cercis canadensis* var. Alba). Master of Science Thesis. The University of Kentucky. Lexington, Kentucky-USA. 100p.
- Zieler H, T Richardson, A Schwarzdz. 2010. Whole-genome shotgun sequencing of the oil palm and *Jatropha* genomes. *Plant & Animal Genomes XVIII Conference*. San Diego, CA. USA.

Kamus Istilah

- Adenda kompleks : Suatu bahan (misalnya jus tomat, jus kecambah, buah pisang, dan lain-lain) yang ditambahkan ke dalam media kultur jaringan yang berdampak positif pada pertumbuhan dan perkembangan kultur. Disebut kompleks karena bahan tersebut berisi beragam zat organik dan anorganik. Disebut adenda karena bahan tersebut merupakan tambahan saja, yang tidak mencirikan suatu nama media tertentu.
- Agen osmotikum : Suatu zat dalam media kultur jaringan yang menyebabkan penurunan potensial osmotik media. Sukrosa, selain sebagai sumber energi, adalah sebagai agen osmotikum.
- Aklimatisasi : Suatu perlakuan yang diberikan kepada planlet yang sudah terbiasa tumbuh *in vitro* agar mampu tumbuh *ex vitro*, yaitu mampu tumbuh dalam kondisi eksternal (rumah kaca atau lapang)
- Aseptik : Kondisi bebas dari mikroorganisme (bakteri, dll)

- Autotrofik : Mampu menghasilkan makanannya sendiri, tidak tergantung pada organisme lain.
- Bibit klonal : Bibit tanaman yang dihasilkan dari perbanyakan secara vegetatif. Populasi bibit klonal secara genetik seragam.
- Caulogenesis : Proses pembentukan tunas dalam sistem kultur jaringan tanaman
- Dediferensiasi : Proses perubahan sel atau kumpulan sel dari kondisi yang mempunyai fungsi tertentu menjadi sel dalam kondisi yang belum mengarah pada fungsi apa. Misalnya sel-sel epidermis daun, yang tentunya sudah mempunyai fungsi, dapat mengalami dediferensiasi menjadi sel-sel kalus yang pertumbuhannya belum mengarah menuju ke fungsi apa.
- Diferensiasi : Proses perubahan sel atau kumpulan sel dari kondisi yang belum mengarah ke suatu fungsi menjadi sel atau kumpulan sel dalam kondisi yang mempunyai fungsi tertentu.
- Embriogenesis : Proses pembentukan embrio
- Heterotrofik : Tidak mampu menghasilkan makanannya sendiri, tergantung pada organisme lain.
- Kalus embriogenik : Kalus dalam kondisi sudah mengarah menjadi embrio. Jika dipaparkan pada lingkungan tertentu kalus embriogenik berkembang menjadi embrio.
- Keragaman somaklonal : Istilah ini umumnya dipakai pada populasi tanaman hasil perbanyakan dengan kultur jaringan tanaman, yang menunjuk pada pengertian keragaman genetik dan/atau

	epigenetik yang diakibatkan oleh proses kultur jaringan.
Kompeten	: Istilah ini digunakan pada proses pertumbuhan dan perkembangan sel. Sel dikatakan kompeten jika sel tersebut siap untuk merespons terhadap stimulus morfogenik tertentu.
Organogenesis	: Proses pembentukan organ.
Ortet	: Tetua sumber eksplan
Pemantapan eksplan	: <i>Culture establishment</i> : Tahap pertama dari tahapan perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan
Pemuliaan molekuler	: Pemuliaan tanaman yang menggunakan teknik molekuler
Propagul	: Bahan perbanyakan, misalnya tunas. Setiap dikulturkan satu tunas menjadi beberapa tunas.
<i>Pulse treatments</i>	: Perlakuan untuk merangsang pembentukan akar pada planlet dengan cara mengkulturkan planlet pada media yang mengandung auksin konsentrasi relatif tinggi selama beberapa hari kemudian memindahkan planlet ke media tanpa zat pengatur tumbuh.
Regenerasi	: Proses menjadi tanaman utuh atau tunas. Regenerasi tunas (<i>shoot regeneration</i>) adalah proses menjadi tunas, misalnya dari kalus atau bagian tanaman tertentu misalnya potongan daun, potongan hipokotil, dll. Regenerasi tanaman (<i>plant regeneration</i>) yaitu proses menjadi tanaman, misalnya dari embrio somatik.

- Rekayasa genetika : Suatu teknik untuk memodifikasi karakter genetik organisme dengan secara langsung mengintegrasikan DNA ke dalam genom organisme tersebut atau menghilangkan sebagian DNA dari genomnya.
- Repetitive somatic embryogenesis* : Proses pembentukan embrio somatik secara berulang-ulang. Sejumlah embrio somatik dikulturkan. Dari masing-masing embrio somatik tersebut muncul sejumlah embrio somatik lagi. Dari setiap embrio somatik muncul lagi sejumlah embrio somatik. Begitu seterusnya. Padanan istilah ini adalah *secondary somatic embryogenesis*.
- Rhizogenesis : Proses pembentukan akar dari bagian tanaman.
- Screen house* : Rumah tumbuh tanaman yang dindingnya terbuat dari jala atau semacam saringan yang cukup rapat sehingga serangga sampai ukuran tertentu tidak dapat masuk ke dalam.
- Sumber karbon : Zat komponen media kultur yang berfungsi utama sebagai sumber atom C bagi metabolisme karbon dalam eksplan yang dikulturkan. Contoh sumber karbon: sukrosa.
- Support system* : Sistem yang digunakan agar tanaman yang dikulturkan *in vitro* dalam media kultur cair dapat berdiri.
- Tahap globular : Tahap pertama dari perkembangan embrio somatik. Setelah kalus embriogenik terbentuk, terjadi perkembangan embrio, yaitu tahap globular, hati, torpedo, dan tahap kotiledon.

Tahap hati	: Lihat keterangan tahap globular
Tahap torpedo	: Lihat keterangan tahap globular
Tanaman haploid	: Tanaman yang mempunyai n kromosom, atau setengah dari jumlah kromosom tanaman normal, yaitu $2n$.
Totipotensi	: Kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh pada waktu berada dalam kondisi lingkungan yang menguntungkan.
Tunas adventif	: Tunas yang tumbuh dari sel atau jaringan yang sebelumnya bukan bakal tunas.
Tunas samping	: Tunas yang tumbuh dari bakal tunas yang ada di ketiak daun. Disebut juga tunas aksilar.
Zat pengatur tumbuh	: Suatu zat bukan hara baik sintetik maupun alami yang dalam konsentrasi rendah dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Indeks

- 2,4-D 28, 35, 62, 70, 71,
79-82
Adenda kompleks 60
Agen osmotikum 59
Aklamatisasi 32, 37, 38, 75,
87, 89
Aktivator 55
Antesis 9
Arang aktif 34, 60, 63, 71,
78-82, 86, 87
Asam absisat 61
Asam askorbat 34, 78
Asam giberelat 64
Asam sitrat 34, 78
Aseptik 18-21, 32, 33, 39,
40, 46, 47
ATP 54
Auksin 20-22, 35, 56, 60-63,
70
Autoklaf 41-44
Autotrofik 38
Bibit klonal 15-17
Brassinosteroid 61
Caulogenesis 23
CPO 90, 91
Dediferensiasi 25-28
Diferensiasi 23, 26, 27, 29,
73
Dikamba 35, 62
Distilator 42-44
Dura 12, 15, 91-93
Eksokarp 10, 12
Eksplan 19, 20, 22, 23, 25,
28-30, 32-34, 36, 39-42, 46,
73-79, 82, 84, 93, 94
Elaeis guineensis. Jacq 1
Embrio somatik 21-23, 28-
31, 35, 36, 73, 74, 81-83, 86,
87, 94
Embriogenesis 23, 27, 29,
31, 35, 36, 73, 74, 81, 82, 93,
94
Embriogenik 29, 31, 35, 36
Endokarp 10, 12, 15
Endosperm 10, 12
Epikutikular 38
Etilen 61
Fase dediferensiasi 27
Fase diferensiasi 27
Fase ekspresi 26, 27
Fase induksi 27, 29
Filotaksi 3, 5, 6, 75, 76
Fluoresens 21
Fotoautotrofik 38
Fotoperiodisitas 21, 47
Fronde 3, 5, 75-77
Ganoderma 14
Gellan gum 66

Gelling agent 49, 66
 Gelrite 66
 Gibberelin 61, 64
 Hara makro 49, 50
 Hara mikro 50
Hardening 37
 HEPA 20, 46
 Heterotrofik 38
 Hidrogen peroksida 20
 Kalsium hipoklorit 20
 Kalus embriogenik 29, 31, 35, 36, 73, 74, 81, 82, 85, 86, 94
 Keragaman somaklonal 16, 95
 Kernel 2, 3, 10, 12
 Koenzim 59
 Kofaktor enzim 59
 Koleoptil 31
 Kompeten 25-27
 Lamina 3, 4, 73, 75, 77
Laminar air flow cabinet (LAF) 20, 46, 77
 Larutan stok 42, 43, 45, 67-71
Magnetic stirrer 71
 Meristematik 19, 30
 Merkuri klorida 20
 Mesokarp 2, 3, 10, 12
 Mio-inositol 60, 71
 Morfogenesis 23, 25
 Multiplikasi 32, 34, 35
 Multiseluler 29
 Nisbah seks 9
 Nitrat reduktase 53
 Nitrit reduktase 53
Nodal explant 23
 Nodul 29
 Non-embriogenik 29
 Ortet 15, 91-94
 Organogenesis 25, 27, 28, 36
 Pemantapan eksplan 32
 Pemuliaan molekuler 19
 Pemuliaan tanaman 13
 Pencoklatan 34
 Penghitaman 34
 Perak nitrat 20
 Perianth 9
 Pikloram 35, 62
 Pisifera 12, 15, 91, 92, 93
 Planlet 23, 32, 36-38, 74, 88, 89, 93, 94
 Plumula 13
 Polifenol 34
 Polifenol oksidase 34
 Pro-embrio 30, 31
 Progeni 14
 Propagul 32, 34-37, 39, 46, 97
Pulse treatments 87
 PVP 34
 Radikula 13
 Regenerasi 19, 22, 23, 36, 73, 75, 82, 86, 94
 Rekayasa genetika 19, 92
Repetitive somatic embryogenesis 74
 Rhizogenesis 23
Screen house 33
Shoot culture 55
 Sitokinin 20-24, 35, 56, 60-64, 70, 74
 Sitokrom oksidase 58
 Skutelum 31
 Sodium hipoklorit 20
Spears 5
Specialized cells 26
Spike 8, 9
Stirrer bar 71

Stomata 38
Subkultur 20, 24, 29, 36, 80,
83, 94
Sumber karbon 49, 58, 59
Support system 49
Tahap globular 30, 31
Tahap hati 30, 31
Tahap kotiledon 30
Tahap torpedo 30
Tanaman haploid 18
Tanaman induk 32
Tanaman kelapa sawit
kompak 14
Tandan buah 8, 10, 11, 13,
14, 15
Thidiazuron (TDZ) 35, 63
Timbangan analitik 42, 43
Totipotensi 21
Tunas adventif 22, 24, 25,
28, 35
Tunas samping 22-25, 35
Tween 20 77
Unsur makro 52, 53
Unsur mikro 52, 56, 57
Zat pengatur tumbuh (ZPT)
18, 20, 21, 26, 33, 35, 42, 49,
56, 61, 63, 65, 70



Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc. (lahir di Pematang 2 April 1961) adalah dosen dan peneliti di Jurusan Agroteknologi dan di Program Studi Magister Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Lampung (UNILA). Penulis yang sudah menjadi dosen sejak tahun 1986 ini menekuni bidang kajian fisiologi dan bioteknologi

tanaman. Pendidikan S1 bidang agronomi diselesaikannya di Institut Pertanian Bogor (IPB) tahun 1985, S2 bidang fisiologi tanaman di *University of Kentucky*, Lexington, Amerika Serikat, tahun 1991, dan S3 bidang bioteknologi tanaman diselesaikannya di IPB Bogor tahun 2005. Sebagian penelitian untuk disertasinya dikerjakan di *The University of Queensland*, Brisbane, Australia. Beberapa topik penelitian kultur jaringan tanaman yang telah dikerjakan meliputi tanaman kedelai, kacang tanah, anggrek, vanili, nanas, semangka, duku, pisang, melinjo, tebu, dan kelapa sawit. Selain untuk maksud perbanyakan, sebagian penelitian kultur jaringan diarahkan untuk tujuan pemuliaan tanaman, misalnya mutagenesis *in vitro* untuk mendapatkan klon tebu unggul, identifikasi dan karakterisasi genotipe pisang lokal Lampung dan pemuliaan tanaman anggrek. Penelitian yang melibatkan teknik molekuler juga dilakukan oleh penulis, misalnya rekayasa genetika untuk mendapatkan kacang tanah resisten *peanut stripe virus* dan keragaman genetik tebu berdasarkan penanda molekuler RAPD. Dalam kegiatan akademiknya, penulis membimbing mahasiswa S1 dan S2 dalam melaksanakan penelitian. Selain mengajar Bioteknologi Pertanian, Fisiologi Tumbuhan, Pengantar Budidaya Tanaman dan Bahasa Inggris Profesi untuk mahasiswa S1 jurusan Agrteknologi, penulis juga mengajar mata kuliah Biokimia Tanaman, Kultur Jaringan Tanaman, Filsafat Ilmu dan Fisiologi Tanaman di Magister Agronomi UNILA. Dr. Dwi Hapsoro adalah Ketua Program Studi Magister Agronomi Universitas Lampung sejak tahun 2007 sampai sekarang.



Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc. adalah dosen dan peneliti di Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung (UNILA) sejak 1986 hingga sekarang. Penulis (lahir di Jombang, 3 Agustus 1961) menyelesaikan S1 jurusan agronomi di Institut Pertanian Bogor (IPB) tahun 1984, S2 bidang

hortikultura di *Department of Horticulture and Landscape Architecture University of Kentucky, USA*, tahun 1990, dan S3 bidang bioteknologi tanaman di IPB tahun 2005. Bidang kajian yang diteliti penulis adalah fisiologi dan bioteknologi tanaman, khususnya tentang penggunaan teknik kultur jaringan untuk perbanyakan dan pemuliaan tanaman. Kultur jaringan berbagai jenis tanaman telah dipelajari oleh penulis sejak 1991. Pengalamannya bekerja di laboratorium telah diajarkannya kepada banyak mahasiswanya, terutama melalui pembimbingan skripsi S1 dan tesis S2. Selain mengajar Fisiologi Tumbuhan, Pembiakan Vegetatif dan Pengantar Budidaya Tanaman untuk mahasiswa S1 Agroteknologi, penulis juga mengajar Kultur Jaringan Tanaman dan Fisiologi Tanaman di Magister Agronomi, dan menjabat kepala Laboratorium Ilmu Tanaman UNILA. Buku ini adalah buku keenam yang telah ditulisnya setelah (1) *Kultur Jaringan : Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*; (2) *Perbanyakan In Vitro Tanaman Anggrek*; (3) *Pemuliaan Tanaman Untuk menghasilkan Anggrek Hibrida Unggul*, (4) *Kultur Jaringan Tanaman Pisang* dan (5) *Kultur Jaringan Tanaman sebagai Teknik Penting Bioteknologi untuk Menunjang Pembangunan Pertanian* (yang merupakan pidato ilmiah dalam pengukuhan sebagai guru besar tetap Fakultas Pertanian bidang ilmu bioteknologi tanaman). Buku tentang kultur jaringan kelapa sawit ini penulis dedikasikan untuk Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Lampung, kedua buah hati penulis, Aby Hapsari, dan Indira Hapsarini, serta para mahasiswa yang haus ilmu pengetahuan dan teknologi.

KULTUR JARINGAN

Untuk PERBANYAKAN KLONAL

Kelapa Sawit

(*Elaeis guineensis* Jacq.)

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan penghasil minyak paling efisien di antara tanaman-tanaman penghasil minyak. Perbanyak kelapa sawit biasanya dilakukan dengan biji, yang merupakan hasil persilangan antara kelapa sawit tipe *dura* dan *pisifera*. Hasil persilangan tersebut menghasilkan kelapa sawit tipe *tenera*. Tipe *tenera* inilah yang ditanam di kebanyakan perkebunan komersial. Oleh karena populasi tipe *dura* dan *pisifera* sebagai tetua adalah beragam secara genetik, maka populasi turunannya, yaitu tipe *tenera*, juga beragam, termasuk beragam dalam hal produktivitasnya: sebagian tinggi, sebagian rendah. Jika individu-individu kelapa sawit tipe *tenera* yang produktivitasnya tinggi diseleksi, lalu diperbanyak secara klonal, maka akan diperoleh populasi tanaman kelapa sawit tipe *tenera* yang produktivitasnya tinggi. Untuk kelapa sawit, sejauh ini perbanyak klonal hanya bisa dilakukan dengan teknik kultur jaringan.

Buku yang ada di tangan pembaca ini memaparkan teknik tersebut, yaitu "Kultur Jaringan untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit". Secara detil tatacaranya diuraikan dalam buku ini, termasuk teori yang mendasarinya dan sarana dan prasarana yang dibutuhkan. Mudah-mudahan buku ini bermanfaat di tengah-tengah langkanya publikasi ilmiah mengenai prosedur detil kultur jaringan kelapa sawit. Publikasi langka, kemungkinan besar karena tingginya nilai komersial teknologi ini.

AURA
ANUGRAH UTAMA RAHARJA

 Aura-Publishing
 @Aura_Publishing
 www.aura-publishing.com

