



# Kultur Jaringan Manggis

634.471

TRI  
h

*Garcinia mangostana L.)*



Departemen Pertanian  
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian  
**Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika**  
2008

634.471  
TKI  
h



BK017417

# Kultur Jaringan Manggis

*Garcinia mangostana* (L.)

Oleh:

**Rahayu Triatminingsih**

Departemen Pertanian

Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

**Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika**

**2008**



**Kultur Jaringan Manggis**  
**(*Garcinia mangostana* L.)**

*Disusun oleh:*

**Rahayu Triatminingsih**

e-mail: [rhtriatmi@yahoo.com](mailto:rhtriatmi@yahoo.com)

*iv, 42 halaman*

ISBN : 978-979-1465-10-6

*Diterbitkan oleh:*

**Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika**

Jl. Raya Solok–Aripan, Km 8, PO Box 5

Telp. 0755-20137, Fax. 0755-20592

Solok, Sumatera Barat

Tahun 2008



## KATA PENGANTAR

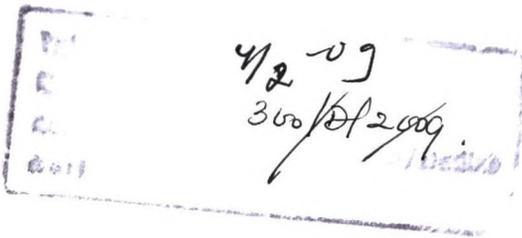
Pengembangan tanaman buah dalam skala perkebunan dan bukan lagi dalam skala pekarangan adalah tepat. Untuk itu, teknologi yang harus segera tersedia adalah 1) Teknologi pembibitan dan teknik pengelolaan bibit sampai siap tanam dan pengangkutan bibit (transpotasi), 2) Teknologi pengelolaan kebun dan teknologi produksi. Teknologi pembibitan yang diciptakan tersebut dituntut yang efisien dan ramah lingkungan. Teknologi pembibitan yang baik untuk memenuhi usaha pengembangan tanaman adalah teknik perbanyak klonal. Fasilitas untuk perbanyak klonal dalam jumlah yang banyak adalah teknik kultur *in vitro*. atau kultur jaringan

Informasi teknik kultur jaringan manggis telah disusun oleh peneliti Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika. Tulisan ini merupakan suntingan dari hasil-hasil penelitian, serta literatur pendukung lainnya. Diharapkan informasi teknik ini dapat diterapkan dan berguna yang merupakan alternatif teknik pembibitan dalam usaha meningkatkan kualitas dan kuantitas bibit yang bermutu dalam jumlah yang banyak.

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu, sehingga penerbitan buku ini dapat dilaksanakan dengan baik. Kami mengharapkan kritik dan saran demi perbaikan dan kesempurnaan tulisan ini.

Solok, Agustus 2008  
Kepala Balai,

Ir. Nurhadi, MSc  
NIP 080029566





<b>DAFTAR ISI</b>	
<b>KATA PENGANTAR</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI</b>	<b>1</b>
<b>PENDAHULUAN</b>	<b>3</b>
<b>KULTUR JARINGAN/BUDIDAYA JARINGAN</b>	<b>5</b>
<b>SISTEM REGENERASI TANAMAN</b>	<b>10</b>
<b>FAKTOR PENDUKUNG</b>	<b>13</b>
A. Faktor Dalam .....	13
B. Faktor Luar.....	14
<b>FASILITAS YANG DIPERLUKAN</b>	<b>17</b>
<b>PROSEDUR TEKNIK KULTUR JARINGAN MANGGIS</b>	<b>188</b>
A. Kultur Bunga/buah Muda Manggis .....	19
B. Kultur Biji Manggis .....	23
C. Multiplikasi Tunas Pucuk Manggis .....	27
<b>CIRI-CIRI MEDIA TUMBUH YANG BAIK</b>	<b>30</b>
<b>BEBERAPA SUBSTANSI PENTING</b>	<b>33</b>
A. Vitamin .....	34
B. Cobalt (Co).....	34
C. <i>Hyperhydricity</i> .....	35
<b>CONTOH KOMPOSISI MEDIA MURASHIGE and SKOOG (MS), GAMBORG (B5) DAN WPM</b>	<b>36</b>
A. Komposisi Media MS <i>Multi-shoot</i> .....	36
B. Komposisi Media Gamborg (B5) .....	37
C. Komposisi Media WPM .....	38
D. Berat Molekul.....	39
<b>SUMBER PUSTAKA</b>	<b>40</b>



## PENDAHULUAN

Untuk mendukung usaha pengembangan tanaman buah maka ketersediaan bibit yang bermutu, dalam jumlah banyak, yang cepat berbuah dan kualitas buah baik, sesuai serta benar varietasnya sangat diperlukannya. Disamping itu teknologi yang diciptakan dituntut untuk efisien dan ramah lingkungan. Teknologi yang harus segera tersedia adalah a) Teknologi pembibitan yang bermutu dan teknik pengelolaan bibit sampai siap tanam dan angkut (transpotasi), b)Teknologi pengelolaan kebun dan teknologi produksi

Bibit merupakan modal utama atau langkah utama yang harus diperhatikan pada usaha penanaman tanaman buah. Jika modal utama baik maka akan memudahkan langkah selanjutnya. Teknologi pembibitan yang baik untuk memenuhi usaha pengembangan tanaman adalah teknik perbanyakan klonal. Fasilitas untuk perbanyakan klonal dalam jumlah yang banyak adalah teknik kultur *in vitro*. Budidaya Jaringan/Kultur jaringan (*in vitro*) semula merupakan suatu alat/ metode kemudian menjadi teknik dan sekarang telah berkembang menjadi orientasi

teknologi. Selain untuk memperbanyak klonal, teknik kultur *in vitro* tersebut dapat pula sebagai fasilitas untuk memperbaiki varietas maupun produksi bibit bebas penyakit maupun tanaman haploid.

Jadi potensi keuntungan dari teknik kultur jaringan adalah :

1. Memproduksi tanaman dalam jumlah besar dan relatif cepat.
2. Memproduksi tanaman bebas penyakit dari induk yang terinfeksi.
3. Memproduksi tanaman yang sulit diperbanyak secara seksual

## **KULTUR JARINGAN/BUDIDAYA JARINGAN**

Suatu individu sel-sel dari organisma mempunyai sifat yang disebut totipotensi. Menurut Schwann (1839) dikatakan bahwa setiap kehidupan sel dari suatu organisma multiselulair mempunyai kemampuan berkembang secara bebas bila diperlukan dan sesuai dengan kondisi eksternal. Totipotensi sel adalah suatu kemampuan untuk berkembang dengan jalan beregenerasi menjadi suatu organisme lengkap (utuh).

Pada prinsipnya, teknik budidaya jaringan adalah teknik menumbuhkan/ membiakan/ membudidayakan eksplan pada media buatan kemudian dipelihara dalam suatu ruangan yang terkontrol lingkungannya dan pekerjaan tersebut dilakukan secara aseptik. Jadi yang mempengaruhi keberhasilan dari budidaya jaringan adalah Kebersihan, Eksplan, Media dan lingkungan (Suhu dan lama penyinaran).

Menurut bagian yang akan dibudidayakan, maka Biak Jaringan atau Kultur jaringan dapat dibagi menjadi

4 teknik yaitu :1). Kultur Organ, 2). Kultur Kalus, 3). Kultur suspensi sel dan 4). Kultur Protoplas.

Keberhasilan mikropropagasi atau biak sel ini diawali dengan pemilihan material tanaman yang tepat. Materi atau bagian tanaman yang akan dibiakan/diregenerasikan mempunyai karakter pertumbuhan dan morfologi yang tidak sama, sehingga penanganannya tidak sama pula. Bagian tanaman yang akan diregenerasikan/ dibiakkan/ dibudidayakan secara Kultur Jaringan tersebut disebut EKSPLAN.

Media yang digunakan untuk budidaya jaringan/kultur jaringan terdiri atas beberapa komponen yaitu nutrisi in organik, sumber besi, vitamin, amino asid, zat pengatur tumbuh, sumber karbon, pematid/ agar dan akuades. Formulasi nutrisi media yang tepat merupakan faktor yang mendukung keberhasilan teknik tersebut. Komponen tersebut memenuhi satu atau lebih fungsi didalam pertumbuhan tanaman secara *in vitro*. Vitamin penting untuk berbagai reaksi biokimia. Level zat pengatur tumbuh (ZPT) biasanya merupakan faktor pembatas untuk keberhasilan differensiasi pertumbuhan

dari kultur sel tanaman. ZPT yang sering digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah Auksin dan Sitokinin. Konsentrasi auksin dan sitokinin yang optimum untuk pertumbuhan berbeda dari satu species dengan species yang lain. Pada umumnya bila konsentrasi auksin rendah dan konsentrasi sitokinin dinaikan akan dapat merangsang differensiasi kalus ke arah pembentukan tunas

Secara umum tahapan Budidaya Jaringan adalah sebagai berikut:

1. Sterilisasi permukaan eksplan (material tanaman)
2. Tahap untuk mendapatkan biakan/eksplan yang bersih (Culture establishment) : yaitu dengan jalan menempatkan jaringan atau biakan pada media pemeliharaan yang tepat. Tahap ini sering disebut pula dengan tahap pematapan.
3. Tahap multiplikasi atau reproduksi.
4. Tahap pembentukan tanaman lengkap, sering disebut tahap persiapan tanaman ke media tanah.
5. Aklimatisasi, tahap ini sering disebut tahap adaptasi tanaman untuk ditanam ke lapang/kebun

Bahan tanaman untuk pembibitan manggis secara *in-vitro* (eksplan ) dapat berupa biji, atau tunas pucuk Eksplan tersebut telah membentuk tunas  $5,6 \pm 2,82$  pada media WPM + 2 ppm BAP + 0,2 ppm NAA (Triatminingsih dkk., 1994) Untuk meningkatkan multiplikasi tunas perlu dilakukan pensubkulturasi dengan selang waktu tertentu (George dan Sherrington, 1984; Mariska dkk, 1987). Selang waktu subkultur tersebut erat hubungannya dengan komposisi media, besar/jumlah propagula dan stadia pertumbuhan propagula (George dan Sherrington, 1984).

Untuk merangsang pertumbuhan tunas secara *in vitro* diperlukan penambahan zat nabati seperti ekstrak pisang, tomat, kentang dan sebagainya. Yang menurut Kartha (1991), ekstrak pisang atau tomat merupakan bahan pelengkap organik. Ekstrak tersebut dapat memasok pelbagai senyawa yang dapat merangsang laju pertumbuhan sel (Gamborg, 1991). Zat nabati tersebut mengandung karbohidrat dan vitamin yang berfungsi sebagai pembentuk sel-sel baru yang sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan. Dengan demikian fungsi ekstrak

buah pisang mirip dengan sitokinin yaitu meningkatkan multiplikasi tunas. Dengan digantikannya hormon sitokinin dengan ekstrak buah pisang dapat memberikan respon pertumbuhan yang tetap normal sehingga diperoleh media subkultur yang lebih murah. Dan dengan mengetahui penggandaan tunas yang optimum maka dapat memperkirakan kebutuhan eksplan untuk mendapatkan bibit dalam jumlah tertentu.

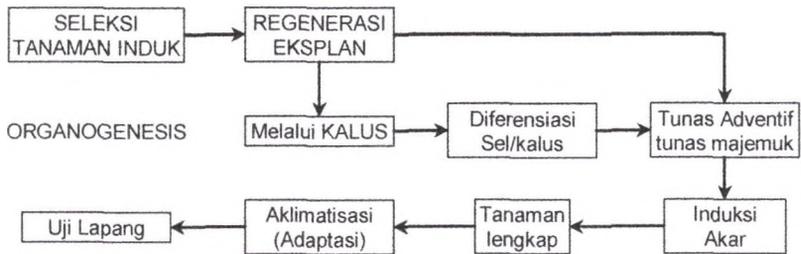
## **SISTEM REGENERASI TANAMAN**

Ada dua sistem yang digunakan untuk meregenerasikan tanaman (bagian tanaman yang akan dibudidayakan) secara *in vitro* yaitu dapat melalui 1) sistem organogenesis atau 2) sistem somatik embriogenesis. Pada sistem organogenesis, outputnya adalah memproduksi struktur unipolar yaitu tunas atau akar. Sedang embriogenesis somatik, kita memproduksi struktur bipolar yaitu embrio, meliputi calon akar sekaligus calon tunas. Embrio yang terbentuk tersebut tanpa melalui fusi sel gamet tetapi berkembang dari sel somatik. Embriogenesis somatik (ES) dibedakan menjadi dua yaitu langsung dan tak langsung. Pada ES langsung pembentukan Embryonya tidak melalui fase pertumbuhan kalus. Sedang ES tidak langsung, embrio terbentuk melalui fase kalus. Pertumbuhan dan perkembangan dari kalus menjadi embrio yaitu mulai dari proembryo → globular → hati → terpedo → plantlet. Fase pertumbuhan embryo ini merupakan penelitian yang berkesinambungan. Masing-masing stadia embriogenesis

tersebut memerlukan perlakuan yang berbeda, dan mentransfernya dari media yang satu ke media yang lain.

Alur kegiatan budidaya jaringan adalah seperti diagram dibawah ini :

Alur kegiatan budidaya jaringan:



Gambar Alur kegiatan kultur biak jaringan/ budidaya jaringan yang merupakan suatu Input-Proses-Output

**Embryo** adventif/embryo somatik adalah embryo yang berasal dari sel somatik dalam bakal biji yang terbentuk dari nucellus atau integumen atau dari somatik yang lain. Oleh karena itu konstitusi genetik identik dengan tanaman induk.

## **FAKTOR PENDUKUNG**

Faktor-faktor yang mendukung keberhasilan teknik pembibitan secara kultur jaringan dapat dibedakan menjadi 2 yaitu faktor dalam dan faktor luar.

### **A. Faktor Dalam**

Jenis tanaman, umur & status fisiologi tanaman, ukuran eksplan, posisi organ tanaman dan kesehatan status nutrisi tanaman merupakan faktor dalam yang mempengaruhi persentase keberhasilan teknik tersebut..Bahkan oleh (Read, 1988) dikatakan bahwa tanaman stock yang akan diambil eksplannya perlu perhatian khusus dengan memberi perlakuan fisik. Jaringan daun manggis dapat kehilangan potensi morphogenesis atau organogenesis oleh karena perbedaan warna daun (Goh dkk., 1990). Tanaman yang disemprot dengan pupuk daun (Greensit 2 cc/l) tiga hari sebelum eksplannya diambil akan lebih baik hasilnya (Triatminingsih, 1992). Kultur jaringan pada tanaman berkayu sering terhambat karena adanya browning/pencoklatan terutama pada tahap awal / tahap inisiasi

(Conger, 1981; Yu & Meredith, 1986 ). Hal itu terjadi pada Kultur *in vitro* mangga (Karsinah dkk., 1991; Nazir dkk., 1994), Lengkeng dan Rambutan (Triatminingsih, 1996; Nazir 1991) maupun tanaman buah lainnya seperti pisang. Adanya pencoklatan tersebut dapat diatasi dengan jalan menurunkan konsentrasi pemberian zat pengatur tumbuh pada media subkultur (Triatminingsih dkk, 1996), inkubasi dalam gelap, pretreatmen eksplan dengan anti oksidan, sering disubkulturkan pada media baru (Yu & Meredith, 1986) atau mengurangi konsentrasi garam makro (Pierik, 1987 *dalam* Nazir, 1994).

## **B. Faktor Luar**

Sedang faktor luar adalah kombinasi zat pengatur tumbuh Auksin- Sitokinin, komposisi nutrisi pada media buatan, suhu dan lama penyinaran yang tepat.. Zat Pengatur Tumbuh yang sering digunakan adalah Benzil Adenin/ Benzil Aminopurine (BAP), Kinetin, NAA, IAA, IBA, 2,4-D . Konsentrasi NAA dan BAP yang tinggi akan mengarah ke pembentukan kalus eksplan batang muda manggis, namun jumlah tunas yang

terbentuk menjadi sedikit (Triatminingsih dkk., 1995). Media buatan yang dimaksud diatas adalah komposisi media dasar yang telah baku seperti media Murashige and Skoog (MS), media Woody Plant (WPM), media Gamborg (B5) atau memodifikasi media dasar tersebut. Media dasar tersebut diperkaya dengan myo-inositol dan sumber karbon.

Disamping itu faktor luar yang tidak kalah penting adalah air (kualitas air dan kontinuitas) dan listrik (Made, 1992). Arus listrik yang sering padam dan hidup mendadak selain berpengaruh terhadap alat-alat elektronik juga akan mengganggu kegiatan Budidaya Jaringan. Sinar (intensitas dan lama penyinaran) berpengaruh pula terhadap pertumbuhan jaringan. Lama penyinaran untuk pertumbuhan jaringan tanaman secara *in vitro* berkisar 12–16 jam perhari, berbeda beda tergantung species tanaman dan tahapan perkembangan jaringan tersebut.



Eksplan biji untuk kultur jaringan



Buah manggis muda



Eksplan bunga manggis



Kalus yang tumbuh pada eksplan tunas pucuk manggis

## FASILITAS YANG DIPERLUKAN

Untuk menunjang proses kultur jaringan tersebut selain bahan kimia diperlukan pula fasilitas utama yaitu:

1. Ruang/kamar yang terdiri dari: (a) ruang untuk pembuatan media, (b) ruang untuk penanaman eksplan, dan (c) ruang pemeliharaan kultur biak yang dilengkapi AC, rak tempat botol kultur, dan lampu TL 20 wat.
2. Peralatan seperti autoclave, timbangan, kotak kabinet steril atau *laminar air flow*, kompor, lemari pendingin, pisau, pinset, botol/gelas kultur, tabung ukur, pipet, petridish
3. Rumah kaca/rumah *screen*
4. Ruang uji mutu beserta peralatannya.

Tata letak ruangan tersebut dirancang sedemikian rupa sehingga pelaksanaan pekerjaan kultur *in vitro* dapat merupakan proses tahapan yang lancar mulai tahap 1 sampai dengan selanjutnya (aklimatisasi).

## **PROSEDUR TEKNIK KULTUR JARINGAN MANGGIS**

Pada bab ini dijelaskan prosedur teknik kultur jaringan dari 3 macam eksplan manggis yaitu kultur buah muda manggis, kultur biji manggis dan kultur tunas pucuk manggis. menunjukkan respon pertumbuhan yang berbeda. Masing-masing jenis eksplan memerlukan penanganan yang berbeda-beda. Hal itu berhubungan dengan kandungan zat pengatur tumbuh endogennya. Konsentrasi NAA yang ditambahkan pada media akan membantu sitokinin dalam organogenesis dan morfogenesis. Konsentrasi NAA dan BAP yang tinggi akan mengarah ke pembentukan kalus eksplan manggis, namun jumlah tunas yang terbentuk menjadi sedikit. Keragaan plantlet manggis yang baik tersebut akan mempengaruhi keberhasilan pengakaran dan aklimatisasi plantlet intak (tanaman kecil yang berakar)

## **A. Kultur Bunga/buah Muda Manggis**

Prosedurnya sebagai berikut :

1. Persiapan botol kultur yang sudah bersih steril.  
Botol-botol kultur telah dicuci bersih dan kemudian dimasukkan ke dalam oven selama 24 jam dengan suhu 65° C.
2. Pembuatan media.
  - a. Pembuatan stock larutan Nutrisi MS (ada 6 macam larutan stock)
  - b. Pembuatan larutan stock BAP dan NAA
  - c. Menimbang bahan pematik media 8 gram untuk 1 liter media
  - d. Menimbang sukrosa 30 gram untuk 1 liter media
  - e. Menimbang myo-inositol 100 mg untuk 1 liter media
  - f. Mencampur bahan a s/d e kemudian ditambah akuades hingga menjadi 1 liter selanjutnya dituang dalam wadah (panci) dan kemudian memasaknya diatas kompor hingga mendidih
  - g. Mengatur pH media yang telah masak tersebut menjadi  $5.6 \pm 0.1$

- h. Tuangkan media tersebut ke dalam beberapa botol kultur
  - i. Tutup botol kultur yang telah berisi media tersebut dengan aluminium foil.
  - j. Mensterilisasi media tersebut dalam autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
  - k. Selanjutnya media yang telah disterilisasi tersebut dimasukkan ke dalam ruang media.
3. Persiapan eksplan. Eksplan yang digunakan adalah buah manggis muda. Buah dipanen dari satu pohon, dicuci dengan air yang mengalir dan kemudian disterilisasi
4. Sterilisasi eksplan/sterilisasi permukaan  
Sterilisasi permukaan menggunakan cara Fitch (1993) yaitu larutan 20% Klorok yang telah ditambah 2 tetes Tween 20 per liter larutan, selama 1 jam dishaker dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya biji dipindah ke larutan 1 M  $\text{KNO}_3$  dan dishaker selama 24 jam, kemudian dipindah ke akuades steril, kemudian dishaker selama 3 hari.
5. Pengkulturan/ penanaman eksplan pada botol kultur.

Eksplan yang sudah disterilisasi dikulturkan pada media dasar Murashige and Skoog (MS) ditambah dengan beberapa konsentrasi zat pengatur tumbuh. Penanaman dilakukan di *Laminar air-flow*. Eksplan yang telah ditanam tersebut kemudian dibawa ke ruang pemeliharaan yang bersuhu  $26^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C dan diletakan di rak-rak dengan penyinaran selama 16 jam per hari.

Tabel 1. Pengaruh media perlakuan ZPT terhadap pertumbuhan kalus, persentase eksplan berkalus dan warna kalus dari eksplan bunga 10 hari setelah mekar (*The effect of medium for callus growing per centage of explant and callus colour from explant 10 days after blooming*).

konsentrasi 2,4-D+BAP (mg/l)	Pertumbuhan kalus eksplan bunga manggis 10 HSBM		
	Persentase berkalus (%)	Warna kalus	Pertumbuhan kalus
0,1 + 0	25	Padat, putih- kuning	++
0,5 + 0	35	Padat, putih	+++
1,0 + 0	40	Padat, coklat	+++
0,5 + 0,1	50	Padat, putih- kuning	++

1,0 + 0,1	25	Padat, putih- kuning	++
1,5 + 0,1	40	Padat, putih- kuning	++

Pada umur 4 minggu setelah kultur I selanjutnya dilakukan pensubkultur. Pada minggu pertama setelah subkultur kalus menjadi berwarna coklat tua pada semua perlakuan. Namun pada minggu berikutnya warna sudah mulai mengarah ke putih sampai kuning. Sedangkan kalus yang tumbuh pada buah muda umur 15–25 hari sampai sekarang masih tumbuh dengan baik, friabel, dan berwarna putih kekuningan. Hal itu berhubungan dengan penyinaran atau lama inkubasi di dalam gelap. Selain itu asal eksplan berpengaruh terhadap pertumbuhan sel-sel organ tanaman. Dari kultur buah muda tersebut dapat disimpulkan bahwa:

- Beberapa eksplan sudah mulai ada yang berkalus pada beberapa media perlakuan.
- Eksplan 10 hari setelah bunga mekar menunjukkan pertumbuhan kalus yang terbaik.

- Media yang positif untuk pertumbuhan kalus adalah MS + (0,5-1,0 ppm) 2,4 D.
- Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu diperhatikan lama inkubasi dalam gelap, eksplan umur lebih dari 10 hari setelah bunga mekar dan pemeliharaan tanaman sebelum eksplan diambil.

## **B. Kultur Biji Manggis**

Prosedurnya sebagai berikut:

### **a. Tahap Sterilisasi**

Eksplan yang telah dikupas kulit arinya (biji manggis seperti dalam gambar) dibawa ke laminar air-flow untuk disterilisasikan (suci hama). Eksplan tersebut disterilisasi/ direndam dalam larutan sodium hipoklorit 3.94 % dan 2.62 %, larutan tersebut ditambah beberapa tetes Tween 20. Lama perendaman pada masing-masing konsentrasi larutan tersebut adalah 10 menit. Selanjutnya dibilas dengan akuades steril 3 – 5 kali bilas, dan eksplan ini siap dikulturkan pada media yang telah disiapkan (media inisiasi).

### **b. Tahap pematapan/tahap inisiasi**

Tahapan ini dimaksudkan untuk mendapatkan biakan/ eksplan yang bersih (Culture establishment): yaitu dengan jalan menempatkan jaringan atau biakan pada media pemeliharaan yang tepat. Tahap ini sering disebut pula dengan tahap pematapan.

Biji telah yang disterilisasi seperti tersebut di atas direndam dalam larutan ascorbic acid 0,1 % selama 5 menit kemudian dikulturkan pada botol kultur berisi media MS + 0.1 ppm BAP. Kultur dipelihara dalam ruangan dengan suhu  $\pm 24$  °C tanpa penyinaran selama 2 minggu. Setelah 2 minggu dalam ruang gelap, biji mulai merekah/benjol-benjol kemudian biji tersebut disubkultur pada media multiplikasi tunas.

### **c. Tahap multiplikasi atau reproduksi**

Pada tahap multiplikasi tunas ini melalui 2 kali subkultur (MI dan MII) dengan 2 macam media yang berbeda. Media pada tahap multiplikasi I (MI) ini adalah WPM + 2 ppm BAP + 0.2 ppm NAA. Sedang media pada tahap MII adalah  $\frac{1}{2}$  MS (2 Fe) + 5 ppm BAP.

Biji yang telah merekah dikeluarkan dari media inisiasi. Biji tersebut diletakkan di atas dipotong menjadi dua. Masing-masing potongan ditanam pada media MI. Tingga minggu kemudian ditransplan ke media MII.

Kultur dipelihara dalam ruangan bersuhu  $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ , disinari dengan lampu TL 20 wat selama 12 jam per hari. Tiga sampai empat minggu kemudian akan beregenerasi membentuk tunas-tunas mikro. Tunas mikro yang berdaun normal dan tinggi  $\pm 2\text{ cm}$  siap diakarkan.

#### **d. Tahap mengakarkan /tahap perakaran**

Tahap ini disebut tahap pembentukan akar/menumbuhkan akar, sering disebut juga tahap pembentukan tanaman lengkap, atau disebut tahap persiapan tanaman ke media tanah.

Untuk keberhasilan tahap ini (tahap pembentukan akar) maka dipilih tunas-tunas mikro yang performennya bagus/ ideal. Ideal bentuk daun dan nodus/batangnya (tinggi  $\pm 2\text{ cm}$ ). Tunas-tunas yang roset dan daunnya sempit perlu di kulturkan dulu pada media elongasi tunas (Triatminingsih *et al.* 2001).

Pada tahap mengakarkan ini ada dua metode yang dilakukan yaitu tahap PaI dan PaII. Tunas-tunas mikro yang siap untuk tahap inisiasi pembentukan akar (Tahap PaI) tersebut dikulturkan pada media cair yang mengandung larutan IBA 5 – 10 mg/l dan dipelihara dalam ruangan tanpa sinar (gelap) selama 14 hari. Setelah 14 hari dalam larutan IBA, kemudian ke tahap PaII yaitu tunas mikro tersebut ditranplan ke media MS + 3 g/l arang aktif tanpa Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Media pada tahap PaII ini dapat berbentuk cair atau padat.

#### **e. Tahap Aklimatisasi**

Tahap ini sering disebut tahap adaptasi tanaman untuk ditanam ke lapang/kebun. Aklimatisasi adalah salah satu tahapan dari teknik pembibitan secara kultur in vitro yaitu mengadaptasikan plantlet/tanaman kecil dari lingkungan laboratorium yang suhu dan kelembabannya terkontrol ke lingkungan yang alami (kebun).

Pada tahap ini, plantlet dipindah dari media agar ke media aklimatisasi I selama 2–4 minggu, setelah itu ( 2–4 minggu) kemudian dipindah ke media campur

dengan wadah polibag seperti media pembibitan buah-buahan pada umumnya.

Media tersebut disiram dengan pupuk daun atau formula 1/2 MS sampai kapasitas lapang, kemudian disungkup palstik dan tertutup rapat jangan dibuka selama 1.5 bulan, selama 1–2 minggu pertama plantlet tersebut diadaptasikan pada ruangan yang tidak terkena sinar matahari langsung, 2–4 minggu kemudian bibit diletakkan pada ruangan yang hanya terkena sinar matahari pagi. Pada minggu ke enam sungkup dibuka setengah dan berangsur angsur dibuka seluruhnya dan minggu selanjutnya siap dipindah ke polibag yang lebih besar.

### **C. Multiplikasi Tunas Pucuk Manggis**

Prosedurnya sebagai berikut :

Media Dasar yang digunakn untuk Kultur Jaringan manggis adalah Murashige and Skoog (MS).

Tunas pucuk dipanen kemudian dibungkus kertas koran dan dilapisi plastik untuk kemudian di simpan di

ruang dingin 1 malam. Selanjutnya eksplant disterilisasi dengan cara sebagai berikut

- a) Helaian daun pada eksplant tunas pucuk tersebut dibuang/ dipotong
- b) Selanjutnya eksplant tersebut direndam beberapa detik dalam alkohol 70 %
- c) Kemudian disterilisasi dalam larutan Sodium hipoklorit 3.94 % dan 2.62 % yang telah ditambah beberapa tetes Tween-20 masing-masing selama 10 menit
- d) Bilas dengan akuades steril 3 – 5 kali.

Eksplan yang sudah disterilisasi tersebut kemudian dikulturkan pada media MS + 0.1 ppm BAP dan diinkubasi dalam gelap selama 1 minggu, 3 minggu kemudian di sub kulturkan pada media MS + 5 ppm BAP selama 8 minggu.

Media diperkaya dengan 20 g/l sukrosa dan 100 mg/l myo-inositol dan diberi bahan pematat 8 g/l. Kultur dipelihara di ruangan yang bersuhu  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  dengan penyinaran lampu TL 20 Watt selama 8 jam perhari.

Pada minggu ke-8 tunas dipindah ke media baru, selanjutnya dilakukan subkultur pada media WPM + 2 ppm BAP + 0,2 ppm NAA. Selanjutnya tunas-tunas mikro yang berdaun (lebar daun) dan berbatang normal dipilih untuk kemudian ditanam di media perakaran (teknik pengakaran dan aklimatisasinya sama seperti pada kultur biji manggis.

Pemanjangan tunas dan multiplikasi tunas yang optimum tidak dapat terjadi bersamaan pada media yang bersangkutan, sebab pada satu sisi ZPT tersebut (BAP) pada konsentrasi tinggi akan memacu multiplikasi tunas namun sisi pemanjangan tunas terhambat

## **CIRI-CIRI MEDIA TUMBUH YANG BAIK**

Faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam meracik media perbanyakan bibit buah-buahan antara lain cahaya,air, suhu, aerasi dan susunan nutrisi, disamping itu perlu diupaya proteksi bibit tersebut dari gangguan hama dan penyakit dan tingkat salinitas media tumbuh. Disamping itu untuk mengantisipasi kebutuhan cahaya dan suhu pada tanaman muda, disini diperlukan tanaman naungan atau naungan buatan/paranet yang disesuaikan dengan kebutuhan fase bibit yang diusahakan.

Media untuk perkecambahan dan pertumbuhan dalam rumah pembibitan, komposisi dan macam material yang digunakan untuk media tumbuh bagi perkecambahan biji, perakaran stek dan pertumbuhan bibit dapat bervariasi, namun secara umum dari hasil penelitian, bibit akan berpenampilan baik apabila media tumbuh mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

1. Media harus gembur dan kompak sehingga dapat memegang stek atau biji dalam pembentukan akar dalam proses pertumbuhan dan perkecambahan.

Volume tanah relatif konstan apabila tanah tersebut basah maupun kering (mengembang dan mengkerutnya tanah yang besar kurang baik untuk pertumbuhan dan perkembangan akar).

2. Media harus mampu menahan/memegang air yang cukup sehingga dapat mengurangi penyiraman yang sering dilakukan (berulangkali).
3. Media cukup poris untuk membuang kelebihan air, sehingga memungkinkan penetrasi udara dengan mudah ke zone perakaran tanaman.
4. Media harus bebas dari biji-biji gulma, Nematoda dan beberapa serangga serta mikrobia patogenik.
5. Media tidak memiliki tingkat salinitas yang tinggi (di bawah batas toleransi tanaman yang diusahakan).
6. Media tersebut apabila dilakukan pasteurisasi dengan uap/ kimia tidak menimbulkan pengaruh yang berbahaya bagi pembibitan.
7. Diupayakan mempunyai kandungan hara cukup untuk periode pembibitan yang dikehendaki. Pupuk tersedia lambat (*slow release fertilizer*) atau rekomendasi pupuk yang dilakukan.

Beberapa bahan media yang dapat digunakan untuk memenuhi kriteria tersebut di atas, antara lain tanah, pasir, debu, gambut, mooss, pukan, kompos, dan vermiculite.

Plantlet manggis yang masih dalam botol kultur diletakkan pada suhu ruangan  $\pm 28^{\circ}$  C selama 1 minggu. Selanjutnya plantlet dikeluarkan dari botol kultur dibilas dengan air mengalir dan ditanam pada wadah yang berisi media campur pasir:arang sekam:tanah = 1:1:1.



A.

A. Tunas-tunas mikro manggis yang bentuk daunnya masih belum normal



B.

B. 2 sampai 3 unas-tunas mikro manggis yang bentuk daunnya normal

## **BEBERAPA SUBSTANSI PENTING**

Kelompok media yang digunakan untuk kultur jaringan tanaman terdiri dari beberapa komponen yaitu : garam, vitamin amino asit, zat pengatur tumbuh, gula (sumber karbon), agar atau gelrite untuk pematid dan air.

Keberadaan mineral dalam jaringan tanaman dapat digunakan oleh sel tanaman untuk membangun blok dalam membangun, mensintesa molekul organik atau sebagai katalisator dalam reaksi ensimatik. Ion-ion dari larutan garam mempunyai peranan penting sebagai wadah dalam transportasi molekul tanaman, didalam regulasi osmotik, dan menjaga atau merawat potensial elektrokimia tanaman (Anonymous, 1996).

Nitrogen, Sulphat dan fosphat adalah komponen protein dan asam nukleik. Magnesium dan banyak elemen mikro membentuk bagian-bagian ensim esensial dan organ sel. Disamping itu keberadaannya diperlukan didalam berbagai reaksi katalisasi.

Calcium dan Asam Borax banyak ditemukan didalam dinding sel dan khususnya Calcium sangat penting didalam kestabilan biomembran.

Potassium dan Chloride sangat penting didalam regulasi osmotik untuk menjaga potensial elektrokimia dan untuk aktifitas banyak enzim.

### **A. Vitamin**

Vitamin diberikan dalam berbagai bentuk dan konsentrasi. Thiamine (Vitamin B1) adalah esensial untuk pertumbuhan. Inositol sering diartikan sebagai vitamin yang sangat nyata untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Efek vitamin terhadap pertumbuhan sel secara in vitro berbeda dari spesies yang satu dengan spesies yang lainnya.

### **B. Cobalt (Co)**

Cobalt penting dalam fiksasi nitrogen, seperti terjadi didalam tuber akar legume dari species Rhizobium. Cobalt adalah komponen esensial dari enzim Cobalamine. Tiga sistem enzim bakteri Rhizobium diketahui mengandung cobalamine. Hubungan diperoleh antara konsentrasi Cobalt, fiksasi nitrogen dan perkembangan tuber akar.

### **C. Hyperhydricity**

Adalah disorder physiological yang serius terjadi selama proliferasi. Ini merupakan fase yang sangat kuat pengaruh negatifnya terhadap perakaran dan aklimatisasi tunas.

Alpokot sangat sensitive terhadap disorder (kerusakan) ini, umumnya disebabkan oleh pengkulturan yang terus menerus pada media yang disuplemen dengan BA (Schall 1987) atau double phase media. Jaringan yang Hyperhydricity dicirikan dengan penampakan seperti gelas, tembus cahaya dan penyimpangan organ.

Hyperhydricity pada tunas juvenile dalam media diatasi dengan meningkatkan interval subculture atau dengan mengakarkan tunas, sedangkan pada material dewasa problemnya lebih sulit dipecahkan.

Kenaikan Ca dan rendahnya K juga dapat mengeliminasi Hyperhydricity. Menurut Quoirin dan Lepoivre, (1977 dalam M.H Brand 1993), dengan menghilangkan ion Chlorine pada media terlihat mengurangi Hyperhydricity pada Prunus.

## CONTOH KOMPOSISI MEDIA MURASHIGE and SKOOG (MS), GAMBORG (B5) DAN WPM

Salah satu contoh komposisi media Murashige and Skoog adalah sebagai berikut :

### A. Komposisi Media MS *Multi-shoot*

Nama stock		Bahan kimia	Konsentrasi 1x (mg/l)	Stock (mg/250 ml)	Per liter media
NITRATOS	1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650	41250	<u>10 ml</u>
	2	KNO <sub>3</sub>	1,900	47500	
SULFATOS	1	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370	9250	<u>10 ml</u>
	2	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.6	215	
	3	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	16.90	422.5	
	4	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.625	
HALUROS	1	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	322.020	8050.5	<u>10 ml</u>
	2	KI	0.830	20.75	
	3	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.625	
P.B.Mo	1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.000	4250	<u>10 ml</u>
	2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	155	
	3	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	6.25	
	4	Na HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	148.000	3700	
NaFeEDTA	1	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.840	696	<u>10 ml</u>
	2	Na-EDTA	37.240	931	
VITAMIN	1	Thiamine	0.400	10	<u>10 ml</u>
	2	Myo-Inositol	100	2500	

## B. Komposisi Media Gamborg (B5)

Nama stock	Bahan kimia	Konsentrasi 1x (mg/l)	Stock (mg/250 ml)	Per liter media
NITRATOS	1 KNO <sub>3</sub>	2500	62500	<u>10 ml</u>
SULFATOS	1 MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	121.56	3039	<u>10 ml</u>
	2 ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2	50	
	3 MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	10	250	
	4 CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.625	
	5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	3350	
HALUROS	1 CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	113.23	2830.75	<u>10 ml</u>
	2 KI	0.75	18.75	
	3 CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.625	
P.B.Mo				<u>10 ml</u>
	1 H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	75	
	2 NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	6.25	
	3 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130.44	3261	
NaFeEDTA	1 FeNaEDTA	36.7	917.5	<u>10 ml</u>
VITAMIN	1 Thiamine	10	250	<u>10 ml</u>
	2 Myo-Inositol	100	2500	
	3 Nicotinic acid	1	25	
	4 Pyridoxine HCl	1	25	

### C. Komposisi Media WPM

Nama <i>stock</i>	Bahan kimia	Konsentrasi 1x (mg/l)	<i>Stock</i> (mg/250 ml)	Per liter media
NITRATOS	1 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	10000	<u>10 ml</u>
SULFATOS	1 MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	180.54	4513.5	<u>10 ml</u>
	2 ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.6	215	
	3 MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22.3	557.5	
	4 CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.25	6.25	
	5 K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990	24750	
HALUROS	1 CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	72.5	1812.5	<u>10 ml</u>
	2 Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	471.26	11781.5	
P.B.Mo	1 H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	155	<u>10 ml</u>
	2 NaMoO <sub>4</sub> .2H 2O	0.25	6.25	
	3 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	4250	
NaFeEDTA	1 FeNaEDTA	36.7	917.5	<u>10 ml</u>
VITAMIN	1 Thiamine	1	25	<u>10 ml</u>
	2 Myo-Inositol	100	2500	
	3 Nicotinic acid	0.5	12.5	
	4 Pyridoxine HCl	0.5	12.5	
	5 Glycine	2	50	

#### D. Berat Molekul

Berat molekul dari beberapa Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) dan zat lain yang sering digunakan dalam meramu media kultur jaringan.

No	Nama ZPT	Singkatan	Berat molekul
1.	Kinetin	K	215.2
2.	1-naphthaleneacetic acid	NAA	186.2
3.	Indole butiric acid	IBA	203.23
4.	6-benzylaminopurine	BAP	225.3
5.	N-isopentenylaminopurine	2-iP	203.25
6.	Gibberellic acid	GA3	346.37
7.	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	221.04
8.	Myoinositol	Myoiono	180.16
9.	Sukrosa	Sukros	342.31

Seringkali ZPT tersebut diatas dicantumkan dalam satuan mikro molar (uM), untuk memindahkannya ke dalam satuan berat mg/l menggunakan rumus sebagai berikut:

**Berat massa = molar x berat molekul**

Contoh :

1. Kinetin 2.3 uM = ..... mg/l  
=  $2.3 \times 215.2 \times 10^{-6} = 0.0005 \text{ g/l}$   
= 0.5 mg/l

2. NAA 11 uM = ..... mg/l  
=  $11 \times 186.2 \times 10^{-6} = 0.00205 \text{ g/l}$   
= 2.05 mg/l

## SUMBER PUSTAKA

- Barakat, M.N. and M.H. El-Lakany. 1992. Clonal propagation of *Acacia saligna* by shoot tip culture. *Euphytica* 59:103–107.
- Barve, D.M. and A.R. Mehta. 1993. Clonal propagation of mature elite trees of *Commiphora wightii*. *Plant cell tissue and organ culture*. 35:237–244.
- Brand, M.H. and R.D. Lineberger. 1986. In vitro propagation of *Halesia carolina* L. and the influence of explantation timing on initial shoot proliferation. *Plant cell, Tissue and organ culture*. 103–113 .
- Gamborg, L. 1991. Kalus dan Kultur sel dalam Wetter, L.R. dan F. Constabel (Ed). *Metode kultur jaringan tanaman*. ITB Bandung. hal. 1–12.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics. Ltd. 1–72.
- Goh. H.K.L., A.N. Rao and C.S. Loh. 1990. Direct shoot bud formation from leaf explant of seedling and mature mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) trees. *Plant Science* 68: 113–121.
- Goh. H.K.L., A.N. Rao and C.S. Loh. 1988. In Vitro Plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Annal of Botany* 62. 87–93.
- Kartha, K.K. 1991. Organogenesis dan Embriogenesis dalam Wetter, L.R. dan F. Constabel (Ed). *Metode kultur jaringan tanaman*. ITB Bandung. hal. 14–21.

- Lemos, E. E. P and J. Blake. 1996. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. *Journal of Horticultural Science*. 71 (3):395–403.
- Li-chun, H, H. Bau-liang, W. Chiu, K. Ching-I and T. Murashige. 2000. Developing an improved in vitro propagation system for slow growing species using *Garcinia mangostana* L (mangosteen). *In Vitro cellular and Development Biology Plant* 36 (^):501–504.
- Maene, L.J. and P.C. Debergh. 1987. Optimisation of the transfer of tissue cultured shoots to in vivo conditions. *Acta Hort.* 212: 335–342.
- Mariska, I.,E. Gati dan D. Sukmadjaja. 1987. Multiplikasi tunas tanaman mentha melalui kultur in vitro. *Pembr. Litri XII* (3-4):80–84.
- Normah, M. N., A. B. Nor-Azza & R. Aliudin. 1996. Factors affecting in vitro shoot proliferation and ex vitro establishment of mangosteen. *Plant Cell, tissue and organ culture*. 46:89–92.
- Triatminingsih, R., Karsinah dan E. Nazir. 1995. Pertumbuhan dan perkembangan beberapa macam eksplan manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Prosiding seminar hasil penelitian dan pengembangan Bioteknologi II*. Bogor. hal.84–90
- Triatminingsih, R., Karsinah dan Sunyoto. 1998. Pengaruh bahan pepadat dan komposisi media terhadap multiplikasi tunas manggis (*Garcinia mangoostana* L.). secara in vitro. *Prosiding Seminar Nasional Hortikultura: Prospek dan*

Tantangan Sektor Hortikultura Menuju Perekonomian yang Tangguh. Fak.Pertanian UPN "Veteran" Yogyakarta. Hal. 176–183.

Triatminingsih, R., I. Fitriyaningsih, E. B. Sinaga, dan Dwi Wahyuni. 2001. Perbaikan teknik kultur in vitro manggis: Pengaruh ZPT terhadap pemanjangan (elongasi) tunas manggis secara in vitro. Prosiding seminar Nasional Hortikultura. Konggres Perhorti. Malang. Hal 567–575.

Widyastoety, D. dan S. Kusumo. 1994. Pengaruh berbagai macam bahan nabati pada pertumbuhan bibit anggrek *Dendrobium* secara in vitro. Bul. Penel. Tan. Hias. 2(1): 67–72.

**BALAI PENELITIAN TANAMAN BUAH TROPIKA**

**ISBN : 978-979-1465-10-6**