

PENGADAAN BENIH TANAMAN MELALUI TEKNIK KULTUR JARINGAN

PENGADAAN BENIH TANAMAN MELALUI TEKNIK KULTUR JARINGAN

Ketersediaan benih tanaman berkualitas dalam jumlah yang sesuai dengan kebutuhan sangat menentukan keberhasilan usaha dibidang pertanian. Kebutuhan benih berkualitas dalam agribisnis tanaman di Indonesia setiap tahun semakin meningkat, terutama untuk jenis-jenis tanaman yang bernilai ekonomi tinggi yang sulit atau lambat jika dikembangkan melalui cara konvensional.

Perbanyakan tanaman melalui teknik kultur jaringan merupakan teknologi yang potensial untuk produksi benih berbagai jenis tanaman dengan kualitas dan kuantitas yang lebih baik dibanding dengan cara konvensional.

Buku ini memuat penjelasan teknis tentang pelaksanaan teknik kultur jaringan di laboratorium dan tahapan dalam perbanyakan berbagai jenis tanaman yang mempunyai nilai ekonomi tinggi atau yang akan dieksploitasi secara luas.

PENGADAAN BENIH TANAMAN MELALUI TEKNIK KULTUR JARINGAN



Pusat Perpustakaan dan Penyebaran Teknologi Pertanian
Jl. Ir. H. Juanda 20
Bogor 16122 - Jawa Barat
Telp: 0251 - 8321746, 8324394
Fax: 0261 - 8326561
pustaka@litbang.deptan.go.id
<http://pustaka.litbang.deptan.go.id>



Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Kementerian Pertanian

**PENGADAAN BENIH TANAMAN
MELALUI
TEKNIK KULTUR JARINGAN**

PENGADAAN BENIH TANAMAN MELALUI TEKNIK KULTUR JARINGAN

Oleh:
Deden Sukmadjaja

Editor:
Ika Mariska



**IAARD
PRESS**

**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
KEMENTERIAN PERTANIAN
2014**

KATA PENGANTAR

Penggunaan benih tanaman yang bermutu merupakan salah satu faktor penting dalam peningkatan produktivitas tanaman. Namun, ketersediaan benih tanaman bermutu sering kali terbatas, antara lain karena rendahnya faktor multiplikasi dalam proses perbanyakan dengan menggunakan metode konvensional. Perbanyakan tanaman melalui teknik kultur jaringan merupakan salah satu cara yang paling banyak digunakan apabila metode perbanyakan secara konvensional sulit dilakukan.

Pemanfaatan teori yang paling mendasar dalam kultur jaringan tanaman ialah kemampuan sel tanaman dan organ untuk berkembang menjadi tanaman yang lengkap dan dapat tumbuh dewasa. Teknik kultur jaringan seperti kultur meristem, kultur tunas, dan pembentukan somatik embriogenesis secara intensif telah digunakan sebagai prosedur dalam mikropropagasi tanaman. Aplikasi teknik kultur jaringan dalam produksi tanaman telah menjadi bagian dari industri perbenihan komersial yang bernilai ekonomi tinggi di seluruh dunia.

Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Balitbangtan) telah melakukan penelitian perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro* sejak tahun 1986. Sampai saat ini telah banyak dihasilkan metode perbanyakan secara *in vitro* pada berbagai jenis tanaman pertanian maupun kehutanan.

Buku ini secara sederhana menyajikan prinsip-prinsip umum teknik kultur jaringan dalam perbanyakan tanaman disertai contoh-contoh proses mikropropagasi pada beberapa jenis tanaman. Buku ini diharapkan dapat memberikan informasi dan menjadi petunjuk teknis bagi masyarakat tentang kultur jaringan dan pemanfaatannya dalam perbanyakan tanaman.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Balitbangtan, atas kepercayaan dan kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyusun buku ini. Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada Prof. (R). Dr. Ika Mariska dan rekan-rekan peneliti di Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, BB Biogen, yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam penyusunan buku ini.

Semoga buku ini bermanfaat bagi masyarakat Indonesia, terutama yang akan memanfaatkan teknik kultur jaringan untuk perbanyakan tanaman.

Bogor, Desember 2014

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
BAB I. METODE KULTUR JARINGAN UNTUK PERBANYAKAN BENIH TANAMAN	1
Mikropropagasi melalui Kultur Tunas	2
Mikropropagasi melalui Kultur Tunas Adventif	4
Mikropropagasi melalui Embrio Somatik	5
BAB II. LABORATORIUM KULTUR JARINGAN	7
Organisasi Laboratorium Kultur Jaringan	7
Ruang pencucian	7
Ruang persiapan media	7
Ruang penanaman/transfer	9
Ruang kultur	9
Peralatan dan Bahan Dasar dalam Laboratorium Kultur Jaringan	10
BAB III. TEKNIK STERILISASI	13
Sterilisasi Ruang Transfer dan Ruang Kultur	13
Sterilisasi Peralatan Gelas dan Peralatan Lain	13
Sterilisasi Media	14
Sterilisasi Bahan Tanaman	14
BAB IV. MEDIA KULTUR	17
Komponen-komponen dalam Media Kultur	17
Hara makro	17
Hara mikro	18
Karbon dan sumber energi	19
Vitamin	19
Asam amino dan sumber nitrogen lainnya	20
Bahan organik kompleks	20
Bahan pematat dan penyangga biakan	21
Zat pengatur tumbuh	22
Pembuatan Media Kultur	23
Larutan stok dan larutan induk	24
Hara makro	24
Hara mikro	25
Vitamin	25
Zat pengatur tumbuh	26

BAB V. TAHAP-TAHAP DALAM PERBANYAKAN TANAMAN MELALUI KULTUR JARINGAN	27
Pemilihan Eksplan	27
Mendapatkan Kultur Aseptik	27
Multiplikasi atau Penggandaan Tunas/Propagul	27
Persiapan Biakan/Planlet untuk Aklimatisasi	28
Tahap Aklimatisasi	28
BAB VI. PRODUKSI BENIH PADA BEBERAPA JENIS TANAMAN MELALUI TEKNIK KULTUR JARINGAN	29
Pisang (<i>Musa</i> spp.)	29
Kentang (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	32
Tebu (<i>Saccharum</i> spp.)	36
Jati (<i>Tectona grandis</i>)	40
Nilam (<i>Pogostemon cablin</i> Benth.)	44
Buah Merah (<i>Pandanus conaideus</i> Lam.)	45
Ubi Kayu (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	47
Abaka (<i>Musa textilis</i> Nee.)	49
Estimasi Produksi Benih	52
DAFTAR PUSTAKA	53

BAB I

METODE KULTUR JARINGAN UNTUK PERBANYAKAN BENIH TANAMAN

Kultur jaringan tanaman adalah suatu metode atau teknik mengisolasi bagian tanaman (protoplasma, sel, jaringan, atau organ) dan menumbuhkannya pada media buatan dalam kondisi aseptik di dalam ruang yang terkontrol sehingga bagian-bagian tanaman tersebut dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman lengkap. Penggunaan teknik kultur jaringan pada awalnya hanya untuk membuktikan teori "totipotensi" (*total genetic potential*) yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann (1838) yang menyatakan bahwa sel tanaman sebagai unit terkecil dapat tumbuh dan berkembang apabila dipelihara dalam kondisi yang sesuai. Saat ini, teknik kultur jaringan digunakan bukan hanya sebagai sarana untuk mempelajari aspek-aspek fisiologi dan biokimia tanaman, tetapi sudah berkembang menjadi metode untuk berbagai tujuan seperti perbanyakan tanaman, perbaikan sifat tanaman, produksi tanaman yang bebas penyakit, transformasi genetik, produksi senyawa metabolit sekunder, dan penyimpanan plasma nutfah tanaman. Sampai saat ini teknik kultur jaringan untuk tujuan perbanyakan tanaman atau mikropropagasi merupakan yang paling banyak diaplikasikan terutama untuk tanaman yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Melalui kultur jaringan dapat dihasilkan benih yang berkualitas (*true to type*), tegar, seragam, dan bebas penyakit terutama virus.

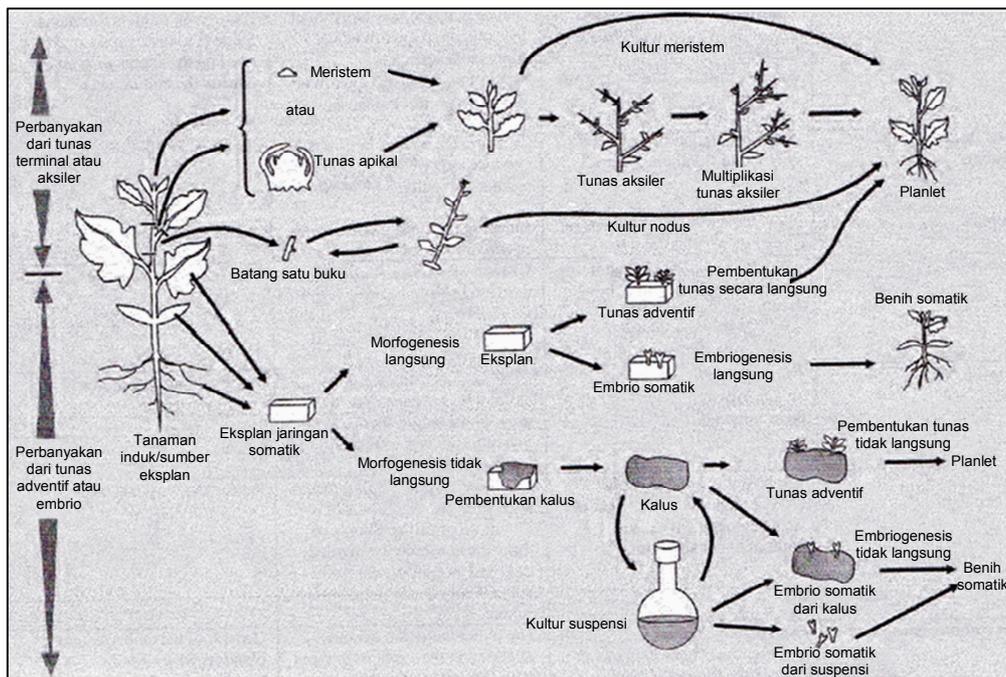
Pemanfaatan bioteknologi kultur jaringan untuk tujuan propagasi tanaman telah banyak diaplikasikan pada tanaman semusim maupun tanaman tahunan, seperti pada tanaman hortikultura (pisang, jeruk, apel, stroberi, dan berbagai tanaman hias), pada tanaman perkebunan dan kehutanan (kopi, kakao, kelapa sawit, jati, jabon, eukaliptus, akasia, dan lain-lain). Beberapa kelebihan penggunaan teknik kultur jaringan dibanding dengan cara konvensional ialah (1) faktor perbanyakan tinggi, (2) tidak bergantung pada musim karena lingkungan tumbuh *in vitro* terkendali, (3) bahan tanaman yang digunakan sedikit sehingga tidak merusak pohon induk, (4) tanaman yang dihasilkan bebas dari penyakit meskipun dari induk yang mengandung patogen internal, dan (5) tidak membutuhkan tempat yang sangat luas untuk menghasilkan tanaman dalam jumlah besar. Di samping itu, terdapat masalah yang banyak dihadapi dalam mengaplikasikan teknik kultur jaringan, khususnya di Indonesia, seperti modal investasi awal yang cukup besar dan sumber daya manusia yang menguasai dan terampil dalam bidang kultur jaringan tanaman masih terbatas. Permasalahan lain yang sering muncul ialah tanaman hasil kultur jaringan sering berbeda dengan tanaman induknya atau mengalami mutasi. Hal ini dapat terjadi karena penggunaan metode perbanyakan yang salah, seperti frekuensi subkultur yang terlalu tinggi, perbanyakan melalui organogenesis yang tidak langsung (melalui fase kalus), penggunaan zat pengatur tumbuh (ZPT) dengan konsentrasi terlalu tinggi dan

mempunyai daya aktivitas yang kuat, serta periode kultur *in vitro* yang terlalu lama.

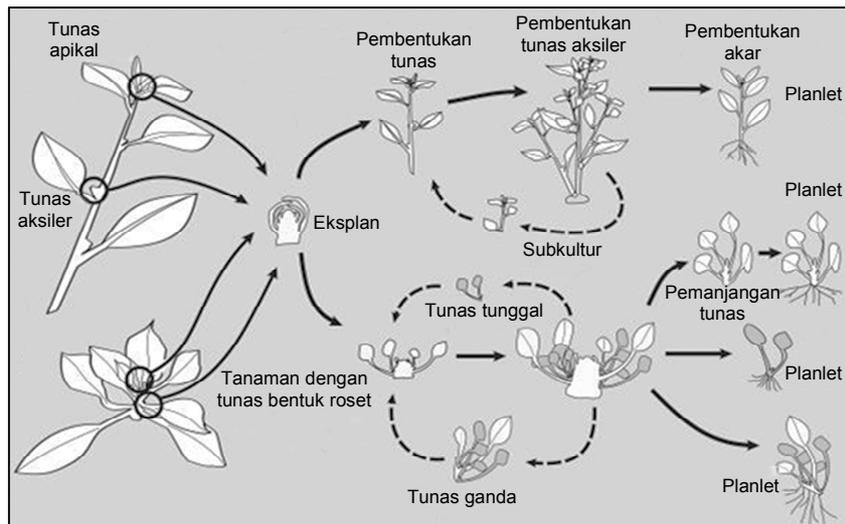
Beberapa metode perbanyak tanaman melalui kultur jaringan yang sering digunakan ialah kultur tunas, kultur tunas adventif, dan embrio somatik. Ilustrasi dari metode perbanyak tanaman melalui kultur *in vitro* dapat dilihat pada Gambar I.1.

Mikropropagasi melalui Kultur Tunas

Salah satu aspek terpenting dalam kultur jaringan adalah kemampuan untuk beregenerasi dan memperbanyak tanaman (mikropropagasi). Mikropropagasi melalui kultur tunas dilakukan dengan cara menstimulasi perkembangan tunas, baik tunas apikal maupun lateral yang mempunyai titik tumbuh berupa meristem dengan tujuan menggandakan tunas (multiplikasi) melalui pembentukan cabang-cabang tunas aksiler (Gambar I.2). Kultur tunas merupakan cara yang paling mudah dan banyak diaplikasikan dalam mikropropagasi karena metode ini lebih menjamin stabilitas genetik dari tanaman yang dihasilkan (*true to type*). Pada metode ini tunas diberi perlakuan ZPT untuk memecahkan dormansi dan akan menghasilkan cabang-cabang tunas (multiplikasi tunas). Tunas-tunas tersebut kemudian dipisahkan dan diakarkan untuk menghasilkan tanaman lengkap. Alternatif lain, tunas-tunas tersebut digunakan sebagai bahan tanaman untuk memperbanyak selanjutnya.



Gambar I.1. Prinsip dasar metode mikropropagasi. Sumber: George dan Debergh (2008).



Gambar 1.2. Perbanyakan melalui kultur tunas apikal dan aksiler. Sumber: George and Debergh (2008).

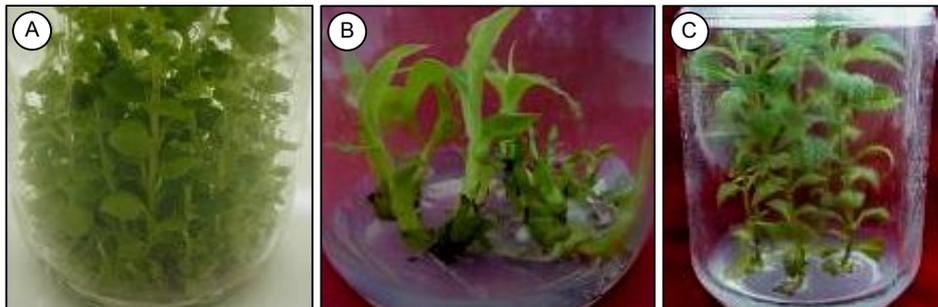
Berbagai tanaman hias dan tanaman berkayu sudah diperbanyak secara komersial melalui proliferasi tunas. Proliferasi tunas menghasilkan peningkatan jumlah tunas yang berlipat per periode kulturnya. Dalam periode enam bulan dimungkinkan dapat dihasilkan satu juta bahan tanaman dari satu eksplan bahan tanaman asal (Phillips dan Hubstenberger, 1996).

Sebagian besar tanaman mempunyai kemampuan untuk beregenerasi melalui organogenesis atau embriogenesis somatik, tetapi sedikit jenis tanaman yang bisa keduanya. Beberapa spesies ada yang mudah beregenerasi melalui kultur kalus atau sel, sementara spesies lain hanya dapat beregenerasi melalui proses pembentukan tunas adventif. Pemilihan jenis tanaman dan tujuan dari suatu penelitian akan menentukan prosedur regenerasi dan perbanyakan tanaman. Pendekatan proses regenerasi yang berbeda dari spesies tanaman yang sama akan menghasilkan laju perbanyakan yang berbeda. Proliferasi tunas aksiler dan kultur batang satu buku adalah teknik yang paling banyak digunakan dalam perbanyakan secara komersial dan menunjukkan variasi yang paling sedikit di antara hasil tanaman yang telah diperbanyak (Chu, 1992). Gambar 1.3 merupakan contoh metode perbanyakan pada beberapa tanaman melalui multiplikasi tunas aksiler. Sementara itu, organogenesis tunas adventif dan regenerasi tanaman dari kalus baik melalui organogenesis maupun embriogenesis somatik akan menghasilkan variasi yang lebih besar, meskipun laju perbanyakannya lebih tinggi.

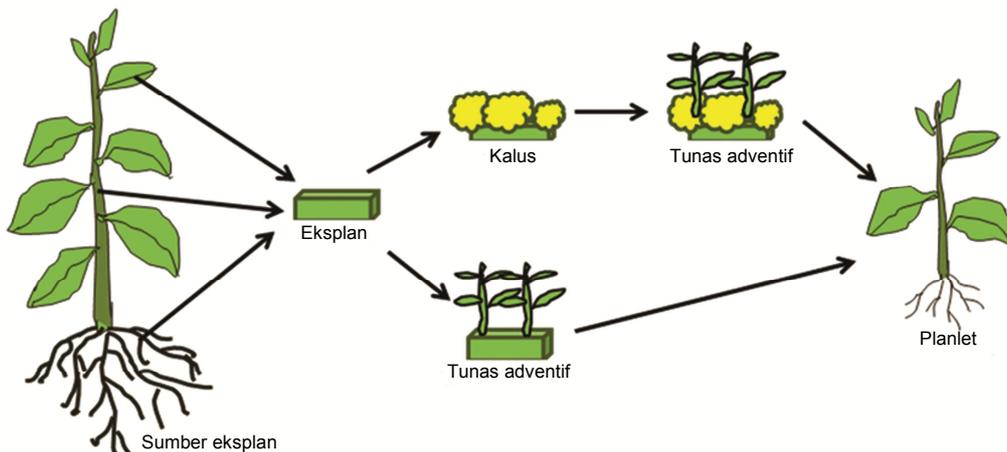
Mikropropagasi melalui Kultur Tunas Adventif

Regenerasi tanaman melalui kultur jaringan dapat pula ditempuh melalui penanaman potongan jaringan yang tidak meristematis (jaringan adventif) atau dari kultur kalus dan sel. Tunas aksiler dibentuk oleh jaringan meristem, sebaliknya regenerasi adventif terjadi pada lokasi yang tidak biasa (bukan daerah yang mempunyai titik tumbuh/meristem), seperti bagian di antara buku, jaringan daun, kotiledon atau daerah pemanjangan akar (Gambar I.4). Regenerasi tanaman secara adventif sering bergantung pada jaringan eksplan yang sudah terorganisasi, walaupun dapat pula terjadi dari kultur kalus dan sel yang bukan merupakan jaringan eksplan yang terorganisasi.

Pembentukan tunas atau akar adventif dapat diinduksi dari jaringan yang secara normal tidak menghasilkan organ-organ tersebut. Proses pembentukan tunas adventif lebih umum digunakan dibanding dengan embriogenesis somatik dan potensi laju multiplikasi tanamannya lebih besar dibanding dengan melalui tunas aksiler. Tunas atau akar adventif dapat dihasilkan secara langsung dari eksplan atau melalui tahap kalus terlebih dahulu (tidak langsung) (Gambar I.5).



Gambar I.3. Contoh multiplikasi tunas aksiler pada tanaman nilam (A), pisang (B), dan jati (C).

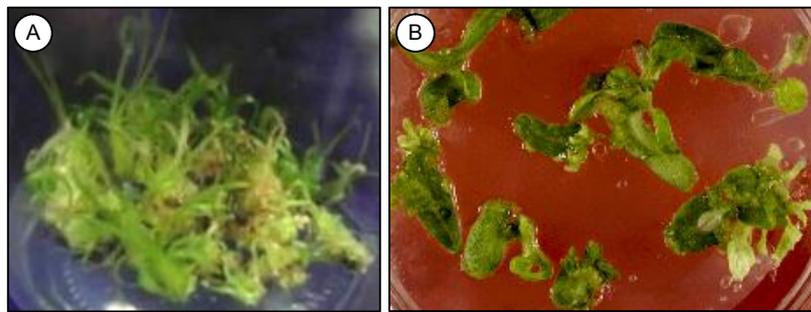


Gambar I.4. Perbanyakan melalui kultur tunas adventif.

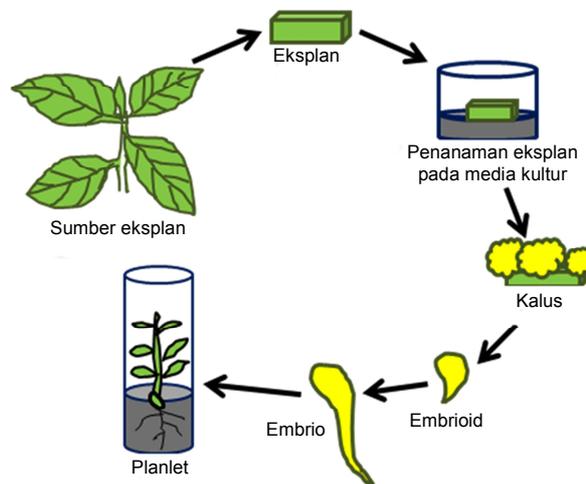
Pembentukan tunas adventif ditentukan oleh beberapa faktor yang saling memengaruhi, yaitu sumber eksplan, media, dan kondisi kultur. Untuk mencapai proses organogenesis yang optimum, masing-masing komponen mempunyai nilai kritis.

Mikropropagasi melalui Embrio Somatik

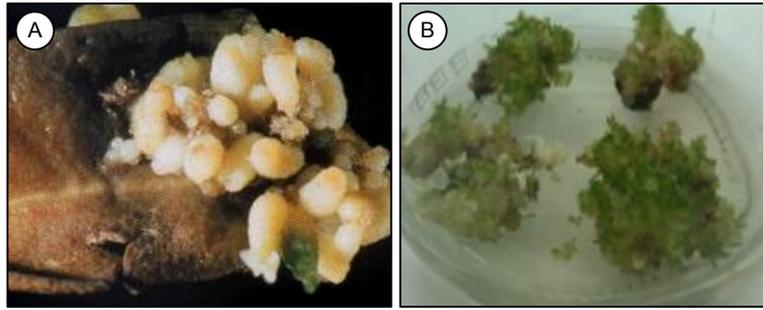
Regenerasi tanaman dapat melalui satu dari dua proses, organogenesis dan embriogenesis somatik. Organogenesis adalah pembentukan organ secara individu seperti tunas dan akar. Embriogenesis somatik adalah pembentukan embrio dari sel-sel aseksual (sel-sel somatik). Pembentukan embrio somatik bisa secara langsung maupun tidak langsung. Embriogenesis somatik langsung adalah pembentukan embrio somatik atau jaringan embriogenik secara langsung dari eksplan tanpa melalui pembentukan fase kalus, sedangkan embriogenesis somatik tidak langsung proses pembentukannya melalui fase kalus. Embriogenesis somatik langsung menunjukkan keseimbangan antara laju perbanyakan yang tinggi dengan sedikit penyimpangan genetik yang dihasilkan.



Gambar I.5. Contoh regenerasi tunas adventif tidak langsung (A) dan langsung (B).



Gambar I.6. Skema perbanyakan tanaman melalui pembentukan embrio somatik secara tidak langsung.



Gambar 1.7. Pembentukan embrio somatik secara langsung pada tanaman kopi (A) (sumber Duchefa, 2008), dan embrio somatik tidak langsung pada tanaman tebu melalui fase pembentukan kalus (B).

Pada embriogenesis somatik terjadi pembentukan struktur bipolar yang mengandung meristem tunas dan akar, dan mengalami perkembangan yang sama dengan embrio zigotik. Skema perbanyakan tanaman melalui pembentukan embrio somatik secara tidak langsung dapat dilihat pada Gambar 1.6. Namun, pada sebagian besar tanaman, pembentukan embriogenesis somatik masih sulit, terutama pada tanaman monokotil dan tanaman tahunan berkayu. Mikropropagasi pada tanaman kopi merupakan salah satu contoh keberhasilan mengaplikasikan metode pembentukan embrio somatik untuk perbanyakan secara massal (Gambar 1.7 [A]).

Eksplan yang digunakan untuk mempelajari dan menginduksi embriogenesis dapat berupa jaringan somatik atau zigotik. Eksplan dari jaringan somatik yang berasal dari organ yang masih muda dan sel-selnya aktif berkembang serta jaringan meristem merupakan yang paling banyak digunakan. Eksplan dari jaringan zigotik yang sering digunakan ialah embrio zigotik muda (*immature zygotic embryo*). Jaringan pada embrio zigotik muda secara alami merupakan jaringan yang lebih embriogenik dibanding dengan eksplan lain dan lebih responsif dalam menginduksi embrio somatik. Umur embrio setelah penyerbukan harus dievaluasi untuk menentukan tahap induksi yang paling optimal.

BAB II

LABORATORIUM KULTUR JARINGAN

Organisasi Laboratorium Kultur Jaringan

Di laboratorium kultur jaringan, semua fasilitas mutlak harus terjaga kebersihannya. Debu dan spora mikroba yang berasal dari ruang kerja atau terbawa dari udara dapat menjadi sumber kontaminasi yang dapat menyebabkan kegagalan pertumbuhan biakan *in vitro*. Oleh karena itu, dalam perencanaan laboratorium kultur jaringan, fasilitasnya harus dirancang sedemikian rupa agar terhindar dari debu dan mudah dibersihkan. Akses ke laboratorium sebaiknya melalui suatu ruangan terpisah (koridor). Udara dari luar yang masuk ke dalam laboratorium harus melalui penyaring udara. Suhu ruangan di dalam laboratorium harus terkontrol, terutama di dalam ruang penanaman atau transfer dan ruang kultur.

Laboratorium kultur jaringan harus mempunyai aliran listrik yang cukup dan stabil. Sangat disarankan mempunyai generator untuk mengatasi terjadinya gangguan aliran listrik dari PLN. Gangguan aliran listrik dapat menyebabkan laboratorium berhenti beroperasi dan biakan *in vitro* yang dipelihara akan terganggu bahkan mengalami kegagalan dan kematian.

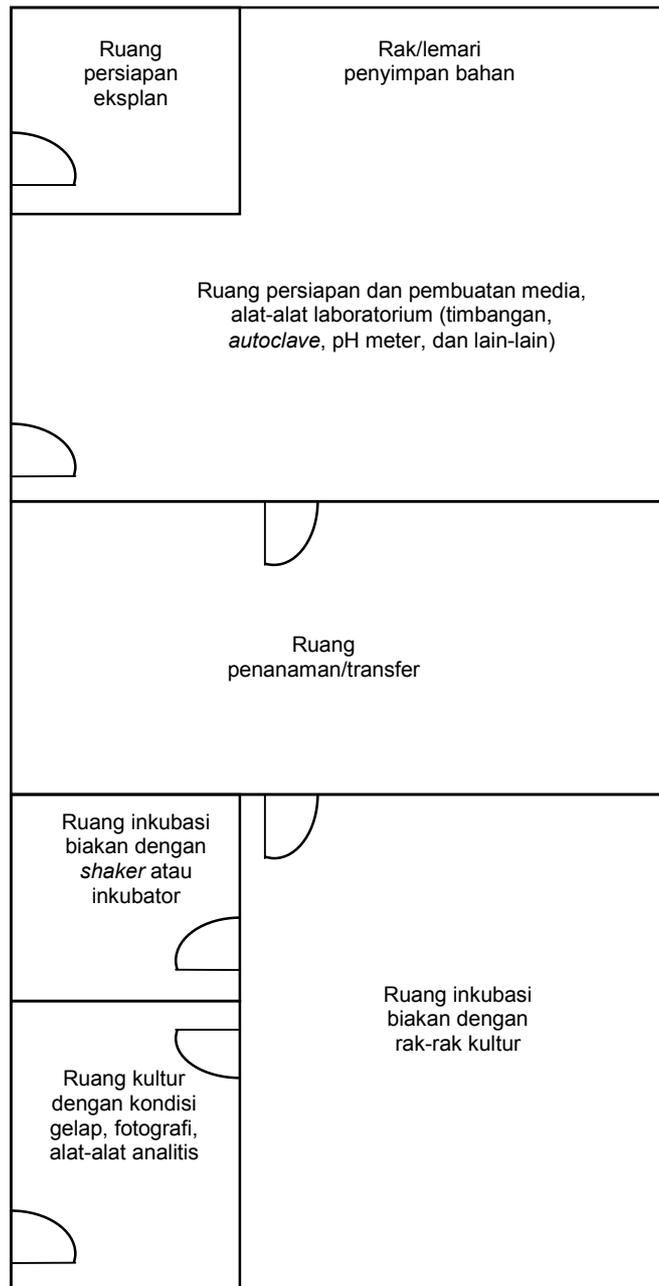
Sejumlah fasilitas yang harus tersedia, antara lain ruang pencucian, ruang persiapan media, sterilisasi dan penyimpanan, ruang transfer aseptik, ruang kultur atau inkubator yang lingkungannya terkontrol, serta ruang pengamatan dan koleksi data. Diagram laboratorium kultur jaringan yang ideal dapat dilihat pada Gambar II.1.

Ruang pencucian

Ruang pencucian harus mempunyai bak cuci, meja kerja yang terbuat dari bahan yang tahan terhadap asam dan basa, rak pengering dan saluran untuk air demineralisasi atau destilasi, ruang untuk tempat oven pengering, alat/mesin pencuci dan pengering, serta rak atau lemari penyimpanan alat.

Ruang persiapan media

Di dalam ruang persiapan media harus tersedia tempat untuk penyimpanan bahan-bahan kimia, gelas kultur dan penutupnya, dan peralatan gelas yang diperlukan untuk pembuatan media. Meja yang kokoh atau *bench* untuk penyimpanan *hot plate magnetic stirrer*, pH meter, timbangan, dan dispenser harus tersedia. Peralatan lain yang biasanya ada di ruang persiapan media, antara lain alat *vaccum*, *distilling unit*, bunsen, *refrigerator* (kulkas) dan *freezer* untuk penyimpanan larutan stok dan bahan kimia, *microwave*, kompor gas, oven, dan *autoclave* untuk sterilisasi media, peralatan gelas, dan peralatan lain.



Gambar II.1. Diagram laboratorium kultur jaringan tanaman.

Dalam pembuatan media kultur, bahan-bahan kimia yang digunakan harus yang bertaraf analitik dan penimbangannya harus baik dan benar. Agar lebih akurat, pembuatan media harus dilakukan tahap demi tahap dan bahan-bahan yang digunakan harus ditandai.

Air yang digunakan dalam pembuatan media harus berkualitas tinggi dan mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi. Air ledeng atau sumur tidak digunakan untuk pembuatan media karena mengandung kation (amonium, kalsium, besi, magnesium, natrium, dan lain lain), anion (bikarbonat, klorida, florida, fosfat, dan lain-lain), mikroorganisme (alga, jamur, bakteri), gas (oksigen, karbon dioksida, nitrogen), dan bahan lain (minyak, bahan organik, dan lain-lain). Air yang digunakan dalam kultur jaringan harus mempunyai standar tipe II (minimum), yaitu bebas pirogen, gas, dan bahan organik dan mempunyai konduktivitas elektrik kurang dari 1,0 $\mu\text{mho/cm}$.

Metode yang paling umum untuk pemurnian air standar tipe II ialah deionisasi yang diikuti dengan satu atau dua destilasi gelas. Deionisasi menghilangkan bahan yang bersifat ionik dan proses destilasi menghilangkan molekul organik, mikroorganisme, dan pirogen. Metode lain yang dapat digunakan untuk mendapatkan air murni tipe II ialah (1) penyaringan dengan cara absorpsi, dengan menggunakan karbon aktif untuk menghilangkan kontaminan organik dan bebas klorin; (2) penyaringan dengan membran, yang menghilangkan kotoran dan kontaminasi oleh bakteri; (3) *reverse osmosis*, yang menghilangkan sekitar 99% bakteri, bahan organik, dan kotoran lainnya.

Ruang penanaman/transfer

Teknik kultur jaringan dapat berhasil apabila dilakukan di laboratorium yang sangat bersih. Oleh karena itu, penanaman dan pemindahan atau transfer biakan dikerjakan di dalam ruang transfer steril atau *laminar air flow* (LAF).

LAF yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman ialah tipe horizontal dan mempunyai ruangan yang bebas dari partikel debu yang halus dan dilengkapi dengan sinar ultra violet (UV) serta unit penyaring udara. Penyaring udara harus mempunyai saringan udara dengan efisiensi tinggi atau *high-efficiency particulate air* (HEPA). Saringan HEPA harus mempunyai pori sekitar 0,3 μm dengan efisiensi kerja berkisar antara 99,97–99,99%. Semua permukaan ruang kerja dalam laminar harus dirancang dan mempunyai konstruksi sedemikian rupa sehingga debu dan mikroorganisme tidak terakumulasi dan permukaan tempat kerja mudah dibersihkan dan didisinfeksi.

Ruang kultur

Semua jenis kultur harus disimpan dalam tempat yang terkontrol, baik temperatur, sirkulasi udara, kelembaban maupun kualitas dan lamanya cahaya. Faktor-faktor lingkungan tersebut akan memengaruhi proses pertumbuhan dan diferensiasi biakan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Kultur protoplas, suspensi sel, dan kultur anthera paling sensitif terhadap kondisi lingkungan.

Suhu ruang kultur untuk pertumbuhan umumnya berkisar antara 15–30°C, dengan fluktuasi kurang dari $\pm 0,5^\circ\text{C}$, akan tetapi kisaran suhu yang lebih besar

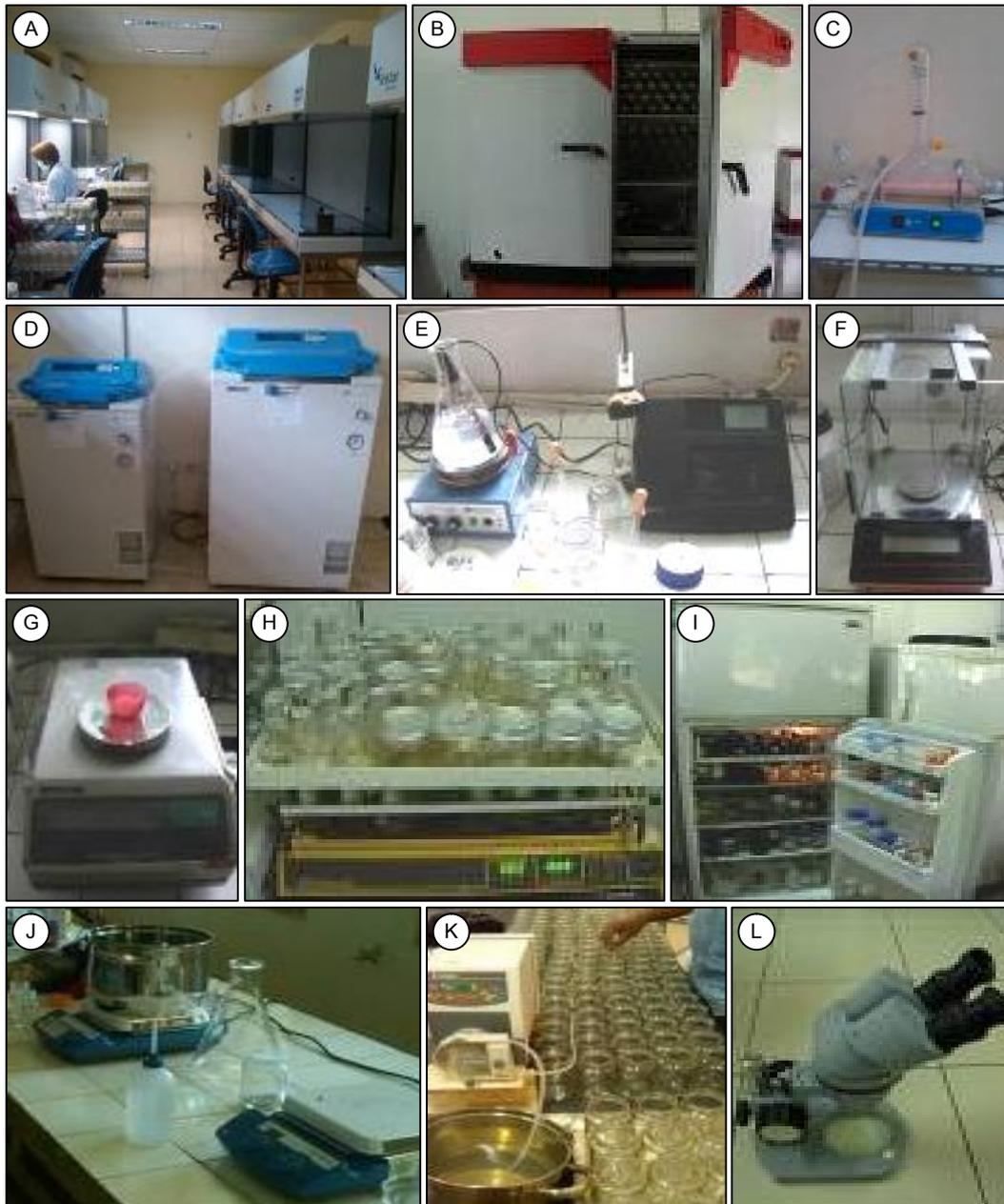
mungkin diperlukan untuk tujuan percobaan. Ruang kultur dilengkapi dengan lampu *flourescent* dengan intensitas cahaya antara 1.000–4.000 lux. Suhu dan cahaya harus dapat diprogram selama 24 jam. Umumnya penyinaran selama 16 jam dalam sehari. Ventilasi udara harus baik dengan kelembaban berkisar antara 20–98%.

Peralatan dan Bahan Dasar dalam Laboratorium Kultur Jaringan

Peralatan yang diperlukan dari suatu laboratorium umumnya ialah:

1. *Hot plate/magnetic stirrer* atau kompor
2. Peralatan gelas (gelas ukur, erlenmeyer) atau *stainless steel* untuk memanaskan dan melarutkan media
3. Alat sterilisasi dengan tekanan uap (*autoclave*)
4. pH meter
5. Timbangan (*analitical* dan *bench top loading*)
6. Gelas ukur gradual
7. Botol kultur dengan penutupnya
8. Dispenser
9. Alat diseksi (*spatula, scalpel* atau pinset, *forcep* atau pisau diseksi, gunting)
10. *Refrigerator*
11. *Distiling unit* atau *water deionizer*
12. Oven
13. *Microwave*
14. Mikroskop
15. Pipet ukur
16. *Shaker*
17. *Laminar air flow*
18. *Disinfectant*
19. Bahan kimia yang diperlukan untuk pembuatan media (lihat BAB IV).

Peralatan gelas yang digunakan di laboratorium kultur jaringan umumnya terbuat dari *pyrex*. Erlenmeyer dengan berbagai ukuran (50, 125, 250, 500, 1.000, atau 2.000 ml) digunakan untuk wadah kultur dan pembuatan media. Tabung gelas, cawan petri, botol *jam* atau bekas selai juga sering digunakan sebagai botol kultur. Peralatan gelas tersebut harus tahan panas selama proses sterilisasi dengan oven atau *autoclave*. Peralatan gelas lain yang biasanya digunakan ialah gelas piala, gelas ukur, pipet, dan labu ukur. Visualisasi peralatan laboratorium kultur jaringan tanaman dapat dilihat pada Gambar II.2 dan II.3.



Gambar II.2. Peralatan laboratorium kultur jaringan. A = *laminar air flow*; B = oven; C = alat destilasi; D = *autoclave*; E = pH meter; F = timbangan analitik; G = *benchtop balance*; H = *orbital shaker*; I = *refrigerator*; J = *hot plate magnetic stirrer*; K = dispenser media; L = mikroskop.



Gambar II.3. Peralatan laboratorium kultur jaringan. M = rak kultur; N = rak penyimpanan media; O = pipet berbagai ukuran; P = peralatan gelas; Q = saringan milipor; R = alat-alat diseksi.

BAB III

TEKNIK STERILISASI

Tahap awal yang sangat penting dalam teknik *in vitro* ialah sterilisasi bahan tanaman dan media serta terjaganya kondisi aseptik. Bakteri dan jamur merupakan dua kontaminan yang paling banyak dijumpai dalam kultur. Spora jamur sangat ringan dan ada di lingkungan. Apabila spora jamur kontak dengan media kultur dan kondisinya optimal untuk perkecambahan jamur, akan terjadi kontaminasi.

Sterilisasi Ruang Transfer dan Ruang Kultur

Sterilisasi ruang transfer dan ruang kultur yang paling baik adalah menggunakan sinar UV. Waktu sterilisasi bervariasi bergantung pada ukuran ruang transfer dan harus dilakukan ketika tidak ada kegiatan dalam ruang tersebut. Radiasi UV sangat berbahaya bagi mata dan kulit. Ruang transfer dapat juga disterilisasi dengan mencuci/mengepel 1–2 kali setiap bulan dengan bahan antijamur (fungisida) komersial. Di dalam ruang transfer terdapat alat untuk transfer tanaman atau LAF yang merupakan alat utama dalam memanipulasi kondisi aseptik. LAF sudah dilengkapi saringan udara khusus yang dinamai saringan HEPA. LAF biasanya sudah dilengkapi dengan lampu UV sehingga sterilisasinya dilakukan dengan UV dan diikuti dengan membasuh/melap permukaan tempat bekerja dalam laminar dengan alkohol 95% sebelum mulai bekerja.

Ruang transfer dan ruang kultur harus dibersihkan dengan sabun kemudian dilap dengan Na-hipoklorit (NaOCl) 2% (bahan pemutih pakaian komersial atau pembersih lantai lain yang mengandung disinfektan) atau alkohol 95%. Lantai ruangan dan dinding harus dibersihkan seminggu sekali dengan bahan yang sama.

Sterilisasi Peralatan Gelas dan Peralatan Lain

Peralatan yang terbuat dari metal, gelas, *aluminium foil*, dan lain-lain dapat disterilisasi dengan cara pengeringan dalam oven pada suhu 130–170°C selama 2–4 jam. Semua peralatan tersebut harus dibungkus sebelum dioven, tetapi jangan menggunakan kertas karena akan terdekomposisi pada suhu 170°C. Sterilisasi menggunakan *autoclave* tidak disarankan untuk peralatan yang terbuat dari besi karena akan berkarat.

Setelah disterilisasi dalam oven, peralatan diseksi yang akan digunakan di ruang transfer atau dalam LAF harus direndam dahulu dalam alkohol 96% kemudian dibakar di atas lampu bunsen. Teknik ini disebut sebagai sterilisasi pembakaran (*flame sterilization*). Teknik ini harus dilakukan dengan sangat hati-hati karena alkohol sangat mudah terbakar.

Autoclave merupakan metode sterilisasi dengan menggunakan tekanan uap air. Bahan-bahan atau alat yang dapat disterilisasi dengan *autoclave* antara lain kapas penutup tabung, saringan dari nilon, pakaian laboratorium, tutup plastik, peralatan gelas, pipet, air, dan media kultur. Hampir semua mikroba dapat mati bila disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 *psi* selama 15–20 menit.

Sterilisasi Media

Ada dua metode untuk sterilisasi media yang umum digunakan, yaitu dengan *autoclave* dan saringan membran. Media kultur, air destilasi, dan larutan yang stabil dapat disterilisasi dalam *autoclave* dengan menggunakan wadah yang ditutup dengan kapas, *aluminium foil* atau plastik. Namun, larutan dari bahan-bahan yang bersifat tidak stabil (*thermolabile*) harus menggunakan saringan.

Umumnya media disterilisasi dalam *autoclave* pada tekanan 15 *psi* dengan suhu 121°C. Untuk volume larutan per wadah yang sedikit (<100 ml), waktu yang dibutuhkan adalah 15–20 menit, tetapi untuk jumlah yang besar (2–4 l) selama 30–40 menit (Gambar III.1A). Tekanan jangan melebihi 20 *psi* karena dapat mengakibatkan dekomposisi karbohidrat dan bahan lain dalam media yang bersifat *thermolabile*.

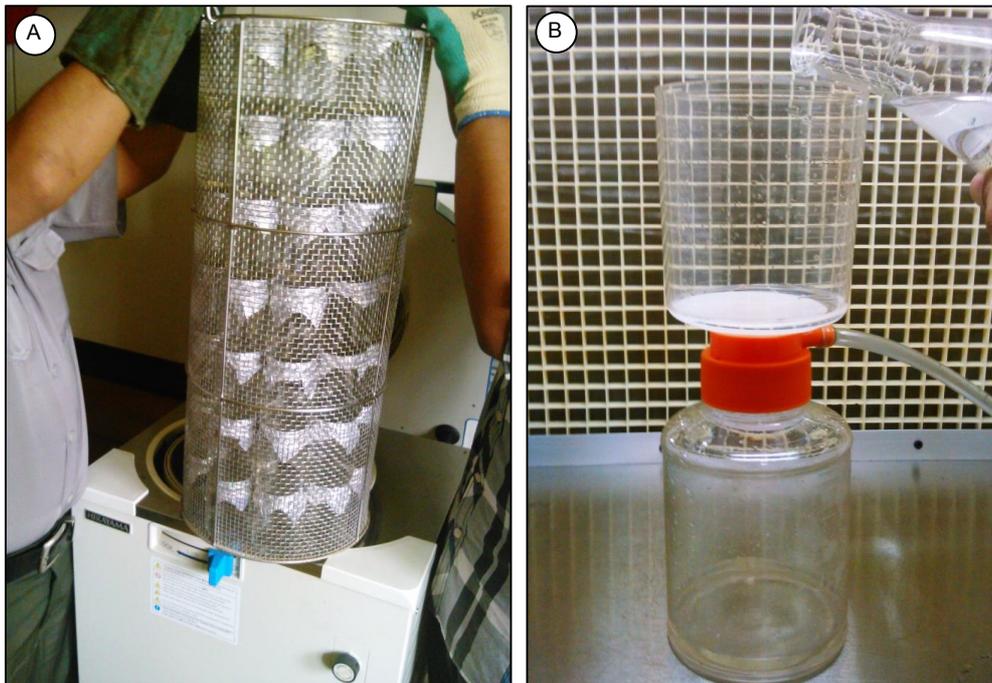
Beberapa senyawa dari kelompok protein, vitamin, asam amino, ekstrak tanaman, hormon, dan karbohidrat ada yang bersifat *thermolabile* yang mungkin akan terdekomposisi bila disterilisasi dengan *autoclave* sehingga harus disterilisasi dengan saringan. Saringan millipor yang mempunyai diameter $\pm 0,2 \mu\text{m}$ banyak digunakan untuk sterilisasi bahan yang bersifat *thermolabile*. Peralatan gelas untuk menampung media yang disterilisasi dengan saringan harus disterilisasi dahulu dengan *autoclave* (Gambar III.1B).

Media yang sebagian mengandung komponen *thermolabile* dapat dibuat dengan cara (1) larutan yang mengandung komponen *heat-stable* disterilisasi dengan *autoclave*, kemudian didinginkan sampai suhu 50–60°C dalam kondisi aseptik (biasanya dalam LAF); (2) pada bagian lain dalam kondisi aseptik, larutan yang mengandung komponen yang bersifat *thermolabile* disterilisasi dengan saringan milipor; dan (3) kedua larutan yang sudah disterilisasi dengan metode yang berbeda tersebut digabungkan dalam kondisi aseptik.

Sterilisasi Bahan Tanaman

Mendapatkan bahan tanaman yang steril merupakan hal yang sulit. Meskipun bermacam tindakan pencegahan sudah dilakukan, 95% kultur akan terkontaminasi apabila eksplan tidak didisinfeksi. Organ atau jaringan tanaman harus disterilisasi dengan larutan disinfektan karena sebagai bahan biologis tidak dapat dilakukan dengan cara pemanasan yang ekstrem. Larutan yang paling

banyak digunakan untuk sterilisasi bahan tanaman dapat dilihat pada Tabel III.1. Tidak ada metode baku untuk sterilisasi eksplan sehingga waktu perendaman dalam larutan disinfektan merupakan kisaran karena bergantung pada jenis bahan dan tanaman yang akan disterilisasi. Larutan yang digunakan harus yang aman bagi jaringan/eksplan, tetapi dapat membunuh kontaminan baik bakteri maupun jamur. Untuk meningkatkan efektivitas sterilisasi, ke dalam larutan sering ditambahkan TWEEN® 1–2 tetes.



Gambar III.1. Sterilisasi media. A = menggunakan *autoclave* untuk bahan yang bersifat *thermostabile*; B = menggunakan saringan milipor untuk bahan yang bersifat *thermolabile*.

Tabel III.1. Disinfektan yang umum digunakan untuk sterilisasi eksplan.

Disinfektan	Konsentrasi	Waktu perendaman (menit)
Kalsium hipoklorit	9–10%	5–30
Natrium hipoklorit*	0,5–5%	5–30
Hidrogen peroksida	3–12%	5–30
Etil alkohol	75–95%	1–5
Perak nitrat	1%	5–30
Merkuri klorida	0,1–1%	2–10
Antibiotik	4–50 mg/l	30–60
Benzalkonium klorida	0,01–0,1%	5–20

*Umumnya menggunakan bahan pemutih pakaian komersial dengan konsentrasi 10–30%.

Untuk tanaman berkayu, umbi, dan lain-lain, biasanya sebelum disterilisasi dengan larutan disinfektan harus dibersihkan dahulu dengan sabun dan dibilas dengan air mengalir, tetapi tidak untuk tanaman jenis herba. Semua permukaan eksplan yang disteriliasi harus terendam dalam disinfektan, dan setelahnya harus dibilas dengan akuades steril minimal tiga kali.

BAB IV MEDIA KULTUR

Komponen-komponen dalam Media Kultur

Salah satu faktor paling penting yang berkaitan dengan pertumbuhan dan morfogenesis jaringan tanaman ialah komposisi media kultur. Sumber hara yang dibutuhkan oleh sel-sel tanaman yang dikulturkan sama dengan yang dibutuhkan tanaman itu sendiri. Media kultur jaringan tanaman umumnya terdiri atas hara makro, hara mikro, vitamin, asam amino atau suplemen nitrogen lain, gula, bahan organik kompleks, bahan pematid (agar), dan ZPT. Beberapa formulasi media sudah umum digunakan dalam kultur jaringan dan sudah dikomersialkan. Media tersebut antara lain White, Murashige dan Skoog (MS), Gamborg *et al.* (B5), Gautheret, Schenk dan Hilderbrandt (SH), Nitch dan Nitch, Lloyd dan McCown Woody Plant Medium (WPM), dan lain-lain. Media MS, SH, dan B5 merupakan media yang kaya hara makro. Komposisi ketiga media tersebut dapat dilihat pada Tabel IV.1.

Hara makro

Hara makro terdiri atas enam unsur utama yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel dan jaringan tanaman, yaitu nitrogen (N), fosfor (P), kalium (K), kalsium (Ca), magnesium (Mg), dan sulfur (S). Konsentrasi optimum yang dibutuhkan untuk mencapai pertumbuhan maksimum bervariasi untuk setiap jenis tanaman. Untuk formulasi media seperti MS dan beberapa media lain, konsentrasinya sudah baku sesuai dengan yang direkomendasikan.

Media kultur harus mengandung sedikitnya 25–60 mM nitrogen anorganik untuk pertumbuhan sel tanaman. Sel-sel tanaman mungkin dapat tumbuh pada sumber N dari nitrat saja, tetapi pertumbuhan tanaman akan lebih baik bila media mengandung nitrat dan amonium. Nitrat yang disediakan umumnya berkisar antara 25–40 mM dan konsentrasi amonium antara 2–20 mM, tetapi untuk beberapa spesies tanaman, konsentrasi amonium >8 mM akan menghambat pertumbuhan sel. Sel dapat tumbuh dalam media kultur yang hanya mengandung amonium sebagai sumber nitrogen jika satu atau lebih asam-asam yang terlibat dalam siklus asam trikarboksilat (seperti sitrat, suksinat, atau malat) juga terdapat dalam media pada konsentrasi sekitar 10 mM. Apabila nitrat dan amonium sebagai sumber nitrogen digunakan bersama dalam media, ion amonium akan digunakan lebih cepat dibanding dengan ion nitrat.

Kalium dibutuhkan untuk pertumbuhan sel bagi sebagian besar spesies tanaman. Umumnya media mengandung kalium (dalam bentuk nitrat atau klorida) pada konsentrasi 20–30 mM. Konsentrasi optimum untuk unsur P, Mg, S, dan Ca berkisar antara 1–3 mM. Konsentrasi yang lebih tinggi dari hara-hara tersebut diperlukan jika terjadi defisiensi hara yang lain.

Tabel IV.1. Formulasi beberapa media yang banyak digunakan dalam teknik kultur jaringan tanaman.

Bahan	Konsentrasi dalam media (mg/l)		
	MS	SH	B5
KNO ₃	1.900	2.500	2.500
NH ₄ NO ₃	1.650	–	–
NH ₄ H ₂ PO ₄	–	300	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	–	134
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	400	250
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	200	150
KH ₂ PO ₄	170	–	–
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	–	–	150
MnSO ₄ ·H ₂ O	–	10,0	10,0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	–	–
KI	0,83	1,0	0,75
H ₃ BO ₃	6,2	5,0	3,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	1,0	2,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,2	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,1	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,1	0,025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	15,0	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	20,0	37,3
Asam nikotinat	0,5	5,0	1,0
Piridoksin-HCl	0,5	0,5	1,0
Tiamin-HCl	0,1	5,0	10,0
Glisin	2,0	–	–
Mio-inositol	100	1.000	100
Sukrosa	30.000	30.000	20.000

MS = Murashige dan Skoog (1962); SH = Schenk dan Hilderbandt (1972); B5 = Gamborg *et al.* (1968).

Hara mikro

Hara mikro yang paling dibutuhkan untuk pertumbuhan sel dan jaringan tanaman mencakup besi (Fe), mangan (Mn), seng (Zn), boron (B), terusi (Cu), dan molibdenum (Mo). Besi dan seng yang digunakan dalam pembuatan media harus dalam bentuk yang terikat (*chelated form*). Besi adalah yang paling kritis di antara semua hara mikro. Besi sitrat dan tartrat dapat digunakan untuk media kultur, tetapi senyawa ini sulit larut dan biasanya akan terpresipitasi setelah media dibuat. Masalah ini dipecahkan oleh Murashige dan Skoog dengan mengikat besi menggunakan asam etilen diamintetraasetik (EDTA).

Kobal (Co) dan iodin (I) juga dapat ditambahkan dalam media, tetapi kebutuhan untuk pertumbuhan sel belum diketahui. Natrium (Na) dan klorida (Cl) juga digunakan pada beberapa media, tetapi tidak begitu penting untuk pertumbuhan sel. Konsentrasi Cu dan Co yang biasanya ditambahkan pada media, yaitu 0,1 µM, Fe dan Mo 1 µM, I 5 µM, Zn 5–30 µM, Mn 20–90 µM, dan B 25–100 µM.

Karbon dan sumber energi

Sumber karbohidrat yang biasanya digunakan dalam media kultur ialah sukrosa. Glukosa dan fruktosa dalam beberapa hal dapat digunakan sebagai pengganti sukrosa. Glukosa mempunyai efektivitas yang sama dengan sukrosa dibanding dengan fruktosa. Karbohidrat lain yang pernah dicoba, yaitu laktosa, galaktosa, rafinosa, maltosa, dan pati, tetapi semua karbohidrat tersebut umumnya memberikan hasil yang kurang baik dibanding dengan sukrosa atau fruktosa. Konsentrasi sukrosa normal dalam media kultur berkisar antara 2–3%.

Karbohidrat harus tersedia dalam media kultur karena sangat sedikit sel dari tanaman yang diisolasi bersifat autotrof, yaitu mampu menyediakan kebutuhan karbohidrat sendiri melalui asimilasi CO₂ selama proses fotosintesis. Sukrosa dalam media kultur secara cepat akan diurai menjadi fruktosa dan glukosa. Glukosa adalah yang pertama digunakan oleh sel, diikuti oleh fruktosa. Saat media disterilisasi dengan *autoclave*, sebagian sukrosa akan mengalami hidrolisis. Apabila sukrosa yang *diautoclave* larut bersama komponen media lain, proses hidrolisis akan lebih besar. Kultur dari beberapa spesies tanaman akan tumbuh baik pada media yang sukrosanya *diautoclave* dibanding dengan media yang sukrosanya disterilisasi dengan saringan. Hal ini dimungkinkan akan menguntungkan sel karena tersedianya glukosa dan fruktosa.

Vitamin

Vitamin disintesis pada tanaman normal untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Vitamin dibutuhkan oleh tanaman sebagai katalis dari berbagai proses metabolik. Pada saat sel dan jaringan ditumbuhkan secara *in vitro*, beberapa vitamin mungkin menjadi faktor pembatas untuk pertumbuhan sel. Vitamin yang sering digunakan dalam media kultur jaringan ialah tiamin (B1), asam nikotinat, piridoksin (B6), dan mio-inositol. Umumnya hampir semua sel tanaman memerlukan tiamin untuk pertumbuhannya. Konsentrasi tiamin yang digunakan dalam media biasanya antara 0,1–10 mg/l. Asam nikotinat dan piridoksin termasuk vitamin yang sering digunakan dalam media kultur, tetapi untuk beberapa spesies tanaman bukan merupakan komponen yang esensial untuk pertumbuhan sel. Asam nikotinat umumnya digunakan pada konsentrasi 0,1–5 mg/l, sedangkan piridoksin antara 0,1–10 mg/l.

Mio-inositol termasuk dalam karbohidrat, tetapi dalam pembuatan media kultur sering dikelompokkan ke dalam stok larutan vitamin. Meskipun tidak terlalu esensial, mio-inositol berfungsi untuk menstimulasi pertumbuhan sel pada banyak spesies tanaman. Mio-inositol akan terurai menjadi asam askorbat dan pektin yang kemudian menjadi fosfoinositida dan fosfatidilinositol yang berperan dalam pembelahan sel. Mio-inositol umumnya digunakan pada konsentrasi 50–5.000 mg/l.

Pada beberapa media kultur juga sering ditambahkan vitamin seperti biotin, asam folat, asam askorbat, asam pantotenat, vitamin E (tokoferol), riboflavin, kobalamin, dan asam p-aminobenzoik. Meskipun bukan merupakan faktor pembatas pertumbuhan, vitamin tersebut sering memberikan keberhasilan dalam kultur sel dan jaringan tanaman. Biasanya vitamin ditambahkan ke dalam media apabila konsentrasi tiamin di bawah taraf yang diinginkan atau apabila jumlah populasi sel yang tumbuh masih rendah.

Asam amino dan sumber nitrogen lainnya

Meskipun secara normal sel yang dikulturkan dapat mensintesis kebutuhan asam aminonya, asam amino tertentu atau campuran asam amino dapat ditambahkan untuk membantu menstimulasi pertumbuhan sel. Penggunaan asam amino penting dalam penetapan kultur sel dan kultur protoplas. Asam amino yang tersedia dalam kultur sel tanaman merupakan sumber nitrogen yang dapat segera digunakan karena asam amino akan diserap oleh sel lebih cepat dibanding dengan sumber nitrogen anorganik.

Sumber nitrogen organik yang paling banyak digunakan dalam media kultur ialah asam amino, seperti kasein hidrolisat, L-glutamin, L-asparagin, arginin, dan adenin. Kasein hidrolisat umumnya digunakan pada konsentrasi 0,05–0,1%. Asam amino yang ditambahkan pada media umumnya merupakan kombinasi 2–3 komponen karena penambahan satu jenis asam amino saja justru dapat menghambat pertumbuhan sel. Konsentrasi asam amino dalam media untuk meningkatkan pertumbuhan sel, yaitu glisin 2 mg/l, glutamin hingga 8 mM, asparagin 100 mg/l, arginin dan sistein 10 mg/l, dan tirosin 100 mg/l. Adenin sulfat juga sering ditambahkan pada media kultur untuk menstimulasi pertumbuhan sel dan meningkatkan pembentukan tunas. Adenin sulfat sering dikelompokkan ke dalam ZPT sitokinin karena struktur dasar ZPT tersebut adalah adenin.

Bahan organik kompleks

Penambahan berbagai macam ekstrak organik pada media kultur sering memberikan respons pertumbuhan yang diinginkan. Bahan organik kompleks tersebut antara lain protein hidrolisat, air kelapa, ekstrak ragi, ekstrak *malt*, pisang, jus jeruk, dan jus tomat. Di antara bahan organik tersebut, yang paling banyak digunakan hingga saat ini adalah air kelapa dan protein hidrolisat. Protein hidrolisat umumnya ditambahkan pada media kultur pada konsentrasi 0,05–0,1%, sementara air kelapa umumnya pada konsentrasi 5–20% (v/v).

Arang aktif (*activated charcoal*) juga sering digunakan pada media kultur. Beberapa hasil penelitian menunjukkan pengaruh yang menguntungkan dan merugikan. Pada kultur tanaman anggrek, bawang merah, wortel, dan tomat, arang aktif dapat menstimulasi pertumbuhan dan diferensiasi, tetapi pada kultur tanaman tembakau, kedelai, dan teh justru akan menghambat pertumbuhan.

Pengaruh arang aktif umumnya diarahkan pada salah satu dari tiga hal berikut: penyerapan senyawa penghambat, penyerapan ZPT atau menggelapkan warna media. Penghambatan pertumbuhan akibat arang aktif umumnya karena arang aktif dapat menyerap ZPT. NAA, kinetin, BAP, IAA, dan 2iP semuanya dapat terikat oleh arang aktif. IAA dan 2iP merupakan ZPT yang paling cepat terikat oleh arang aktif. Arang aktif dapat menstimulasi pertumbuhan sel karena mampu mengikat senyawa fenol yang bersifat toksik yang diproduksi oleh biakan selama dalam kultur. Konsentrasi arang aktif yang ditambahkan ke dalam media kultur umumnya 0,5–3%.

Bahan pematat dan penyangga biakan

Media kultur dapat dibuat padat atau semipadat, yaitu dengan menambahkan bahan pematat berupa agar. Dibanding dengan bahan pematat lain, agar mempunyai beberapa keuntungan, yaitu (1) agar akan terbentuk bila dilelehkan dalam air pada suhu 60–100°C dan akan memadat pada suhu 45°C; (2) agar bersifat stabil pada suhu inkubasi; (3) agar tidak bereaksi dengan komponen dalam media dan tidak dicerna oleh enzim tanaman. Kualitas fisik agar dalam media kultur bergantung pada konsentrasi dan merek agar yang digunakan serta pH media. Konsentrasi agar yang digunakan dalam media kultur berkisar antara 0,5–1%, dengan catatan pH media sesuai dengan aturan. Untuk perbanyak tanaman, pH media umumnya 5,8 dan dapat diatur dengan penambahan NaOH atau HCl (0,1–1 N). Penggunaan arang aktif (0,8–1%) dapat memengaruhi kepadatan agar yang terbentuk.

Kemurnian agar yang digunakan dalam media kultur juga merupakan faktor yang penting. Agar yang mengandung garam Ca, Mg, K, dan Na dapat memengaruhi ketersediaan hara dalam media. Oleh karena itu, penggunaan agar yang murni sangat diperlukan terutama untuk tujuan percobaan. Untuk memurnikan agar dapat dilakukan dengan cara mencuci dengan air destilasi selama 24 jam kemudian dibilas dengan etanol dan dikeringkan pada suhu 60°C selama 24 jam.

Bahan pematat lain yang pernah dicoba adalah gelatin pada konsentrasi 10%, akan tetapi terdapat kesulitan karena gelatin meleleh pada suhu 25°C. Metosel dan alginat juga pernah dicoba sebagai bahan pematat media, tetapi kedua bahan tersebut sulit penanganannya dan harganya cukup mahal. Bahan lain yang dapat digunakan adalah agarosa (konsentrasi 0,35–0,7%). Jenis agar ini banyak digunakan pada pekerjaan teknik kultur protoplas. Saat ini bahan pematat yang banyak digunakan adalah agar sintetis, yaitu Phytigel™ (produk Sigma-Aldrich) dan GELRITE™ (produk Merck & Co., Inc.). Agar jenis ini hanya digunakan 2–2,5 g/l dan menghasilkan gel yang bening yang cocok untuk mendeteksi ada tidaknya kontaminan dan kondisi pertumbuhan kultur terutama perakaran.

Gel/agar juga berfungsi sebagai penopang agar biakan atau eksplan yang ditanam dalam media tetap pada tempatnya (tidak bergerak atau berpindah). Metode lain yang dapat digunakan untuk menopang atau menyangga biakan ialah jembatan kertas penyaring (*filter paper bridges*), sumbu kertas penyaring (*filter paper wick*), busa poliuretran, *celophane* berlubang, dan poliester. Pilihan penggunaan gel/agar atau penyangga lain bergantung pada spesies tanaman yang dikulturkan.

Zat pengatur tumbuh

Terdapat empat kelompok ZPT yang penting dalam kultur jaringan tanaman, yaitu auksin, sitokinin, giberelin, dan asam absisik. Skoog dan Miller (1957) adalah yang pertama melaporkan bahwa perbandingan auksin dan sitokinin menentukan arah morfogenesis dalam kultur jaringan tanaman. Penambahan auksin dan sitokinin ke dalam media kultur bertujuan untuk menginisiasi dan memacu morfogenesis, meskipun perbandingannya untuk mendapatkan induksi akar dan tunas bervariasi baik di tingkat genus, spesies maupun kultivar.

Auksin yang umum digunakan dalam media kultur adalah *indole-3-acetic acid* (IAA), *indole-3-butyric acid* (IBA), *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), dan *naphthalene acetic acid* (NAA). IAA adalah jenis auksin alami yang dijumpai pada tanaman. Senyawa sejenis auksin lainnya adalah auksin sintetis yang mempunyai tingkat aktivitas yang berbeda. Auksin sintetis lainnya yang sering digunakan dalam kultur sel tanaman adalah *4-chlorophenoxyacetic acid* atau *p-chlorophenoxyacetic acid* (4-CPA, PCPA), *2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid* (2,4,5-T), *3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid* (*dicamba*), dan *4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid* (*picloram*).

Jenis-jenis auksin tersebut berbeda dalam aktivitas fisiologisnya. Berdasarkan uji kurva batang, 2,4-D mempunyai aktivitas 8–12 kali lebih besar daripada IAA, 2,4,5-T empat kali lebih besar, PCPA dan *picloram* 2–4 kali lebih besar, dan NAA dua kali lebih besar aktivitasnya dibanding dengan IAA. Meskipun 2,4-D, 2,4,5-T, PCPA, dan *picloram* sering digunakan untuk proliferasi sel secara cepat, penggunaannya dalam konsentrasi yang terlalu tinggi dan durasi yang terlalu lama akan menghambat aktivitas morfogenesis. Auksin dalam media kultur berfungsi untuk menstimulasi produksi kalus dan pertumbuhan sel, menginisiasi tunas (kombinasi dengan sitokinin) dan khususnya akar, menginduksi proses embriogenesis somatik dan menstimulasi pertumbuhan kultur tunas ujung.

Sitokinin yang umum digunakan dalam media kultur mencakup *6-benzylamino purine* atau *6-benzyladenin* (BAP, BA), *6- γ - γ -dimethylamino purine* (2iP), *furfurilamino purine* (kinetin), dan *6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-buthenylamino) purine* (zeatin). Zeatin dan 2iP termasuk sitokinin alami, sementara itu BA dan kinetin termasuk sitokinin sintetis. Adenin, salah satu senyawa alami lain yang strukturnya sama dengan sitokinin, menunjukkan aktivitas yang

mirip dengan sitokinin. Rantai samping dari molekul zeatin mempunyai ikatan ganda dan terdapat dua bentuk isomerik (*cis* dan *trans*). Transisomer dari zeatin mempunyai aktivitas biologis yang tinggi. Agar proses morfogenesis dapat berlangsung, sebagian jaringan tanaman secara mutlak memerlukan sitokinin tertentu, tetapi banyak juga jaringan yang tidak bergantung pada kehadiran sitokinin.

Sitokinin yang ditambahkan dalam media kultur umumnya ditujukan untuk menstimulasi pembelahan sel, menginduksi pembentukan tunas dan proliferasi tunas aksiler, dan menghambat pembentukan akar. Mekanisme kerja sitokinin belum diketahui secara pasti, namun demikian beberapa senyawa yang mempunyai aktivitas mirip sitokinin terlibat dalam *transfer-RNA* (t-RNA). Sitokinin juga dapat mengaktifasi sintesis RNA dan menstimulasi aktivitas protein dan enzim pada jaringan tertentu.

Bentuk morfogenesis yang terjadi dalam kultur jaringan tanaman sebagian besar bergantung pada perbandingan konsentrasi auksin dan sitokinin yang ada dalam media. Inisiasi akar pada planlet, embriogenesis, dan inisiasi kalus umumnya terjadi apabila perbandingan konsentrasi auksin terhadap sitokinin lebih tinggi, sementara proliferasi tunas adventif dan aksilar terjadi apabila perbandingannya lebih rendah. Konsentrasi auksin dan sitokinin dalam media sama pentingnya dengan perbandingan dari keduanya. Sebagai contoh, penggunaan 2,4-D dan BA 5 mg/l (dengan perbandingan 1 : 1) akan meningkatkan pembentukan kalus pada tanaman *Agrotis*, tetapi pada penggunaan 0,1 mg/l akan meningkatkan pembentukan tunas. Contoh tersebut menunjukkan bahwa meskipun perbandingan auksin dan sitokinin seimbang, pada kasus yang pertama konsentrasi auksin terlalu tinggi sehingga pertumbuhan mengarah pada pembentukan kalus.

Giberelin (GA_3) dan asam absisik (ABA) adalah dua jenis ZPT yang juga digunakan dalam media kultur. Pada umumnya biakan dalam kultur jaringan dapat tumbuh tanpa kehadiran kedua ZPT tersebut, meskipun untuk beberapa spesies tanaman memerlukan kedua ZPT tersebut untuk meningkatkan pertumbuhannya. Umumnya GA_3 dibutuhkan untuk memacu pertumbuhan kultur sel, meningkatkan pertumbuhan kalus, dan pemanjangan ruas batang atau planlet yang mengalami kekerdilan. Untuk kultur meristem pada berbagai jenis tanaman, GA_3 diberikan pada tahap awal untuk penggunaan meristem yang berukuran sangat kecil. ABA umumnya digunakan untuk menghambat atau menstimulasi pertumbuhan kalus (bergantung pada spesies tanamannya), meningkatkan proliferasi tunas, dan menghambat perkembangan embrio.

Pembuatan Media Kultur

Pembuatan media kultur memerlukan peralatan gelas yang bersih, air berkualitas tinggi, bahan kimia murni, dan pengukuran semua bahan-bahan media yang hati-hati. Penggunaan peralatan gelas yang bersih merupakan hal ter-

penting. Air destilasi (akuades) atau air deionisasi paling umum digunakan untuk pembuatan media kultur jaringan pada skala komersial, sedangkan air *double distilled* umumnya digunakan untuk penelitian. Tidak diperbolehkan menggunakan air keran untuk pembuatan media kultur. Bahan kimia yang digunakan harus yang berklasifikasi analitik (*analytical grade*). Penggunaan sukrosa pada media kultur untuk skala komersial dapat diganti dengan gula kristal komersial (gula pasir) yang berkualitas.

Media kultur harus berisi hara makro dan mikro yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman, demikian pula sumber karbohidrat, vitamin, agar, dan ZPT atau ekstrak tanaman yang diperlukan. Media kultur yang paling banyak digunakan ialah media Murashige dan Skoog (MS). Media tersebut pada awalnya dikembangkan untuk kultur tembakau, tetapi ternyata cocok untuk berbagai jenis tanaman. Prosedur penting dalam pembuatan media mencakup pembuatan larutan stok dan sterilisasi media.

Larutan stok atau larutan induk

Penggunaan larutan stok dalam pembuatan media akan mengurangi jumlah pekerjaan yang sifatnya berulang-ulang sehingga kesalahan manusia atau percobaan (*human* atau *experimental error*) dapat dikurangi. Selain itu, penimbangan secara langsung bahan pembuat media, seperti hara mikro dan ZPT, dalam jumlah sangat sedikit (miligram atau mikrogram) pada formulasi akhir tidak akan diperoleh secara akurat. Oleh karena itu, sudah menjadi prosedur baku komponen-komponen tersebut dibuat dalam larutan stok.

Untuk membuat larutan stok, senyawa yang dibutuhkan ditimbang dan diletakkan pada gelas ukur bersih. Kepekatan larutan stok umumnya dibuat antara 10–1.000 kali, bergantung pada daya larut dari senyawa yang akan dilarutkan. Sebelum ditambahkan dengan air destilasi, beberapa bahan kimia ada yang harus dilarutkan dahulu dengan pelarut etil alkohol, NaOH 1 N atau HCl 1 N dalam jumlah yang kecil atau beberapa tetes. Selanjutnya, air destilasi ditambahkan secara perlahan sampai volume yang diinginkan. Jangan lupa pada wadah/botol larutan diberi label berisi nama larutan, tanggal pembuatan dan kedaluwarsa, dan nama orang yang membuatnya. Untuk beberapa bahan tertentu, misalnya IAA, stok larutannya harus disimpan dalam botol gelap untuk mencegah dekomposisi oleh cahaya.

Hara makro

Larutan stok hara makro dapat dibuat 10 atau 20 kali dari konsentrasi akhir (Tabel IV.2). Larutan stok kalsium disarankan dipisah untuk mencegah pengendapan. Larutan stok hara makro dapat disimpan beberapa minggu dalam keadaan gelap di tempat yang sejuk. Penyimpanan dalam *refrigerator* pada suhu 2–4°C merupakan kondisi yang terbaik. Disarankan pula semua larutan stok hara

makro disaring terlebih dahulu sebelum disimpan untuk menghindari partikel-partikel yang tidak larut.

Hara mikro

Larutan stok hara mikro umumnya dibuat 100 kali dari konsentrasi akhir (Tabel IV.3). Larutan stok hara mikro disarankan disimpan dalam *refrigerator* atau *freezer*. Mellor dan Stace-Smith menyatakan bahwa larutan stok mikro dapat disimpan lebih dari 1 tahun dalam *refrigerator*. Gamborg dan Shyluk menyarankan untuk stok kalium iodida (KI) sebaiknya dibuat konsentrasi 100 kali dan disimpan secara terpisah dengan stok mikro lainnya. Begitu pula untuk larutan stok besi (Fe) dibuat dan disimpan di tempat yang terpisah dalam botol yang berwarna gelap.

Vitamin

Kecuali mio-inositol, stok larutan vitamin dibuat 1.000 kali konsentrasi (tabel IV.4). Stok larutan mio-inositol dibuat terpisah dengan konsentrasi 100 kali. Untuk pembuatan larutan stok mio-inositol sebanyak 100, 500, dan 1000 ml masing-masing dibutuhkan 1, 5, dan 10 g mio-inositol. Larutan stok vitamin disimpan dalam *freezer* (-20°C). Apabila *refrigerator* atau *freezer* tidak tersedia, larutan vitamin harus dibuat setiap media akan dibuat. Larutan stok vitamin dalam *refrigerator* dapat disimpan selama 2–3 bulan, setelah waktu tersebut larutan harus diganti yang baru.

Tabel IV.2. Pembuatan stok hara makro media dasar MS, konsentrasi larutan stok 20 kali.

Hara makro	Konsentrasi dalam media (mg/l)	Konsentrasi dalam larutan stok (g)		
		1.000 ml	500 ml	100 ml
KNO ₃	1.900	38	19	3,8
NH ₄ NO ₃	1.650	33	16,5	3,3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	7,4	3,7	0,74
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	8,8	4,4	0,88
KH ₂ PO ₄	170	3,4	1,7	0,34

Tabel IV.3. Pembuatan stok hara mikro media dasar MS, konsentrasi larutan stok 100 kali.

Hara mikro	Konsentrasi dalam media (mg/l)	Konsentrasi dalam larutan stok (mg)		
		1.000 ml	500 ml	100 ml
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	2.230	1.115	223
KI	0,83	83	41,5	8,3
H ₃ BO ₃	6,2	620	310	62
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	860	430	86
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	2,5	1,25	0,25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	25	12,5	2,5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	2,5	1,25	0,25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	2.780	1.390	278
Na ₂ EDTA	37,3	3.730	1.865	373

Tabel IV.4. Pembuatan stok vitamin media dasar MS, konsentrasi larutan stok 1.000 kali.

Vitamin	Konsentrasi dalam media (mg/l)	Konsentrasi dalam larutan stok (mg)		
		1.000 ml	500 ml	100 ml
Asam nikotinat	0,5	500	250	50
Piridoksin-HCl	0,5	500	250	50
Tiamine-HCl	0,1	100	50	10
Glisin	2,0	2.000	1.000	100

Tabel IV.5. Zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan dalam media kultur jaringan tanaman dan spesifikasinya.

ZPT	BA	2iP	Dicamba	2,4-D	GA ₃	IAA	IBA	Kinetin	NAA	Picloram	Thidiazuron	Zeatin
Berat molekul	225,3	203,2	221,0	221,0	346,4	175,2	203,2	215,2	186,2	241,5	220,2	219,2
Pelarut	KOH 1 N	KOH 1 N	EtOH	EtOH/ NaOH 1 N	EtOH	EtOH/ NaOH 1 N	EtOH/ NaOH 1 N	NaOH 1 N	NaOH 1 N	DMSO	DMSO	NaOH 1 N
Pengencer	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air
Penyimpanan bahan bentuk serbuk	Suhu ruang	-20 s.d. 0°C	0 s.d. 5°C	Suhu ruang	Suhu ruang	0°C	0 s.d. 5°C	0°C	Suhu ruang	Suhu ruang	Suhu ruang	0°C
Penyimpanan bahan dalam bentuk larutan	0 s.d. 5°C	-20 s.d. 0°C	0 s.d. 5°C	0 s.d. 5°C	0 s.d. 5°C	0°C	0°C	0°C	0 s.d. 5°C	0 s.d. 5°C	0 s.d. 5°C	0°C
Sterilisasi	CA/F	CA	CA	CA	CA/F	CA/F	CA/F	CA/F	CA	CA	CA/F	CA/F
Konsentrasi yang digunakan dalam media (mg/l)	0,1–5,0	1,0–30,0	0,01–10,0	0,01–5,0	0,01–5,0	0,01–3,0	0,1–10,0	0,1–5,0	0,1–10,0	0,01–10,0	0,001–0,05	0,01–5,0

CA = dapat di-*autoclave*; F = sterilisasi dengan saringan milipor; CA/F = dapat di-*autoclave*, tetapi sebagian bisa berkurang aktivitasnya.

Zat pengatur tumbuh

Stok ZPT biasanya dibuat dalam konsentrasi 100–1.000 ppm (*part per million*). Untuk stok larutan 100 ppm, sebagai contoh, bahan ditimbang 100 mg untuk 1 liter larutan stok. NAA dan 2,4-D termasuk ZPT yang tergolong stabil dan dapat disimpan dalam suhu 4°C selama beberapa bulan, sedangkan larutan IAA harus disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C. Penyimpanan larutan IAA pada suhu 4°C dalam botol berwarna gelap hanya bertahan tidak lebih dari satu minggu. Untuk melarutkan ZPT, diperlukan pelarut tertentu bergantung pada jenis ZPT-nya. Sebagai contoh, untuk membuat larutan IAA dan 2,4-D, terlebih dahulu harus dilarutkan dalam beberapa tetes alkohol 95%, kemudian ditambahkan air *double-distilled* sampai volume yang diinginkan. NaOH 1 N digunakan untuk melarutkan NAA, juga dapat untuk melarutkan IAA dan 2,4-D. Apabila menggunakan pelarut HCl atau NaOH, pH larutan harus diatur 5,5–5,8. Tabel IV.5 menunjukkan spesifikasi ZPT yang banyak digunakan dalam kultur jaringan.

BAB V

TAHAP-TAHAP DALAM PERBANYAKAN TANAMAN MELALUI KULTUR JARINGAN

Secara umum, produksi bibit melalui kultur jaringan memerlukan beberapa tahap, yaitu (1) pemilihan bahan tanaman (eksplan) dari induk terpilih, (2) mendapatkan kultur aseptik, (3) penanaman pada media untuk penggandaan atau multiplikasi tunas, (4) persiapan biakan/planlet untuk aklimatisasi, dan (5) aklimatisasi (George dan Sherrington 1984; Murashige 1974).

Pemilihan Eksplan

Bahan tanaman sebagai sumber eksplan harus berasal dari tanaman yang sehat dan jelas identitasnya. Pemilihan pohon induk sebagai sumber eksplan sangat penting dalam keberhasilan perbanyakan kultur jaringan. Eksplan dapat berupa tunas ujung, mata tunas aksiler, potongan batang, daun, akar, tunas dari anakan, mata tunas dari bonggol, atau organ lainnya. Pemilihan eksplan bergantung pada jenis tanaman dan metode perbanyakan yang akan digunakan. Bagian tanaman yang baik untuk dijadikan eksplan, yaitu jaringan yang sedang aktif tumbuh, seperti ujung tunas yang mengandung meristem, jaringan yang masih muda seperti bibit, atau jaringan yang mengalami rejuvenasi. Meristem merupakan bagian titik tumbuh tanaman yang sel-selnya aktif membelah, diameter 0,1 mm dan panjang 0,25–0,30 mm. Laboratorium kultur jaringan komersial umumnya menggunakan tunas ujung atau tunas samping yang mengandung meristem sebagai eksplan. Di samping itu, sebaiknya terdapat kebun koleksi sebagai sumber eksplan. Pohon induk tanaman tahunan berkayu, monokotil, dan biji terbuka (*Gymnospermeae*) perlu dipangkas berulang untuk mendapatkan bahan tanaman yang bersifat juvenil.

Mendapatkan Kultur Aseptik

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan bahan tanaman (eksplan) yang steril, merupakan tahap yang sulit karena harus mendapatkan bahan tanaman yang bebas dari patogen. Permukaan bagian tanaman yang akan digunakan sebagai eksplan harus disterilisasi dan ditanam pada media steril dalam botol kultur. Eksplan yang telah ditanam pada media harus dipelihara dalam ruangan dengan kondisi lingkungan yang terkontrol, baik suhu, intensitas cahaya maupun lamanya penyinaran.

Multiplikasi atau Penggandaan Tunas/Propagul

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan tunas yang dapat dimultiplikasi untuk menjadi bahan perbanyakan selanjutnya. Terdapat beberapa metode regenerasi untuk memproduksi tunas. Metode yang paling banyak digunakan ialah melalui pembentukan kalus (metode morfogenesis tidak langsung). Kalus meru-

pakan kumpulan sel-sel tidak terorganisasi (*undifferentiated* atau *dedifferentiated*) yang aktif membelah yang sering terbentuk dalam biakan *in vitro*. Kalus dapat diarahkan untuk membentuk tunas adventif kemudian berkembang menjadi planlet atau membentuk embrio somatik yang kemudian berkembang menjadi benih somatik. Sistem perbanyakan melalui jalur pembentukan kalus akan menghasilkan laju multiplikasi yang tinggi, tetapi secara genetis tidak stabil karena tanaman yang dihasilkan sifatnya sering tidak sama dengan pohon induknya (disebut *off-type*). Tanaman yang *off-type* sangat dihindari dalam perbanyakan komersial. Perbanyakan langsung melalui multiplikasi tunas aksiler merupakan metode yang paling banyak digunakan dalam perbanyakan komersial karena secara genetis lebih stabil sehingga akan menghasilkan tanaman yang sama dengan pohon induknya (*true to type*). Semua proses regenerasi yang terjadi dalam kultur *in vitro* dipengaruhi oleh banyak faktor, seperti komposisi media, jenis jaringan eksplan yang digunakan, genotipe, tingkat ploidi, kondisi fisiologis pohon induk, dan lain-lain. Waktu yang dibutuhkan dalam satu siklus tahap multiplikasi tunas sangat bervariasi (berkisar antara 3–6 minggu). Tunas baru yang dihasilkan selanjutnya dapat disubkultur berulang-ulang pada media baru sampai mendapatkan jumlah yang diinginkan.

Persiapan Biakan/Planlet untuk Aklimatisasi

Pada tahap ini tunas yang telah dihasilkan dipisahkan dari rumpunnya dan ditanam pada media untuk inisiasi dan perkembangan akar. Media untuk pembentukan perakaran umumnya mengandung ZPT auksin. Pada beberapa jenis tanaman dimungkinkan induksi perakarannya tidak secara *in vitro*, tetapi secara langsung pada media tanah di rumah kaca.

Aklimatisasi

Tahap ini merupakan tahap yang kritis karena planlet yang berasal dari kondisi steril harus ditanam pada kondisi non steril sebelum dipindah ke lapang. Selama pertumbuhan di laboratorium, planlet tidak melakukan fotosintesis, serta sumber hara dan energinya tersedia (heterotrof). Oleh karena itu, untuk dapat hidup secara autotrof diperlukan perlakuan khusus agar tanaman tidak mengalami *shock*, antara lain terjaganya kelembaban agar tetap tinggi, sebaliknya suhu dan intensitas cahaya tidak terlalu tinggi.

BAB VI

PRODUKSI BENIH PADA BEBERAPA JENIS TANAMAN MELALUI TEKNIK KULTUR JARINGAN

Untuk mendapatkan informasi teknis tentang produksi benih tanaman melalui teknik kultur jaringan, berikut uraian singkat dan diagram perbanyak beberapa jenis tanaman, khususnya yang telah dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian.

Pisang (*Musa spp.*)

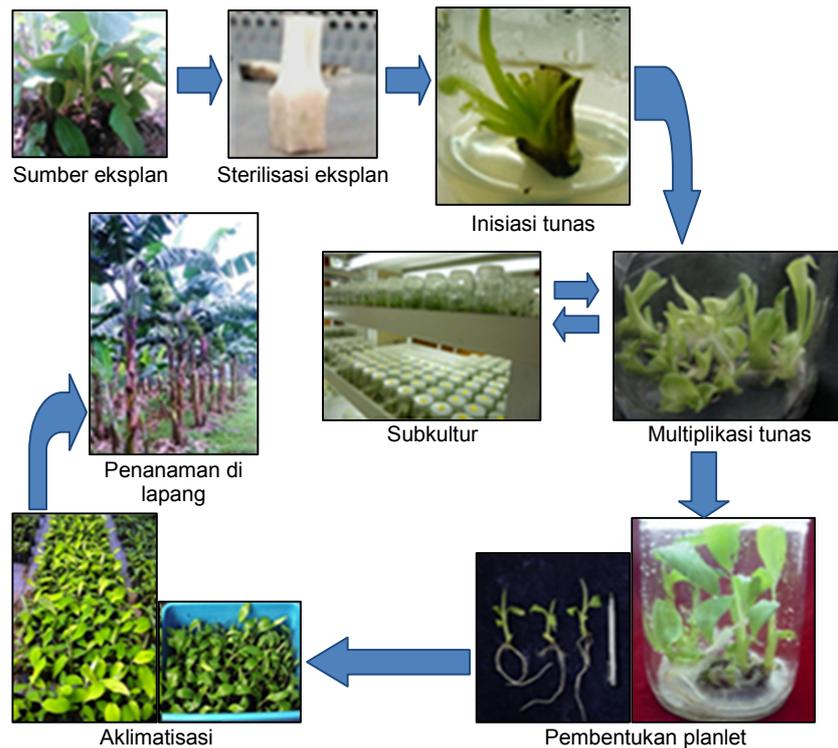
Tanaman pisang termasuk tanaman buah herba yang berasal dari kawasan Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Tanaman pisang dapat dijumpai di hampir semua tempat di Indonesia dan beberapa daerah merupakan sentra produksi pisang yang dapat memasok pisang ke daerah lain, bahkan mengekspor ke negara lain seperti Singapura, Jepang, Tiongkok, dan Timur Tengah.

Membanjirnya buah impor dengan kualitas yang lebih baik dan harga yang bersaing merupakan tantangan bagi pemasaran buah nasional. Agar dapat bersaing, kualitas produk buah nasional harus terus ditingkatkan. Peningkatan kebutuhan dan keinginan konsumen sering tidak dibarengi dengan penyediaan produk yang sesuai selera konsumen. Hal ini antara lain disebabkan tidak tersedianya bahan tanaman atau bibit yang dapat menghasilkan kualitas buah yang konsisten.

Perbanyak tanaman pisang melalui kultur *in vitro* umumnya dilakukan melalui metode multiplikasi tunas. Metode ini dianggap paling sederhana dan tanaman yang dihasilkan terjaga stabilitas genetiknya. Melalui metode ini, rata-rata tunas pisang yang dapat dihasilkan sekitar 4–25 tunas per periode subkultur, bergantung pada genotipe dan faktor lingkungan fisik yang digunakan (Gubbuk dan Pekmezci 2004, Gupta 1986, Imelda 1991, Lee 2006, Priyono dan Mawardi 1993). Dibanding dengan tanaman yang berasal dari bonggol, tanaman pisang hasil kultur jaringan mempunyai beberapa keuntungan, yaitu laju pertumbuhannya lebih tinggi, biaya pengendalian hama dan penyakit rendah, pertumbuhannya lebih seragam dan lebih vigor, dan periode panen lebih singkat (Lee 2006). Tahapan perbanyak tanaman pisang melalui kultur jaringan dapat dilihat pada Gambar VI.1.

Sumber eksplan

Eksplan merupakan bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan untuk dikulturkan secara *in vitro*. Tahap terpenting dalam penggunaan eksplan ialah pemilihan sumber eksplan dari tanaman induk yang akan diperbanyak. Tanaman induk terpilih harus jelas identitasnya, mempunyai sifat unggul, dan bebas



Gambar VI.1. Diagram perbanyakan mikro tanaman pisang.

penyakit. Sumber eksplan tanaman pisang umumnya berupa tunas muda yang berasal dari anakan yang tumbuh dari bonggol tanaman induk terpilih. Cara yang terbaik untuk mendapatkan sumber eksplan tanaman pisang ialah dengan memisahkan bonggol tanaman pisang dewasa terpilih dan menanamnya pada media tanah dalam bak atau polibag besar. Bagian batang sampai bagian pangkal batang harus dibuang. Untuk mengurangi tingkat kontaminasi, bonggol disemprot dengan bakterisida dan fungisida 1–2 kali seminggu. Anakan baru akan muncul pada permukaan bonggol setelah umur 2 minggu. Anakan ini kemudian digunakan sebagai sumber eksplan.

Sterilisasi eksplan

Eksplan tunas yang akan dikulturkan harus disterilisasi dengan cara memotong tunas muda yang sehat berikut sebagian kecil bonggolnya, kemudian dicuci dengan air mengalir sambil dikupas beberapa pelepah daunnya. Bagian batang (pelepah) diotong melintang kira-kira 2–3 cm di atas pangkal bonggol. Bagian bonggol dikupas sampai berwarna putih bersih, kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan detergen sambil dikocok. Selanjutnya dibilas dengan akuades steril di dalam LAF.

Di dalam LAF, eksplan direndam dalam larutan fungisida Dithane™ dan bakterisida Benlate™ (masing-masing 2 g/l) selama 1–2 jam, kemudian dibilas dengan akuades steril tiga kali. Setelah itu, eksplan direndam dalam alkohol 70% selama 2 menit lalu bilas dengan air akuades satu kali. Eksplan direndam kembali dengan larutan sodium hipoklorit 5% atau dengan larutan pemutih 30% selama 15–30 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril tiga kali. Eksplan kemudian diangkat dan disimpan di atas cawan petri berisi kertas saring atau *tissue* steril. Pelepah dan sebagian permukaan bonggol yang jaringannya rusak/mati karena sterilan harus dikupas. Eksplan ukuran 2–4 cm ditanam pada media kultur. Pembelahan eksplan secara vertikal menjadi dua bagian sering dilakukan untuk mempercepat pertumbuhan tunas.

Media kultur

Media kultur tanaman pisang dapat dibagi menjadi tiga jenis berdasarkan tahap perbanyakannya, yaitu media inisiasi tunas, media multiplikasi tunas, dan media perakaran untuk pembentukan planlet. Media inisiasi tunas pisang yang paling banyak digunakan ialah media dasar MS padat. ZPT untuk menginduksi tunas dapat berupa BAP 0,5–2 mg/l atau kinetin 2–5 mg/l. Untuk mencegah atau mengurangi terjadinya pencokelatan (*browning*) karena oksidasi fenol yang dikeluarkan oleh eksplan dapat ditambahkan ke dalam media senyawa *polivinilpirolidone* (PVP) 100–200 mg/l atau asam askorbat 100 mg/l. Sulistiani dan Yani (2012) menggunakan media MS padat tanpa ZPT ditambah MS cair yang mengandung BAP/kinetin 2–5 mg/l untuk menginisiasi tunas pisang dan mencegah terjadinya pencokelatan. Inisiasi tunas biasanya membutuhkan waktu 2–3 bulan sampai tunas baru dapat disubkultur atau dipindahkan pada media yang sama. Proses subkultur pada media inisiasi dapat dilakukan 2–3 kali dengan tujuan untuk lebih merangsang pertumbuhan tunas.

Tunas pisang yang telah tumbuh pada media inisiasi kemudian dipindahkan ke media multiplikasi tunas. Pemindehan tunas dari media inisiasi ke media multiplikasi dilakukan dengan memisahkan setiap individu tunas dan memotong bagian pangkal tunas dengan mengikutsertakan sebagian bonggolnya. Pada media multiplikasi, tunas akan dirangsang untuk berproliferasi membentuk tunas aksiler. Media yang digunakan pada tahap ini adalah media dasar MS dengan penambahan BAP atau kinetin 2–5 mg/l. Sering pula dikombinasikan dengan auksin NAA atau IAA dalam konsentrasi rendah (0,1–0,5 mg/l). Kombinasi konsentrasi kedua ZPT tersebut bergantung pada jenis pisang yang dikulturkan dan frekuensi subkultur. Multiplikasi tunas biasanya berlangsung antara 1–2 bulan. Jumlah tunas adventif yang terbentuk tergantung pada jenis pisang yang dikulturkan, umumnya berkisar antara 3–5 kali. Tunas adventif yang terbentuk kemudian disubkultur kembali pada media multiplikasi yang sama. Proses ini dapat diulang berkali-kali sampai diperoleh jumlah tunas sesuai dengan yang diinginkan. Hanya saja perlu diingat bahwa frekuensi subkultur yang terlalu tinggi sering

mengakibatkan tanaman mengalami penyimpangan genetik (terjadi mutasi). Untuk menghindari hal tersebut, pada perbanyakan tanaman pisang, frekuensi subkulturnya dibatasi antara 6–10 kali atau sekitar satu tahun periode kultur *in vitro*.

Tahap terakhir dari perbanyakan secara *in vitro* ialah pembentukan planlet. Tunas yang dihasilkan pada media multiplikasi dipindahkan ke media perakaran. Komposisi media perakaran pada tanaman pisang dapat digunakan media MS dengan atau tanpa penambahan ZPT. Jenis ZPT yang digunakan adalah NAA atau IBA 0,5–1 mg/l. Seringkali komposisi hara makro media MS untuk perakaran dibuat setengah dari konsentrasi baku (*half strenght*). Untuk induksi perakaran ini sering juga ditambahkan arang aktif 2 g/l. Waktu yang dibutuhkan pada tahap pembentukan planlet dalam media perakaran antara 3–4 minggu.

Aklimatisasi

Media tumbuh yang digunakan untuk aklimatisasi dapat berupa campuran tanah, pasir, dan kompos (1 : 1 : 1) dalam polibag atau bak aklimatisasi. Media tumbuh sebaiknya disterilisasi terlebih dahulu dengan *autoclave* atau uap panas.

Planlet yang akan diaklimatisasi, setelah dikeluarkan dari botol kultur harus dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa media yang masih menempel pada bagian akar. Planlet yang terbentuk secara berumpun dipisahkan secara individu menggunakan pisau atau gunting, kemudian direndam dalam larutan fungisida selama 5 menit. Selanjutnya, planlet ditanam pada media yang sudah dibasahi terlebih dahulu. Polibag atau bak dipasang sungkup plastik untuk menjaga kelembaban. Penyungkupan pada polibag dapat dilakukan secara berkelompok atau individu menggunakan kantong atau gelas plastik.

Aklimatisasi dapat dilakukan di rumah kaca atau rumah kasa (*screen house*) dengan diberi naungan paranet 70%. Waktu yang diperlukan untuk aklimatisasi antara 3–4 minggu. Bibit pisang yang telah diaklimatisasi dalam bak kemudian dipindahkan ke dalam polibag berukuran 15 cm x 15 cm. Pembesaran bibit pisang dilakukan di area terbuka selama 2–3 bulan sampai siap ditanam di lapang. Selama masa pembesaran, bibit disiram setiap pagi dan sore serta diberi pupuk urea secukupnya sebanyak dua kali.

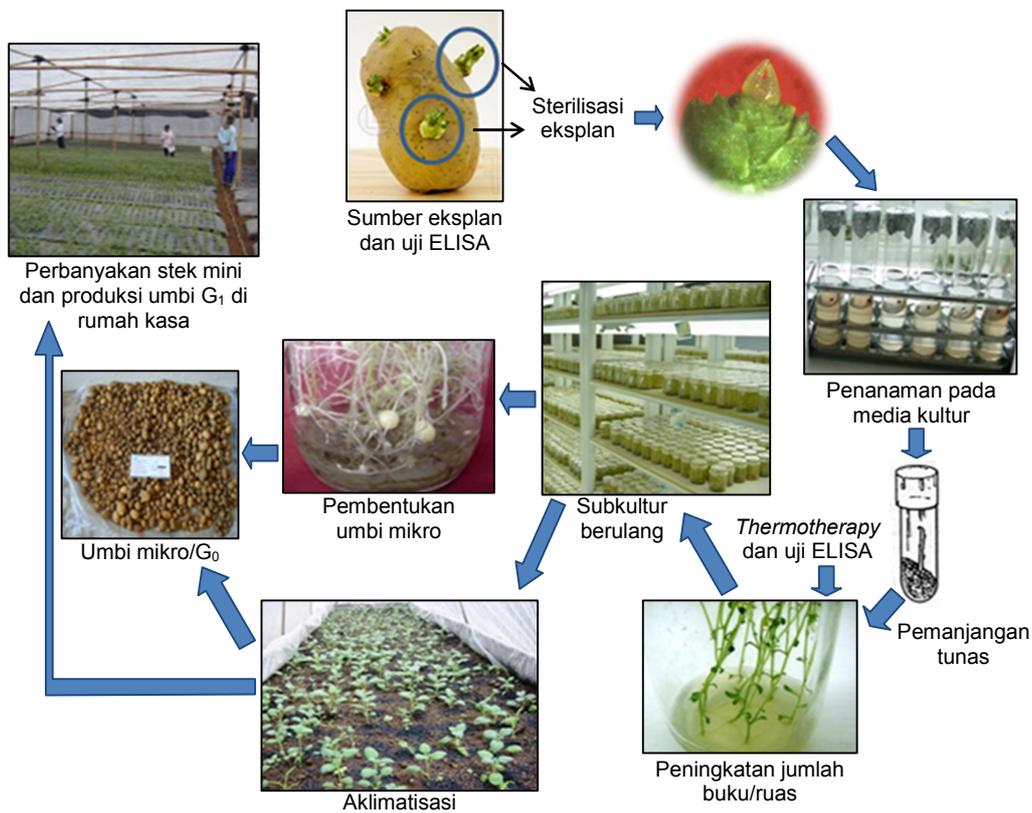
Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Kentang merupakan salah satu komoditas pangan penting yang dikonsumsi oleh lebih dari satu miliar orang di dunia, separuh di antaranya penduduk negara berkembang. Di Indonesia dan negara berkembang lainnya, tanaman kentang dibudidayakan sebagai sumber pangan, sementara di negara maju, selain untuk makanan, kentang juga digunakan sebagai sumber utama produk olahan, seperti pakan, pati, dan alkohol (Naik dan Karihaloo 2007).

Kentang termasuk tanaman yang rentan terhadap gangguan hama dan penyakit. Kendala peningkatan produksi kentang di Indonesia antara lain rendahnya kualitas dan kuantitas bibit. Penanaman bibit kentang bermutu, tepat waktu, dan tepat umur fisiologis merupakan faktor penentu keberhasilan produksi kentang. Upaya penyediaan benih kentang bermutu perlu dilandasi dengan sistem perbenihan yang mapan. Kemampuan teknologi kultur jaringan dalam memproduksi tanaman yang bebas penyakit secara massal sangat membantu dalam penyediaan benih kentang yang berkualitas. Melalui metode kultur meristem telah dihasilkan tanaman kentang yang bebas virus. Saat ini, perbanyakan klonal tanaman kentang yang bebas virus melalui mikropropagasi dan dikombinasikan dengan metode perbanyakan konvensional telah menjadi model produksi benih kentang yang banyak dilakukan di beberapa negara (Donnelly *et al.* 2003). Tahapan perbanyakan tanaman kentang melalui kultur jaringan dapat dilihat pada Gambar VI.2.

Sumber eksplan

Perbanyakan tanaman kentang melalui teknik kultur jaringan bertujuan untuk mendapatkan tanaman kentang yang bebas virus. Sumber eksplan dapat berasal



Gambar VI.2. Diagram perbanyakan tanaman kentang melalui kultur setek mikro dan umbi mikro.

dari bahan tanaman berupa mata tunas tanaman atau umbi kentang yang sehat. Pemilihan bahan tanaman yang akan digunakan sebagai sumber eksplan harus berasal dari tanaman yang bebas virus. Pengujian tanaman yang bebas virus dapat dilakukan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) atau metode sejenis. Eksplan bisa berupa tunas aksiler ketiga atau keempat dari tunas ujung tanaman (jika menggunakan eksplan dari tanaman) atau mata tunas berukuran 2–3 cm yang tumbuh dari umbi. Jika menggunakan tunas yang berasal dari umbi, sebaiknya umbi direndam terlebih dahulu dengan fungisida selama 15–30 menit.

Sterilisasi eksplan

Sterilisasi dilakukan dalam LAF. Eksplan tunas berukuran 2–3 cm direndam dalam larutan sodium hipoklorit 5% atau larutan pemutih 20% selama 10–15 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril tiga kali dan ditiriskan di atas kertas saring atau *tissue* steril.

Isolasi meristem dan penanaman pada media kultur

Bagian titik tumbuh berupa kubah meristem dan sepasang primordia daun dari eksplan tunas yang telah disterilisasi (ukuran antara 0,2–0,3 mm) diambil menggunakan mata pisau (*scalpel*) yang ujungnya runcing dan pinset di bawah mikroskop. Meristem ditanam dalam tabung reaksi yang berisi media kultur. Media yang digunakan dapat berupa media MS semi padat yang mengandung *D-calcium pantothenate* 2 mg/l + GA₃ 0,1 mg/l + NAA 0,01 mg/l + sukrosa 30 g/l + *phytagel* 1 g/l (atau *bacto agar* 5 g/l). Satu meristem ditanam dalam satu tabung reaksi. Biakan disimpan di ruang kultur dengan intensitas cahaya sekitar 1.000–2.000 lux selama 16 jam per hari. Setelah 1–2 bulan, meristem akan beregenerasi membentuk tunas dan memanjang.

Subkultur dilakukan pada media yang sama sampai terbentuk planlet yang mempunyai jumlah buku yang lebih banyak untuk memperbanyak selanjutnya. Pada tahap ini diperlukan waktu sekitar 3–4 bulan. *Thermotherapy* dapat dilakukan selama 2–3 minggu dengan menyimpan biakan dalam inkubator pada suhu 37°C dengan pencahayaan sekitar 1.000 lux selama 16 jam per hari. Kemudian biakan dipindah kembali ke ruang kultur. Sebelum memperbanyak (kloning), setiap planlet yang berasal dari meristem diuji kembali dengan ELISA untuk mengonfirmasi ada tidaknya virus.

Perbanyak tunas dan produksi umbi mikro

Planlet yang terseleksi diperbanyak dengan cara menanam potongan batang satu buku pada media MS padat yang mengandung *D-calcium pantothenate* 2 mg/l + GA₃ 0,1 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + NAA 0,01 mg/l + sukrosa 30 g/l + *phytagel* 2 mg/l (atau *bacto agar* 7 g/l). Planlet yang terbentuk dapat diperbanyak

kembali setelah berumur 3–4 minggu (bergantung pada respons pertumbuhan), dengan cara mensubkultur potongan batang satu buku pada media seperti di atas. Proses perbanyakkan melalui subkultur dapat dilakukan berkali-kali sampai mendapatkan jumlah planlet yang diinginkan. Perbanyakkan *in vitro* kentang biasanya hanya memerlukan satu macam media (*one step medium*). Planlet dapat langsung terbentuk pada media multiplikasi dan bisa langsung diaklimatisasi tanpa pemindahan pada media perakaran.

Untuk tujuan produksi umbi mikro, prosedur yang dilakukan adalah dengan menanam 10 potongan planlet yang berisi 2–3 buku dalam botol kultur atau *erlenmeyer* 250 ml yang berisi media cair dengan komposisi yang sama dengan media perbanyakkan di atas sebanyak 20–30 ml. Biakan diinkubasikan di ruang kultur pada suhu 24°C dengan intensitas cahaya 1.500–2.000 lux selama 16 jam per hari. Waktu inkubasi sekitar 3 minggu sampai tumbuh tunas aksiler dan menjadi planlet. Setiap botol/*erlenmeyer* yang berisi biakan ditambahkan media induksi umbi mikro sebanyak 40 ml. Komposisi media induksi umbi mikro, yaitu media MS cair yang mengandung BAP 10 mg/l + *chlorocholine chloride* (CCC) 500 mg/l + sukrosa 80 g/l. Biakan diinkubasikan di ruang kultur pada suhu 20°C dalam keadaan gelap. Umbi mikro akan mulai terbentuk pada ujung tunas terminal atau aksiler 8–10 hari setelah inkubasi. Umbi mikro dipanen setelah 60–90 hari. Setiap botol atau *erlenmeyer* dapat terbentuk 15–20 umbi mikro. Sebelum dipanen, umbi mikro yang masih dalam botol kultur disimpan di ruang kultur dalam kondisi terang selama 10–15 hari agar umbi mikro berwarna hijau (Naik dan Karihaloo 2007). Umbi mikro yang telah dipanen dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa media yang menempel, kemudian direndam dalam fungisida (misalnya Dithane™ 2 g/l) selama 10 menit, lalu disimpan pada suhu 20°C selama 2 hari. Umbi mikro dikemas dalam kantong plastik dan disimpan dalam *refrigerator* suhu 5°C selama 4–5 bulan dalam keadaan gelap untuk memecahkan dormansi benih. Umbi mikro akan bertunas setelah disimpan selama 3–4 bulan. Setelah itu umbi siap untuk disemai.

Aklimatisasi planlet dan penyemaian umbi mikro

Planlet yang dihasilkan melalui perbanyakkan tunas harus diaklimatisasi pada pesemaian di dalam rumah kaca atau rumah kasa. Planlet yang akan disemai dipotong bagian pangkal akarnya, kemudian planlet dipotong menjadi dua bagian. Bagian pangkal batang dicelupkan dalam larutan atau serbuk hormon perangsang perakaran, kemudian ditanam pada bak pesemaian yang berisi media campuran tanah dan sekam atau kompos (1 : 1) yang sudah disterilisasi. Penyemaian dapat dilakukan dengan jarak tanam 10 cm x 10 cm. Pesemaian diberi sungkup plastik untuk memperoleh tingkat kelembaban yang tinggi (di atas 75%) selama sekitar satu minggu dan disiram pada pagi dan sore. Naungan berupa paranet 70% juga digunakan untuk mencegah terik matahari. Tanaman dibiarkan

sampai menghasilkan umbi. Setiap tanaman akan menghasilkan umbi mini (G_0) sekitar 5–12 umbi dengan berat sekitar 10 g/umbi. Umbi mini yang dipanen dibersihkan dan disimpan dalam ruangan yang sejuk sampai bertunas kembali untuk penanaman berikutnya. Untuk penyemaian umbi mikro, caranya hampir sama dengan penyemaian planlet. Umbi mikro dapat langsung disemai setelah bertunas selama masa penyimpanan. Penyemaian umbi mikro tidak memerlukan penyungkupan, tetapi tetap diberi naungan paranet.

Tebu (*Saccharum spp.*)

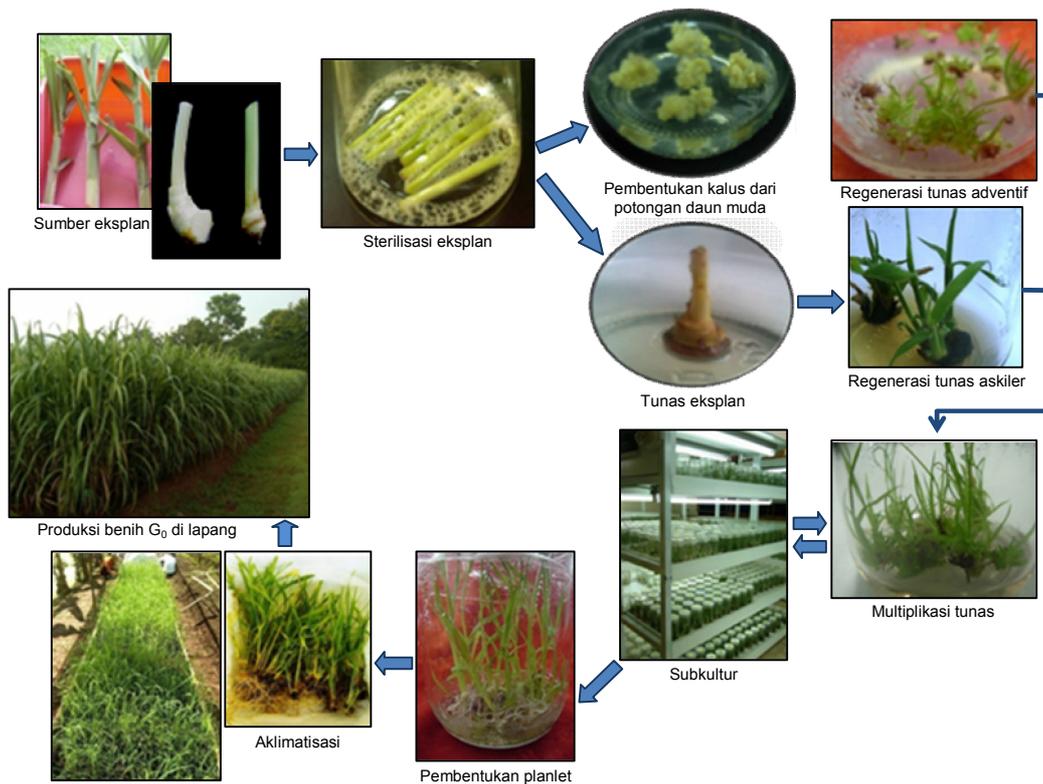
Tebu merupakan tanaman penting yang bernilai ekonomi tinggi di berbagai negara, terutama di negara berkembang yang beriklim tropik seperti Indonesia karena kandungan gulanya yang tinggi pada bagian batangnya. Batang tebu dimanfaatkan terutama sebagai bahan dasar utama dalam industri gula dan bahan baku industri lainnya, seperti farmasi, kimia, pakan ternak, pupuk, jamur, dan lain-lain.

Produktivitas tanaman tebu di Indonesia belum sesuai dengan yang diharapkan. Peningkatan produksi tanaman tebu sangat dipengaruhi oleh penggunaan dan penyediaan bibit dari varietas unggul bermutu yang mempunyai kontribusi sekitar 30–35% terhadap hasil. Pembenuhan tebu secara konvensional mulai dari pemulia sampai ke benih produksi umumnya dilakukan melalui penjenjangan (lima jenjang) sehingga secara teknis akan terjadi kesulitan dalam pengadaan benih dalam jumlah besar karena dibutuhkan waktu yang relatif cukup lama, yaitu sekitar 6 bulan untuk setiap jenjangnya (Direktorat Perbenihan dan Sarana Produksi 2008).

Perbanyakan tanaman tebu umumnya dilakukan secara vegetatif melalui setek. Di beberapa negara tropis, 2–3 bagian buku (nodus) batang tebu digunakan sebagai bahan tanaman baru (Jalaja *et al.* 2008), namun metode tersebut memiliki kekurangan, seperti waktu dalam perbanyakan lebih lama, membutuhkan tanaman induk dan tenaga yang banyak, kontaminasi patogen yang sulit dihindari dan ketergantungan pada musim tanam. Penyediaan bibit tebu bermutu melalui kultur jaringan yang dikombinasikan dengan sistem penangkaran di lapang merupakan salah satu alternatif yang dapat ditempuh dalam penyediaan bibit tebu bermutu secara massal. Tahapan perbanyakan tanaman tebu melalui kultur jaringan dapat dilihat pada Gambar VI.3.

Sumber eksplan

Bahan tanaman yang paling banyak digunakan sebagai sumber eksplan dalam perbanyakan tanaman tebu melalui kultur jaringan adalah tunas ujung batang dengan bakal daun yang masih menggulung. Umur tanaman terbaik untuk mendapatkan sumber eksplan tersebut adalah 4–5 bulan. Saat ini, cukup banyak varietas tebu yang dilepas dan direkomendasikan untuk dibudidayakan. Oleh



Gambar VI.3. Diagram perbanyak mikro tanaman tebu.

karena itu, dalam pengambilan tanaman yang akan dijadikan sumber eksplan harus jelas identitasnya dan harus sesuai dengan deskripsi varietasnya. Eksplan harus diambil dari tanaman yang sehat dan bebas penyakit. Untuk menghindari mendapatkan sumber eksplan dari tanaman yang terserang virus, sebaiknya dilakukan pengujian dengan ELISA.

Bagian ujung tanaman yang akan dijadikan sumber eksplan dipotong kira-kira pada posisi ke 4–6 dari daun yang sudah membuka. Pelepah daun dilepaskan satu per satu sampai dengan daun yang masih menggulung. Bagian batang yang pelepah daunnya sudah dibuang dipotong dan disisakan potongan tunasnya berukuran sekitar 10–15 cm. Titik tumbuh (meristem) pada bagian yang masih terbungkus gulungan daun muda dipastikan tidak terpotong. Sumber eksplan kemudian dicuci dengan detergen dan bilas dengan air mengalir.

Sterilisasi dan inokulasi eksplan

Sebanyak 8–10 potongan ujung batang yang telah dicuci dengan detergen dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* ukuran 2 l, kemudian direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida selama 1 jam, kemudian bilas dengan akuades 3–5 kali. Di dalam LAF, eksplan direndam dalam alkohol 70% selama 1–2 menit.

Kemudian dibilas dengan akuades steril 3 kali. Eksplan direndam kembali dalam larutan pemutih 10–30% yang mengandung sodium hipoklorit selama 20 menit sambil dikocok. *Erlenmeyer* harus dalam keadaan tertutup (dengan *aluminium foil*). Eksplan dibilas dengan akuades steril 4–5 kali dan ditiriskan di atas kertas saring steril.

Berdasarkan asal jaringan tanamannya, dari sumber eksplan yang telah disterilisasi, dapat diperoleh dua jenis eksplan, yaitu eksplan jaringan somatik (berupa potongan daun yang menggulung) dan eksplan jaringan meristematik (berupa ujung tunas yang mempunyai titik tumbuh berikut potongan batang semu pada bagian basalnya). Eksplan daun yang masih menggulung dipotong di atas cawan petri steril menggunakan pinset dan *scalpel* dengan ukuran tebal sekitar 2–3 mm. Umumnya eksplan daun yang dekat dengan titik tumbuh (biasanya berwarna putih dan bersifat elastis) merupakan eksplan yang responsif dalam beregenerasi. Eksplan tunas ujung (*shoot tip*) hanya diperoleh satu dari setiap potongan batang tanaman. Ukuran eksplan tunas ujung yang ditanam pada media kultur sekitar 1–2 cm.

Media kultur

Pada dasarnya, ada tiga jenis media yang harus disiapkan dalam perbanyakan tanaman tebu, yaitu (1) media induksi kalus (untuk perbanyakan menggunakan eksplan jaringan somatik daun) atau media induksi tunas (untuk perbanyakan menggunakan eksplan jaringan meristematik atau jaringan yang mempunyai titik tumbuh), (2) media regenerasi dan multiplikasi/proliferasi tunas, dan (3) media perakaran. Komposisi media dari setiap jenis media dapat berbeda bergantung pada varietas tebu yang dikulturkan.

Perbanyakan menggunakan eksplan daun muda diawali dengan menanam potongan eksplan daun muda yang masih menggulung yang telah disterilisasi pada media induksi kalus dengan komposisi media dasar MS padat yang dilengkapi zat pengatur tumbuh 2,4-D 1–3 mg/l + kasein hidrolisat 2 g/l. Pada beberapa varietas tebu diperlukan penambahan sitokinin BAP 0,1–1 mg/l. Induksi kalus dilakukan dalam kondisi penyimpanan gelap pada suhu ruangan 24°C selama 4–8 minggu bergantung pada respon jaringan dalam membentuk kalus. Kalus yang baik berwarna putih atau putih kekuningan dengan struktur yang remah.

Pada perbanyakan menggunakan eksplan mata tunas digunakan media induksi tunas dengan komposisi media dasar MS (padat atau cair) yang ditambah BAP atau kinetin 1–2 mg/l + GA₃ 0,5 mg/l. Penanaman dapat dilakukan dalam botol kultur atau tabung reaksi. Untuk media dalam bentuk cair ditambahkan kertas saring steril (*paper bridge*) yang berfungsi sebagai penyangga eksplan. Eksplan yang telah ditanam disimpan pada ruang kultur bercahaya (1.000–2.500 lux) 16 jam/hari pada suhu 24±2°C. Tunas akan muncul sekitar 1–1,5 bulan setelah penanaman.

Kalus yang sudah terbentuk pada media induksi kalus harus dipindahkan ke media regenerasi tunas. Komposisi media regenerasi berupa media dasar MS (padat atau cair) + BAP 0,5–3 mg/l + GA₃ 0,5 mg/l. Konsentrasi BAP bervariasi bergantung pada varietas tebu yang diperbanyak. Sementara itu, pada perbanyakan melalui tunas apikal, tunas yang tumbuh pada media induksi tunas dipindahkan ke media regenerasi dan multiplikasi tunas dengan komposisi media dasar MS + BAP 0,25–6 mg/l + kinetin 1 mg/l. Biakan pada media regenerasi dan multiplikasi disimpan dalam kondisi terang (1.000–2.500 lux) 16 jam/hari pada suhu 24±2°C. Periode kultur yang dibutuhkan pada tahap ini sekitar 4–6 minggu. Setelah itu, tunas-tunas adventif (yang tumbuh dari kalus) dan tunas-tunas aksiler (yang tumbuh dari tunas samping eksplan mata tunas) disubkultur pada media yang sama untuk tujuan perbanyakan (kloning) biakan. Untuk tunas adventif, frekuensi subkultur disarankan tidak lebih dari tiga kali, sedangkan untuk tunas aksiler, frekuensi subkultur dapat berulang sampai 10–15 kali. Hal ini berhubungan dengan kestabilan genetik dari tanaman yang akan dihasilkan. Tunas-tunas yang berukuran kecil (pendek) disarankan disubkultur pada media multiplikasi dengan penambahan GA₃ 0,5 mg/l. Selain itu, disarankan untuk menurunkan konsentrasi sitokinin BAP seiring dengan peningkatan frekuensi subkultur.

Tahap terakhir dari proses perbanyakan *in vitro* ialah pembentukan planlet. Biasanya planlet akan terbentuk setelah tunas yang dihasilkan pada media multiplikasi dipindah ke media perakaran. Akan tetapi, pada beberapa kasus sering ditemukan pembentukan akar terjadi pada tahap perbanyakan pada media multiplikasi. Pemindahan tunas dari media multiplikasi ke media perakaran dilakukan dengan cara memisahkan tunas-tunas yang berumpun menjadi rumpun tunas yang lebih sedikit (biasanya 3–4 tunas/rumpun). Pemisahan tunas secara individual sering menyebabkan kegagalan dalam menghasilkan planlet. Komposisi media perakaran untuk tanaman tebu biasanya menggunakan media dasar MS (½ atau *full* komposisi hara makronya) yang ditambahkan auksin (NAA, IBA, atau IAA) 0,5–1 mg/l, sering ditambahkan juga kalsium pantotenat 1 mg/l. Biakan disimpan dalam kondisi seperti tahap multiplikasi. Planlet siap untuk diaklimatisasi pada umur 3–4 minggu setelah tanam.

Aklimatisasi

Planlet yang siap untuk diaklimatisasi dikeluarkan dari botol kultur dan dibersihkan bagian perakarannya dari sisa media yang menempel dengan air mengalir. Planlet yang menggerombol (rumpun) dipisah-pisahkan secara hati-hati dengan memastikan masih mempunyai akar. Daun yang terlalu tinggi dapat dipotong sepertiga bagiannya. Rendam bagian perakarannya dengan fungisida (Dithane™) 2 g/l selama 10–15 menit. Planlet ditanam dalam polibag atau bak pesemaian yang berisi campuran tanah, pasir, dan kompos (1 : 1 : 1). Perlu

dilakukan penyungkupan agar kondisi lingkungan dalam keadaan lembab. Penyungkupan dapat dilakukan secara individu (tiap tanaman) atau per bedeng/bak selama 10–14 hari atau sampai muncul/tumbuh daun baru. Untuk pesemaian yang modern, kelembaban biasanya diperoleh dengan cara menggunakan *mist* atau pengabutan. Pesemaian harus diberi naungan dengan paranet 60–70%. Pemupukan dapat dilakukan dengan cara penyemprotan larutan pupuk NPK 1% (10 g/l air) sekali dalam seminggu. Bibit siap dipindahkan ke lapang atau pesemaian pembesaran setelah berumur 45–60 hari. Untuk planlet yang ditanam dalam bentuk rumpun, harus dilakukan terlebih dahulu pemisahan bibit dari rumpunnya. Pemisahan dilakukan dengan cara mencabut rumpun dan mencuci akar dari tanah yang menempel, kemudian bibit anakan dipisahkan satu persatu secara hati-hati.

Bibit yang dihasilkan langsung dari planlet sering disebut sebagai bibit generasi nol (G_0) atau sekelas benih primer (*primary seed*). Untuk benih G_0 yang masih berupa rumpun, harus dipisahkan per individu (*di-split*) dan ditanam pada polibag, *potray* atau bedengan pesemaian. Benih yang ditanam pada polibag atau *potray* lebih mudah dan persentase hidup di lapang lebih tinggi karena sistem perakarannya tidak terganggu. Penanaman benih G_0 di lapang dapat dilakukan dengan jarak juringan puncak ke puncak (PKP) 90–135 cm dan jarak dalam barisan 40–60 cm. Sebelum ditanam, helaian daun dipotong sekitar sepertiga bagian atasnya. Pengairan dilakukan menjelang dan sesudah penanaman. Pemupukan dilakukan sesuai dengan rekomendasi pemupukan setempat. Pemanenan tanaman G_0 untuk menghasilkan benih G_1 (berupa bagal atau *budset*) biasanya dilakukan pada umur 4–5 bulan setelah penanaman G_0 di lapang. Benih G_1 dapat digolongkan sebagai *secondary seed*, biasanya mempunyai karakter fisik ukuran batang yang lebih kecil dibanding dengan ukuran batang tebu produksi. Benih G_1 diperbanyak kembali untuk menghasilkan G_2 . Selanjutnya benih G_2 dapat ditangkarkan pada Kebun Bibit Datar (KBD) yang kemudian akan menghasilkan benih tebu untuk kebun produksi atau Kebun Tebu Giling (KTG).

Jati (*Tectona grandis* L.)

Jati menjadi tanaman yang sangat populer sebagai penghasil bahan baku untuk industri perkayuan karena memiliki kualitas dan nilai jual yang sangat tinggi. Kekuatan dan keindahan seratnya merupakan faktor yang menjadikan kayu jati sebagai pilihan utama. Kebutuhan akan kayu jati selalu meningkat, baik di dalam maupun luar negeri, sedangkan populasi dan pasokannya semakin menipis karena siklus umur panen jati konvensional relatif lama (sekitar 45 tahun).

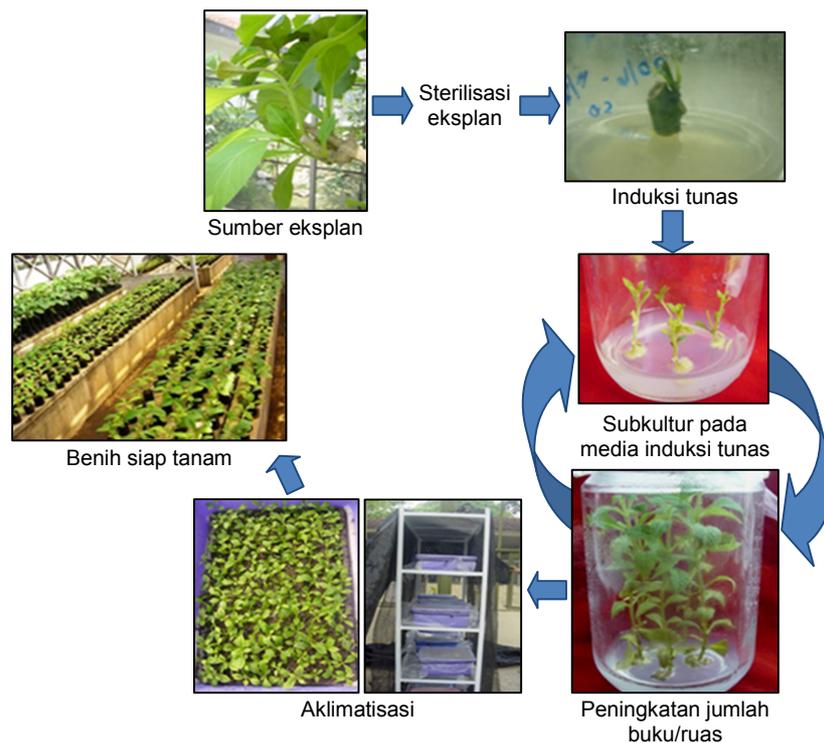
Saat ini, telah tersedia dan dikembangkan tanaman jati unggul yang memiliki siklus umur panen relatif pendek (*fast growing teak*) yang berasal dari pohon induk pilihan. Untuk selanjutnya dalam tulisan ini disebut sebagai jati genjah.

Saat ini, jati genjah sudah dijadikan sebagai andalan mengatasi kendala utama ketersediaan bahan baku kayu jati. Oleh karena itu, masalah perbanyakannya menjadi perhatian utama dalam pengembangan tanaman ini. Perbanyakan tanaman jati umumnya dilakukan melalui biji atau bagian vegetatif, seperti setek, sambungan, dan lain-lain. Penyediaan benih tanaman jati genjah dalam jumlah besar sulit dilakukan melalui cara perbanyakan tersebut. Oleh karena itu, saat ini banyak digunakan perbanyakan tanaman melalui teknik kultur jaringan.

Pada metode mikropropagasi tanaman jati genjah umumnya tidak dilakukan tahap multiplikasi tunas dan perakaran, tetapi diganti menjadi tahap induksi tunas dan elongasi, sedangkan tahap perakaran dilakukan pada saat aklimatisasi. Metode ini cukup sederhana dan mirip dengan cara perbanyakan dengan setek secara konvensional. Oleh karena itu, metode perbanyakan jati genjah sering disebut secara setek mikro. Keuntungan penggunaan metode ini ialah tanaman yang dihasilkan akan mempunyai kestabilan genetik yang sangat tinggi. Tahapan perbanyakan tanaman jati melalui kultur jaringan dapat dilihat pada Gambar VI.4.

Sumber eksplan

Jati merupakan salah satu tanaman tahunan yang tergolong sulit untuk diperoleh sumber eksplannya. Untuk mendapatkan sumber eksplan dengan tingkat juvenilitas yang tinggi dari tanaman tahunan berkayu yang sudah dewasa, dapat



Gambar VI.4. Diagram perbanyakan mikro tanaman jati.

dilakukan dengan pemangkasan berat. Dengan pemangkasan berat akan muncul tunas-tunas juvenil yang dapat digunakan sebagai sumber eksplan yang lebih responsif. Pemangkasan sering juga dikombinasi dengan penyemprotan larutan GA₃ atau campuran auksin dan GA₃ (George dan Sherrington 1984). Untuk mengurangi kegagalan proses sterilisasi bahan tanaman, sangat dianjurkan tanaman induk berada atau ditumbuhkan di dalam kamar kaca. Keberadaan tanaman induk di kamar kaca memudahkan penyemprotan dengan fungisida dan bakterisida secara periodik sehingga dapat mengurangi kontaminasi bahan tanaman yang akan disterilisasi.

Sterilisasi eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara merendam bahan tanaman berupa potongan tunas apikal atau tangkai batang yang mempunyai tunas aksiler berukuran 2–3 cm dalam larutan kimia sistemik pada konsentrasi dan waktu perendaman tertentu, baik dengan menggunakan satu macam maupun beberapa macam sterilan. Tunas-tunas tersebut harus berasal dari hasil pemangkasan atau tunas air yang muncul dari batang tanaman dewasa. Contoh urutan sterilisasi pada jati sebagai berikut: perendaman dalam alkohol 70% selama 1–2 menit, dibilas dengan akuades steril 3 kali, dilanjutkan dengan perendaman dalam sodium hipoklorit 0,5–5% atau larutan pemutih komersial 10–30% sambil dikocok-kocok selama 10–30 menit, kemudian pembilasan dengan akuades steril 3–5 kali. Sterilan lain yang sering digunakan adalah kalsium hipoklorit atau kaporit, sublimat (HgCl₂), dan hidrogen peroksida (H₂O₂). Setelah sterilisasi selesai, eksplan ditiriskan di atas kertas saring atau *tissue* steril.

Media kultur

Eksplan yang telah disterilisasi harus segera ditanam secara *in vitro* pada media inisiasi tunas. Pada tahap ini, eksplan tanaman jati sering menunjukkan gejala adanya pencokelatan (*browning*) di sekitar potongan eksplan yang menghambat pertumbuhan eksplan. Gejala ini disebabkan adanya oksidasi senyawa fenolik yang banyak dihasilkan oleh jaringan tanaman yang berasal dari eksplan *in vivo*. Berbagai cara untuk menanggulangi masalah pencokelatan telah dilakukan, antara lain dengan penggunaan bahan antioksidan (seperti PVP pada konsentrasi 0,01–2% dan asam askorbik 50–200 mg/l), baik diaplikasikan pada eksplan sebelum ditanam maupun ditambahkan pada media kultur, atau kombinasi keduanya. Pendekatan lain untuk menanggulangi masalah pencokelatan pada kultur tanaman jati, yaitu dengan melakukan subkultur atau transfer eksplan pada media inisiasi baru secara periodik setiap 12 jam selama 3 hari berturut-turut (Tiwari *et al.* 2002). Umumnya media yang digunakan pada tahap induksi tunas jati ialah media MS padat yang ditambah ZPT BAP atau kinetin, atau kombinasi keduanya dengan konsentrasi antara 0,1–1 mg/l.

Tunas-tunas responsif yang tumbuh dari eksplan *in vivo* pada media induksi tunas (berukuran 1–2 cm) dapat dipotong dan disubkultur kembali pada media induksi tunas. Pada tahap ini, tunas akan mengalami pertumbuhan disertai pembentukan kalus pada bagian basal batangnya. Setelah berumur 3–4 minggu, tunas-tunas tersebut secara utuh (tidak dipotong) dipindahkan ke media elongasi berupa media dasar MS tanpa ditambahkan ZPT atau ditambahkan BAP konsentrasi rendah (0,01–0,05 mg/l), bahkan jika perlu dapat ditambahkan GA₃ 0,1–1 mg/l untuk pemanjangan buku tanaman. Biakan biasanya disimpan pada suhu ruang (25±2°C) dengan periode terang (1.000–3.000 lux) selama 16 jam per hari. Pada tahap elongasi ini, kecepatan tumbuh biakan dalam menghasilkan buku baru dipengaruhi oleh kalus kompak pada bagian dasar batang biakan. Umur biakan pada tahap pemanjangan tunas sekitar 3 minggu. Pada umur tersebut, tinggi biakan dapat mencapai 5–8 cm dengan jumlah buku antara 4–6. Buku yang dihasilkan dapat dipotong-potong dan dipindahkan kembali ke media induksi tunas. Jumlah buku yang dihasilkan sangat menentukan laju perbanyakan mikro tanaman jati.

Aklimatisasi

Umumnya biakan hasil kultur jaringan yang akan diaklimatisasi berupa planlet, artinya biakan harus mempunyai perakaran dan pertunasan yang proporsional. Akan tetapi, pada perbanyakan tanaman jati melalui kultur jaringan, biakan yang akan diaklimatisasi dapat berupa biakan tanpa perakaran (berupa setek mikro). Induksi perakaran dilakukan pada saat aklimatisasi dengan terlebih dahulu merendam atau mencelupkan bagian dasar batang dalam larutan yang mengandung senyawa auksin seperti IBA dan NAA, atau bahan pemacu perakaran yang sudah dikomersialkan (seperti Rooton F[®]). Biakan yang berasal dari tahap elongasi yang akan diaklimatisasi dan diinduksi perakarannya harus terlebih dahulu dibuang bagian kalusnya dan dibersihkan dengan air mengalir. Harus diperhatikan pula bahwa dalam proses aklimatisasi, tunas jati memerlukan kelembaban yang cukup dan media tumbuh yang tidak terlalu basah. Media tumbuh yang dipakai dapat berupa campuran tanah dan arang sekam (1 : 1), atau tanah dan serbuk sabut kelapa (1 : 1), atau tanah dan kompos halus (1 : 1). Media sebaiknya disterilisasi dahulu dengan pemanasan dan tekanan uap (*autoclave*). Media yang telah disterilisasi dapat diletakkan dalam bak plastik atau bak semen yang ada di kamar kaca. Untuk menjaga kelembaban dilakukan penyungkupan dengan plastik, sedangkan untuk mempercepat pertumbuhan bibit dilakukan penyemprotan pupuk daun seperti Hyponex[®], Bayfolan[®], Gandasil[®]. Umur bibit tanaman jati genjah hasil kultur jaringan yang cukup baik untuk dipindahkan ke lapang (bibit siap salur) berumur sekitar 3 bulan. Pada umur tersebut, bibit jati genjah dapat mencapai tinggi sekitar 30–50 cm.

Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.)

Tanaman nilam merupakan tanaman penghasil minyak atsiri atau minyak nilam (*patchouly* oil) yang banyak digunakan dalam industri kosmetik, parfum, sabun, antiseptik, dan insektisida. Keunggulan minyak tersebut dalam industri parfum karena sifatnya yang fiksatif, yaitu kemampuan dalam mengikat minyak lain sehingga keharumannya dapat bertahan lama, serta belum dapat dibuat secara sintetik. Indonesia merupakan negara pemasok terbesar kebutuhan minyak nilam dunia, mencapai sekitar 90%. Penghasil utama nilam di Indonesia, antara lain Provinsi Nangroe Aceh Darussalam, Sumatera Utara, Sumatera Barat, Bengkulu, Lampung, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali, Kalimantan Selatan, dan Kalimantan Tengah.

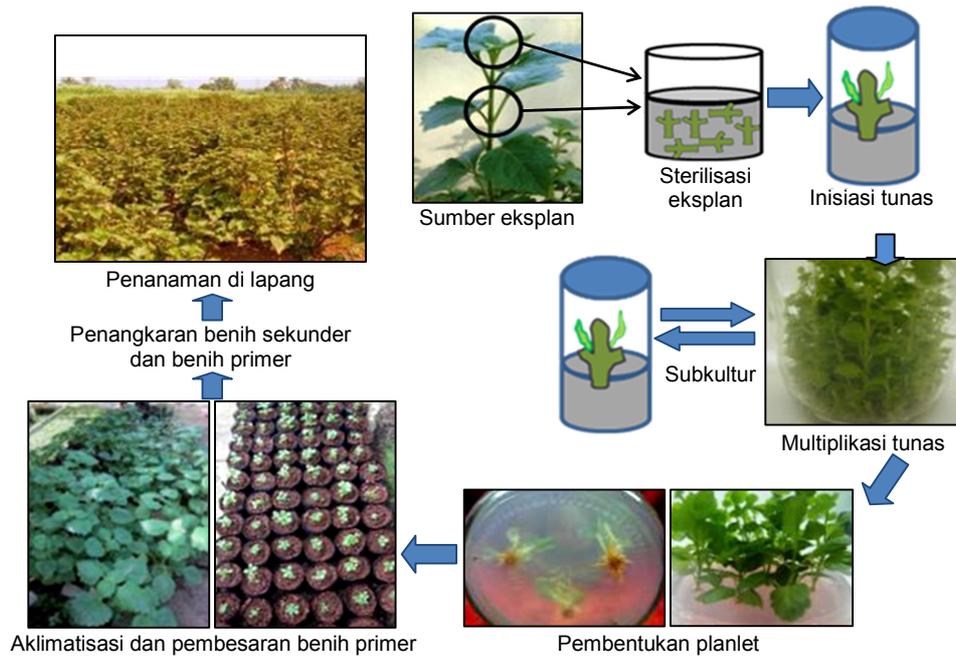
Umumnya perbanyakan tanaman nilam dilakukan secara vegetatif melalui setek pucuk atau setek batang. Permasalahan yang sering dihadapi dalam pengembangan nilam, antara lain penggunaan benih oleh petani yang berasal dari kebun produksi bukan dari kebun sumber benih sehingga produktivitas tanamannya rendah. Perbanyakan tanaman nilam melalui kultur jaringan dapat dimanfaatkan untuk memproduksi benih primer sebagai induk untuk diperbanyak di kebun penangkaran. Teknik kultur jaringan dapat membantu mempercepat penyediaan bahan tanaman nilam, terutama untuk varietas-varietas unggul yang jumlahnya masih terbatas. Tahapan perbanyakan tanaman nilam melalui kultur jaringan dapat dilihat pada Gambar VI.5.

Sumber eksplan dan sterilisasi

Sumber eksplan nilam dapat berupa tunas aksiler dan tunas apikal. Tanaman induk yang akan digunakan sebagai sumber eksplan sebaiknya dipelihara di rumah kaca. Pemangkasan tanaman induk untuk mendapatkan eksplan dengan jaringan juvenil akan membantu meningkatkan responsibilitas eksplan pada media kultur. Pengambilan eksplan dilakukan dengan memilih batang yang masih muda (berwarna hijau terang). Potongan batang satu buku yang mempunyai tunas aksiler berukuran 2–3 cm (disertai potongan petiol daun) dan potongan tunas apikal dimasukkan ke dalam wadah sterilisasi (*erlenmeyer*, botol kultur, atau gelas piala) yang berisi larutan detergen, kemudian dikocok beberapa saat dan bilas dengan air mengalir. Sterilisasi dilakukan dalam LAF dengan perendaman dalam alkohol 70% selama 2 menit, dilanjutkan dalam larutan sodium hipoklorit 0,5–5% atau larutan pemutih komersial 10–30%, sambil dikocok selama 10–30 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril 3–5 kali. Eksplan ditiriskan di atas kertas saring steril.

Media kultur

Eksplan batang satu buku atau tunas apikal nilam yang telah disterilisasi di tanam pada media induksi dan multiplikasi tunas, yaitu media padat $\frac{1}{4}$ MS



Gambar VI.5. Diagram perbanyakan mikro tanaman nilam.

(seperempat konsentrasi baku hara makro MS) atau media $\frac{1}{2}$ KH (setengah konsentrasi baku hara makro Knop Heller) ditambah vitamin MS tanpa meso-inositol. Setelah berumur 1–2 bulan biakan siap disubkultur atau dipinda ke media perakaran. Pembentukan planlet dapat dilakukan pada media perakaran $\frac{1}{2}$ KH dengan penambahan auksin NAA atau IBA 0,5–1 mg/l (Hutami *et al.* 2010). Waktu yang dibutuhkan selama pembentukan planlet sekitar 1 bulan.

Aklimatisasi

Aklimatisasi dapat dilakukan pada media tanah dan pupuk kandang (1 : 1) atau tanah, pasir, dan pupuk kandang (1 : 1 : 1). Aklimatisasi dapat dilakukan pada polibag atau bak pesemaian dengan pemberian sungkup dan naungan. Pada umur 2 bulan setelah aklimatisasi, tanaman nilam dapat mencapai tinggi sekitar 20 cm (Hutami *et al.* 2009) Benih nilam hasil aklimatisasi ini tergolong benih primer yang dapat ditangkarkan kembali melalui perbanyakan setek pucuk atau batang menjadi benih sekunder, sebelum digunakan sebagai benih produksi.

Buah Merah (*Pandanus conaideus* Lam.)

Tanaman buah merah tergolong dalam famili *Pandanaceae* (pandan-pandan) yang berasal dari Papua. Masyarakat Wamena, Papua, menyebutnya “kuansu” dan menggunakannya sebagai makanan pada pesta adat. Tanaman ini

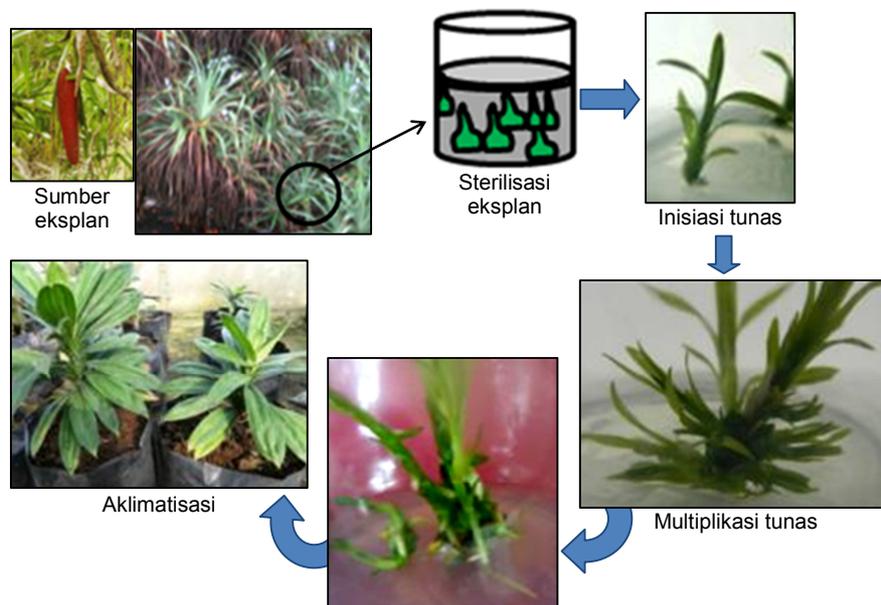
dapat mencapai tinggi 16 m. Buahnya dapat mencapai panjang 55 cm, diameter 10–15 cm, dan bobot 2–3 kg, saat matang berwarna merah marun terang.

Buah merah banyak dimanfaatkan sebagai obat untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit, seperti penyakit mata, cacangan, dan kulit, serta meningkatkan stamina. Buahnya mengandung komponen betakaroten dan tokoferol yang sangat berguna bagi kesehatan manusia, juga zat lain yang dapat meningkatkan daya tahan tubuh, antara lain asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, dekanolat, Omega 3, dan Omega 9, yang merupakan senyawa aktif penangkal terbentuknya radikal bebas dalam tubuh.

Besarnya permintaan buah merah akan mengakibatkan eksploitasi. Untuk mengantisipasi hal tersebut, upaya penyediaan bibit melalui teknik kultur jaringan merupakan salah satu cara yang dapat menyediakan bahan tanaman dalam jumlah besar dengan waktu relatif singkat. Tahapan perbanyakan tanaman buah merah melalui kultur jaringan dapat dilihat pada Gambar VI.6.

Sumber eksplan dan sterilisasi

Untuk mendapatkan sumber eksplan tanaman buah merah, perlu dilakukan pemangkasan terhadap pohon induknya guna mendapatkan jaringan yang bersifat juvenil. Pemangkasan yang berulang disertai penyemprotan ZPT BAP 5 mg/l guna mendapatkan tunas yang lebih banyak sangat dianjurkan (Hutami *et al.* 2013). Tunas muda yang digunakan sebagai eksplan berukuran sekitar 2–3 cm. Sterilisasi eksplan dilakukan berturut-turut menggunakan alkohol 70% selama 2 menit, sublimat $HgCl_2$ 0,2% selama 5–10 menit, dan kloroks 20–30%



Gambar VI.6. Diagram perbanyakan mikro tanaman buah merah.

selama 10–15 menit. Setiap selesai menggunakan sterilan tersebut, dilakukan pembilasan dengan akuades steril tiga kali.

Media kultur

Setelah selesai sterilisasi, eksplan ditanam pada media induksi tunas berupa media dasar MS padat ditambahkan BAP 1–3 mg/l. Selanjutnya eksplan dipindahkan ke media multiplikasi tunas MS yang mengandung BAP 1–3 mg/l dan *thidiazuron* (TDZ) 0,1–0,5 mg/l. Tunas yang terbentuk pada media multiplikasi kemudian dipindah ke media pemacu pemanjangan tunas berupa media MS ditambah BAP 0,02 mg/l + NAA 0,01 mg/l + GA₃ 0,1 mg/l (Purnamaningsih *et al.* 2013). Pembentukan planlet dapat terjadi pada media multiplikasi dengan komposisi media MS ditambah BAP 1 mg/l dan kinetin 1–2 mg/l serta glutamin 100 mg/l (Hutami *et al.* 2013). Biakan disimpan pada suhu ruang (24±2°C) dengan periode terang (1.000–2.000 lux) selama 16 jam per hari.

Aklimatisasi

Aklimatisasi dapat dilakukan di rumah kaca atau pesemaian dengan menggunakan polibag atau *potray*. Media tanam dapat berupa campuran tanah dan kompos (1 : 1). Disarankan media disterilisasi terlebih dahulu. Penyungkupan selama proses aklimatisasi untuk menjaga kelembaban dapat dilakukan secara individu (misalnya menggunakan gelas plastik) atau secara berkelompok (menggunakan lembaran plastik transparan).

Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz)

Ubi kayu merupakan salah satu komoditas pangan yang banyak digunakan sebagai salah satu sumber pangan karbohidrat alternatif. Selain itu, ubi kayu mempunyai peranan yang strategis dan multiguna, tidak hanya sebagai sumber bahan pangan karbohidrat, juga sebagai sumber bahan baku industri, kosmetik, pakan, dan bahan energi. Sebagai bahan baku industri, ubi kayu dapat diolah menjadi tapioka, sirup glukosa, *high fructose syrup*, *citric acid*, *monosodium glutamate*, bahan perekat *plywood*, maltosa, sorbitol, etanol, dan lain sebagainya. Sementara itu, krisis bahan bakar minyak yang terjadi saat ini menjadikan ubi kayu sebagai salah satu sumber bahan bakar nabati (*biofuel*) yang diandalkan sebagai penghasil bioetanol untuk campuran bahan bakar premium.

Penyediaan bahan tanaman ubi kayu selama ini dilakukan secara vegetatif (setek). Penggunaan teknologi kultur jaringan pada tanaman ubi kayu dibutuhkan apabila ketersediaan bahan tanaman dari klon-klon unggul tertentu yang diinginkan sangat terbatas. Selain itu, teknologi ini dapat membantu kegiatan pemuliaan tanaman (seperti perakitan varian baru melalui mutagenesis *in vitro*) dan pelestarian plasma nutfah melalui penyimpanan bahan tanaman secara *in vitro*.

Tahapan perbanyakan tanaman ubi kayu melalui kultur jaringan dapat dilihat pada Gambar VI.7.

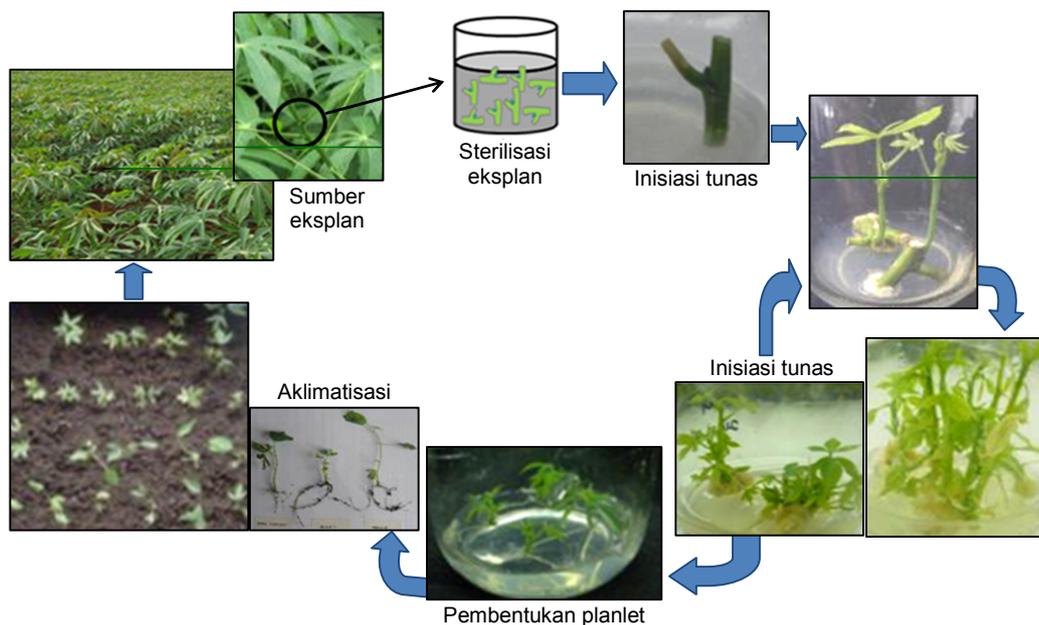
Sumber eksplan dan sterilisasi

Bahan tanaman ubi kayu yang dapat digunakan sebagai sumber eksplan, yaitu tunas aksiler yang berada pada pangkal tangkai daun. Untuk mengurangi tingkat kontaminasi selama periode kultur *in vitro*, sebaiknya sumber eksplan diambil dari setek yang dipelihara di rumah kaca dan dilakukan penyemprotan dengan fungisida dua kali seminggu.

Batang muda atau tangkai batang yang masih berwarna hijau dan mempunyai mata tunas aksiler dipotong dengan ukuran lebih kurang 5 cm. Secara berurutan, eksplan disterilisasi dengan perendaman dalam air sabun/detergen selama 15 menit, kemudian dibilas, dan direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida masing-masing 2 g/l selama 2 jam. Setelah itu eksplan dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali, kemudian direndam dalam larutan sodium hipoklorit 2% selama 30 menit. Eksplan dibilas dengan akuades steril yang mengandung 50 mg/l asam askorbat sebanyak 3 kali selama 10 menit. Dalam keadaan aseptik, ukuran eksplan dikurangi dengan cara dipotong-potong sampai ukuran panjang tunas 2–3 cm tanpa merusak bagian titik tumbuhnya.

Media kultur

Eksplan yang telah disterilisasi ditanam pada media inisiasi selama 1–2 minggu. Media inisiasi yang digunakan berupa media dasar MS + PVP 100 mg/l.



Gambar VI.7. Diagram perbanyakan mikro tanaman ubi kayu.

Setelah itu, eksplan dipindah ke media pembentukan tunas ganda (multiplikasi) berupa media dasar MS + adenin sulfat 80 mg/l dan BAP 1 mg/l dengan atau tanpa dikombinasikan TDZ 0,1 mg/l. Selama dalam media multiplikasi, eksplan disubkultur setiap 2 minggu selama 4–6 minggu. Tunas yang tumbuh pada media multiplikasi masing-masing diisolasi dan disubkultur kembali pada media yang sama. Untuk menjadi planlet, tunas dari media multiplikasi kemudian dipindah ke media perakaran MS + arang aktif 2 g/l + IAA atau NAA 0,1–1 mg/l selama 4–6 minggu.

Aklimatisasi

Setelah planlet dianggap cukup untuk dipindahkan, dilakukan aklimatisasi di kamar kaca. Media tanam yang akan digunakan berupa campuran tanah dan pasir yang sudah diayak (1 : 1) dalam bak plastik atau polibag. Penyungkupan dengan plastik transparan perlu dilakukan untuk menjaga kelembaban dan diberi naungan paranet 60–70%.

Abaka (*Musa textilis* Nee.)

Abaka merupakan tanaman yang termasuk dalam famili *Musaceae* sekera-bat dengan tanaman pisang. Abaka berasal dari Filipina, akan tetapi ada yang mengatakan dari kepulauan Sangir dan Talaud. Tanaman abaka mempunyai berbagai nama daerah seperti walzi (Talaud), balri atau hote (Sangir), kofo sangi, pisang benang, atau pisang manila (Minahasa), dan cau manila (Jawa Barat) (Avivi dan Ikrarwati 2004). Abaka mempunyai nilai ekonomi pada bagian batangnya yang mengandung serat untuk bahan baku industri tekstil dan kertas. Seratnya mempunyai sifat fisik yang kuat, tahan kondisi lembab, dan air asin sehingga baik untuk digunakan sebagai bahan baku kertas berkualitas tinggi yang tahan simpan (seperti uang, kertas dokumen, kertas cek), kertas penyaring, pembungkus teh celup, bahan pakaian, pembungkus kabel dalam laut, serta tali temali lainnya (Triyanto *et al.* 1982). Karena seratnya yang multiguna dan prospeknya yang cukup baik, abaka banyak mendapat perhatian berbagai kalangan masyarakat baik swasta, BUMN, koperasi maupun petani.

Tanaman abaka dapat diperbanyak melalui anakan, bonggol atau biji. Perbanyakannya melalui anakan dari setiap rumpun hanya menghasilkan 15–25 propagul dalam 20–24 bulan (Dempsey 1963). Perbanyakannya melalui bonggol (vegetatif), selain tingkat multiplikasinya rendah, biasanya menghadapi beberapa masalah. Pada program pengembangan tanaman secara luas atau di daerah pengembangan baru, bahan vegetatif tersebut mudah rusak dalam pengangkutan, tidak tahan lama, dan memerlukan ruang yang besar sehingga biaya angkutan tinggi. Di samping itu, bibit asal bonggol berpotensi sebagai sumber penyakit yang sulit dikendalikan, terutama bakteri dan virus. Perbanyakannya melalui biji biasanya akan menghasilkan serat yang mutunya di bawah serat tanaman

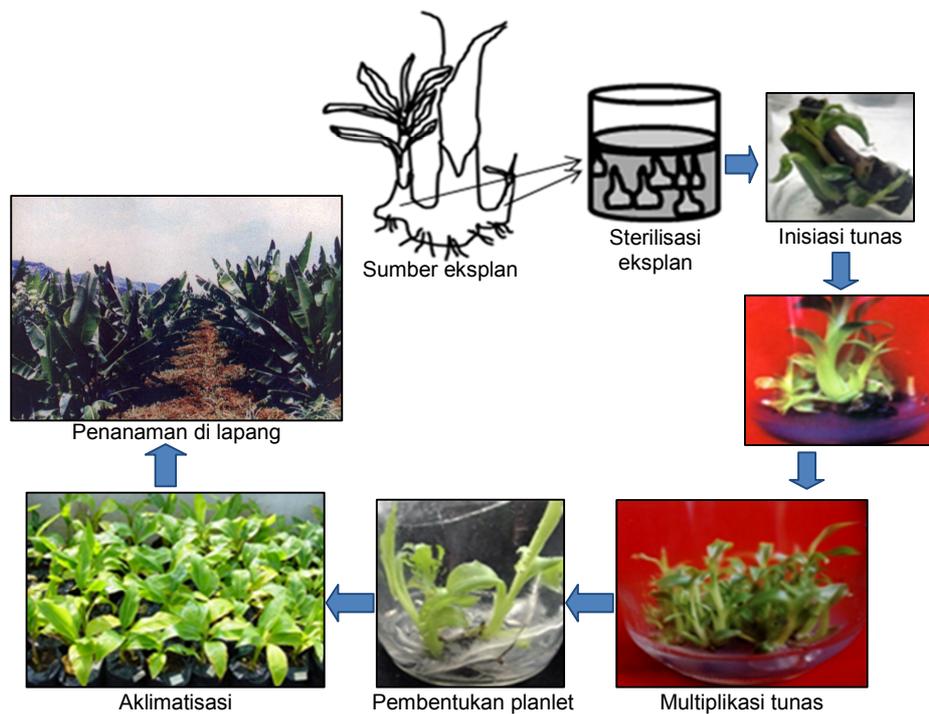
induknya (Nur 1957). Tahapan perbanyak tanaman abaka melalui kultur jaringan dapat dilihat pada Gambar VI.8.

Sumber eksplan dan sterilisasi

Seperti halnya pada tanaman pisang, sumber eksplan tanaman abaka berupa mata tunas yang berasal dari bonggol tanaman. Sterilisasi biasanya dilakukan dalam beberapa tahap. Pertama, eksplan dicuci dengan detergen atau bahan pencuci lain, selanjutnya tunas diambil dari rimpang dan direndam berturut-turut dalam Benlate™ 0,5% selama 5 menit, alkohol 70% selama 5 menit, kloroks 20% selama 20 menit, dan HgCl₂ 0,2% selama 5 menit. Akhirnya, eksplan dibilas dengan akuades steril 3–5 kali sampai larutan bahan kimia hilang. Dengan perlakuan tersebut, 80–90% eksplan yang disterilkan tidak terkontaminasi setelah dikulturkan. Apabila kontaminan tetap ada, konsentrasi dan lamanya perendaman sterilan dapat ditingkatkan.

Media kultur

Setelah disterilkan eksplan ditumbuhkan pada media kultur. Penanaman pada media kultur terdiri atas beberapa tahap. Tahap pertama ialah penanaman eksplan pada media induksi tunas, media MS (padat atau cair) ditambahkan ZPT BAP 0,1–0,5 mg/l. Setelah terbentuk tunas (umur 1–2 bulan) dilanjutkan tahap berikutnya, yaitu pemindahan tunas pada media multiplikasi MS ditambahkan



Gambar VI.8. Diagram perbanyak mikro tanaman abaka.

BAP 3–5 mg/l. Apabila eksplan dalam periode yang lama (1–2 bulan) belum ber-multiplikasi (mengganda) karena faktor dormansi yang kuat, ke dalam media sebaiknya diberikan juga TDZ 0,3–0,6 mg/l. Kemampuan multiplikasi akan meningkat apabila biakan disubkultur berulang kali. Perlu diperhatikan, walaupun subkultur dapat meningkatkan faktor multiplikasi, dapat juga meningkatkan terjadinya mutasi. Untuk itu, biakan perlu diistirahatkan pada media MS₀, yaitu tanpa ZPT atau kembali menggunakan mata tunas dari pertanaman di lapang.

Apabila jumlah tunas sudah dianggap cukup, maka tahap selanjutnya ialah pemindahan tunas-tunas tersebut pada media perakaran, yaitu media $\frac{1}{2}$ MS (media MS dengan pengenceran garam makro separuh dari konsentrasi baku) ditambah NAA 0,5–2 mg/l. Seluruh tahapan penanaman pada media kultur *in vitro* dilakukan di ruang kultur pada suhu 24°C dengan kondisi pencahayaan 1.000–2.000 lux selama 16 jam/hari.

Aklimatisasi

Aklimatisasi dapat dilakukan di rumah kaca atau pesemaian. Faktor yang paling penting untuk diperhatikan ialah kelembaban yang harus dipertahankan tetap tinggi, terutama pada tahap awal. Setelah planlet kelihatan tumbuh segar, kelembaban berangsur-angsur dikurangi sampai akhirnya sama dengan kelembaban luar.

Aklimatisasi di rumah kaca dapat dilakukan dalam dua tahap. Pada tahap pertama, planlet dari botol kultur ditanam pada media yang bebas patogen penyakit. Media penanaman dapat berupa pasir atau tanah dicampur humus yang telah disterilkan. Agar kelembaban mudah dipertahankan, eksplan dapat ditanam pada bak plastik dan ditutup dengan sungkup plastik. Setelah tanaman tumbuh segar, sungkup dibuka secara berangsur-angsur dan akhirnya tutup dibuka selamanya. Setelah berumur 1–2 bulan bibit dipindah ke dalam polibag yang telah diisi dengan campuran tanah dan pupuk kandang steril. Setelah bibit tampak segar, polibag dapat dipindah keluar rumah kaca dan selanjutnya dipelihara seperti bibit konvensional sampai siap tanam.

Pada tahap kedua, planlet dari botol kultur dapat langsung ditanam di bedengan pesemaian. Tanah pesemaian sebaiknya dipilih yang gembur dan bebas penyakit. Agar bebas penyakit, tanah dapat disterilkan dengan larutan formalin 4% sebanyak 3–5 l/m². Naungan pesemaian dapat dibuat dari plastik yang dirancang sedemikian rupa sehingga dapat mempertahankan kelembaban yang tinggi. Pada tahap awal (selama seminggu) pesemaian ditutup dengan kain untuk mengurangi sinar matahari langsung. Untuk mempertahankan kelembaban, pesemaian disiram 2 kali sehari sampai umur 1 bulan. Setelah itu, frekuensi penyiraman dikurangi dan naungan dibuka secara berangsur-angsur. Bibit dapat ditanam setelah berumur 2 bulan.

Estimasi Produksi Benih

Secara teoritis, jumlah benih tanaman yang dapat dihasilkan melalui perbanyakan dengan teknik kultur jaringan dapat diperkirakan. Berdasarkan jumlah biakan (seperti tunas, buku, atau embrio) yang dapat dijadikan sebagai faktor penggandaan atau multiplikasi yang dihasilkan dari setiap periode subkultur, jumlah tanaman yang dapat dihasilkan pada satuan waktu tertentu dapat diprediksi. Dengan memperhitungkan beberapa faktor lain yang dapat menyebabkan kehilangan/kerusakan selama proses perbanyakan di laboratorium dan rumah kaca, Pennell (1987) memberikan formulasi untuk menghitung potensi jumlah tanaman yang dapat dihasilkan secara teoritis dalam satu periode (satu tahun), dengan rumus sebagai berikut:

$$y = A^n \times B \times F1 \times F2 \times F3$$

- dengan: y = jumlah planlet/tanaman yang dapat dihasilkan
A = jumlah tunas, buku, atau embrio yang dihasilkan pada setiap periode subkultur (faktor multiplikasi)
B = jumlah eksplan awal yang tumbuh
n = jumlah subkultur pada periode tertentu (per tahun)
F1 = persentase keberhasilan kultur pada tahap induksi tunas
F2 = persentase keberhasilan kultur pada tahap elongasi tunas
F3 = persentase keberhasilan aklimatisasi

Sebagai contoh, suatu laboratorium kultur jaringan memulai kegiatan perbanyakan tanaman jati genjah dengan hanya satu eksplan awal berupa tunas yang sudah steril dan responsif (B), dengan asumsi jumlah buku yang dapat disubkultur sebanyak 3 (A), frekuensi subkultur 8 kali per tahun (n), 80% keberhasilan pada tahap induksi tunas (F1), 90% keberhasilan pada tahap elongasi (F2), dan 80% keberhasilan pada tahap aklimatisasi (F3), maka jumlah tanaman yang dapat diproduksi setiap satu eksplan per tahun (y) ialah:

$$3^8 \times 1 \times 0,8 \times 0,9 \times 0,8 = 3,779 \text{ tanaman}$$

Apabila eksplan awal (B) yang ditanam sebanyak 10, jumlah tanaman yang dapat dihasilkan sekitar 37.790, jika eksplan awal 100 maka jumlah tanaman yang dapat dihasilkan 377.900, demikian seterusnya.

Perlu diingat bahwa jumlah tanaman yang dihasilkan tersebut merupakan perhitungan teoritis. Pada pelaksanaannya akan sangat bergantung pada beberapa faktor pendukung lain yang berkaitan dan sangat menentukan, seperti jumlah tenaga kerja dan fasilitas yang tersedia. Sebagai contoh, George dan Sherrington (1984) mengemukakan bahwa dengan kemampuan tanam 90–100 tunas/orang/jam, untuk memproduksi 1 juta tanaman dalam waktu serentak diperlukan beberapa ratus orang pekerja, yang tentunya akan memerlukan sarana laboratorium yang sangat besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Avivi, S. dan Ikrarwati. 2004. Mikropropagasi pisang abaka (*Musa textillis* Nee) melalui teknik kultur jaringan. Ilmu Pertanian 11(2):27-34.
- Dempsey, J.M. 1963. Long Vegetable Fibre Development *In Vitro* South Vietnam and other Asian Countries 1957-1962. Usom-Saigon. p. 179.
- Direktorat Perbenihan dan Sarana Produksi. 2008. Penyediaan bibit tebu berkualitas melalui kebun berjenjang. <http://ditjebun.deptan.go.id/benihbun/benih>.
- Donnelly, D.J., W.K. Coleman, and S.E. Coleman. 2003. Potato microtuber production and performance. Am. J. Potato Research 80:103-115.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- George, E.F. and P.C. Debergh. 2008. Mikropropagation: Uses and Methods. p. 29-64. *In* E.F. George, M.A. Hall, and G.J. De Klerk (eds.) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Ed. Springer, The Netherlands,
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegenetics Ltd., Basingstoke, Hants, England. 709 p.
- Gubbuk, H. and M. Pekmezci. 2004. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). Turk J. Agric. For. 28:355-361.
- Gupta, P.P. 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. Plant Cell Tiss. Org. 6:33-39.
- Hutami, S., I. Mariska, dan W.H. Adil. 2010. Metode perbanyakan *in vitro* nilam unggul dengan produktivitas minyak 250 kg/ha/tahun dan toleran kekeringan yang lebih murah 50% dari metode baku. Laporan Akhir Penelitian Program Insentif Peningkatan Kemampuan Peneliti dan Perekayasa (RIPP) TA 2010. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Hutami, S., R. Purnamaningsih, dan I. Mariska. 2010. Mikropropagasi tanaman buah merah (*Pandanus conoideus*) melalui kultur *in vitro*. Proceeding Nasional Conference on Green Technology for Better Future. Malang, 20 November 2010. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim, Malang. hlm. 98-101.
- Imelda, M. 1991. Penerapan teknologi *in vitro* dalam penyediaan bibit pisang. Prosiding Seminar Bioteknologi dan Lokakarya Biopolimer untuk Industri. Bogor, 10-11 Desember 1991. hlm. 71-79.
- International Atomic Energy Agency. 2004. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting

Organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, 26-30 August 2002. 106 p.

- Jalaja, N.C., D. Neelamathi, and T.V. Sreenivasan. 2008. Micropropagation for quality seed production in sugarcane in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization (FAO) and Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB), Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions (APAARI). p. 46.
- Lee, S.W. 2006. Micropropagation of cavendish banana in Taiwan. Food and Fertilizer Technology Center, Taiwan. <http://www.agnet.org/library.php?func=view&id=20110809105140>.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Naik, P.S. and J.L. Karihaloo. 2007. Micropropagation for production of quality potato seed in Asia-Pacific. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology. New Delhi, India. p. 47+viii.
- Nur. 1957. Observasi pada *Musa textilis* Nee. Bagian Pertama. Catatan-catatan mengenai Biologi Bunga. Teknik Pertanian. hlm. 391-411.
- Pennell, D. 1987. Micropropagation in Horticulture. Grower Guide No. 29. Grower Books, London. England. 71 p.
- Priyono dan S. Mawardi, 1993. Kajian penggunaan pisang sebagai penangung pada kopi dan kakao. I. Penyediaan bibit secara *in vitro*, pembentukan dan perakaran bud-like body pada *Musa paradisiaca*. Pelita Perkebunan 9(1):29-35.
- Purnamaningsih, R., S. Hutami, dan I. Mariska. 2010. Studi perbanyakan bibit buah merah melalui kultur *in vitro*. Proceeding Nasional Conference on Green Technology for Better Future. Malang, 20 November 2010. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim, Malang. hlm. 52-56..
- Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Sulistiani, E. dan S.A. Yani. 2012. Produksi Bibit Tanaman dengan Menggunakan Teknik Kultur Jaringan. SEAMEO BIOTROP. 147 hlm.
- Tiwari, S.K., K.P. Tiwari, and E.A. Siril. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell Tiss. Org.* 71:1-6.
- Triyanto, H.S., Muliah, dan M. Edi. 1982. Batang abaka (*Musa textilis* Nee.) sebagai bahan baku kertas. *Berita Sellulosa.* hlm. 18-27.