

# Teknik Perbanyakkan Tanaman Buah secara **Kultur in Vitro**



BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN  
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN HORTIKULTURA  
BALAI PENELITIAN TANAMAN BUAH TROPIKA  
**2013**

**ISBN :**

**Teknik Perbanyakkan Tanaman Buah Secara  
Kultur In Vitro**

**Edisi Revisi**



**KEMENTERIAN PERTANIAN  
Badan Penelitian Dan Pengembangan Pertanian  
2013**

**Teknik Perbanyakkan Tanaman Buah  
secara Kultur in Vitro**

*Disusun oleh:*

**Rahayu Triatminingsih**

*Tata letak dan editing :*

**Ismuharti, A md**

*iv, 45 halaman, 2013*

ISBN :

Cet.I Edisi revisi

***Diterbitkan oleh :***

Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Jln. Ragunan 29 Pasar Minggu

Jakarta 12540

Telp. : 021-7806202

Fax.: 021-7800644





## **KATA PENGANTAR**

Fasilitas untuk memperbanyak klonal dalam jumlah yang banyak, adalah teknik kultur *in vitro* atau kultur jaringan. Salah satu keuntungan dari teknik memperbanyak tanaman secara *in vitro* adalah bibit yang dihasilkan seragam, pelaksanaannya tidak tergantung musim dan tidak merusak pohon induk.

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

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah memberi bantuan, sehingga penerbitan buku ini dapat dilaksanakan dengan baik.

Jakarta, Nopember 2013  
Kepala Badan,

Dr.Ir.Haryono,M Sc  
NIP. 19560516 198103 1 002



## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	3
PENDAHULUAN	5
MIKROPROPAGASI <i>IN VITRO</i>	7
KIAT-KIAT STERILISASI	9
FAKTOR KEBERHASILAN	11
1. Fasilitas	11
2. Pemilihan eksplan	12
3. Lingkungan Kultur	13
4. Komposisi Media	14
5. Ketrampilan	17
FUNGSI MINERAL	19
METODE REGENERASI TANAMAN	21
1. Embryo Kultur	21
2. Somatik Embryogenesis	21
3. Organogenesis	25
PROSEDUR KULTUR <i>IN VITRO</i> DUKU	29
PANDUAN UNTUK PRODUKSI TUNAS DARI KALUS (Jeruk)	33
MULTIPLIKASI TUNAS PUCUK MANGGIS	36
MASALAH YANG SERING DITEMUI	39
BAHAN KIMIA, RUMUS KIMIA DAN BERAT MOLEKUL SERTA KEGUNAANNYA	41
SUMBER PUSTAKA	44



## **PENDAHULUAN**

Telah banyak yang mengetahui bahwa bibit merupakan modal utama dalam melakukan usaha tani tanaman buah.

Salah satu aplikasi teknologi kultur jaringan adalah pembibitan/kloning atau propagasi aseksual tanaman secara *in vitro*. Teknik kloning atau propagasi/perbanyakan/pembibitan klonal tanaman secara *in vitro* sekarang telah diaplikasikan secara komersial sebagai prosedur standart propagasi pada berbagai species tanaman. Konsep kloning tanaman secara *in vitro* akan dijelaskan pada tulisan dibawah ini.

Untuk pengembangan tanaman buah diperlukan bibit dalam jumlah yang banyak dan seragam. Pengadaan batang bawah tanaman buah selama ini berasal dari biji sehingga akan tergantung pada musim buah. Biji-biji tersebut kemudian disemai dan ditumbuhkan dalam polibag untuk mendapatkan bibit (seedling) sebagai batang bawah. Pengadaan bibit secara grafting (sambung pucuk) dalam jumlah yang banyak akan membutuhkan banyak materi batang bawah. Oleh karena itu perlu diupayakan teknik pengadaan bibit yang efisien dan tidak merusak pohon induk serta terjaga kelestariannya.

Teknik perbanyakan tanaman secara *in vitro* adalah metoda perbanyakan tanaman yang tidak

merusak pohon induk dan tidak tergantung musim. Kelemahan dari model pembibitan konvensional saat ini terutama berasal dari aspek penyediaan dan pengelolaan pohon induk serta dalam hal jumlah produk yang dihasilkan dalam kurun waktu yang tertentu.

## **MIKROPROPAGASI *IN VITRO***

Teknik kultur jaringan/mikropropagasi *in vitro* adalah teknik menumbuhkan dan membiakan eksplan pada media buatan kemudian dipelihara dalam suatu ruangan yang terkontrol lingkungannya dan pekerjaan tersebut dilakukan secara aseptik. Eksplant adalah bagian tanaman yang akan diregenerasikan/dibiakkan/dibudidayakan secara Kultur Jaringan. Terdapat dua step/ tahap dasar dalam teknik mikropropagasi secara *in vitro* yaitu:

1. Tahap memproduksi tunas aksilar baru dalam jumlah yang banyak
2. Tahap untuk menginduksi pembentukan akar adventif pada dasar tunas.

Keberhasilan teknologi mikropropagasi *in vitro* dipengaruhi antara lain oleh eksplant yang digunakan (Wainwright dan Harwood, 1985) dan komposisi media (Gamborg dan Shyluk, 1981). Pada dasarnya semua bagian tanaman apabila ditumbuhkan pada media yang sesuai, dapat beregenerasi menjadi tanaman sempurna/ plantlet intak (batang berdaun/tunas dan berakar). Namun tidak semua bagian tanaman sama mudahnya untuk diregenerasikan. Oleh karena itu perlu proses penelitian untuk mengetahui dan memilih bagian tanaman/eksplant yang mudah untuk ditumbuhkan (Lindsey dan Jones, 1990). Komposisi

media tersebut meliputi kandungan nutrisi, zat pengatur tumbuh (ZPT), vitamin dan gula (sumber karbon).

Pengurangan komposisi media menjadi setengah konsentrasi, atau menghilangkan/meniadakan ZPT dapat meningkatkan pertumbuhan akar adventif pada beberapa species. Sedang intensitas penyinaran yang tinggi dapat menstimulasi produksi fotosintesa daun, namun hal itu menghambat perkembangan akar. Perakaran dapat dipacu dengan memberikan kondisi kelembaban yang tinggi dengan suhu rata-rata 25° – 35° C, atau dengan menambahkan *charcoal* ke dalam media nutrisi.

## **KIAT- KIAM STERILISASI**

Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan teknik mikropropagasi secara *in vitro* adalah tahap sterilisasi. Disinfektan digunakan untuk meng-eradikasi micro-organisme (kontaminan) yang ada dalam jaringan/ material/ eksplant yang bersangkutan. Adanya kontaminasi tersebut akan mengganggu pertumbuhan eksplant atau kultur. Kontaminasi jamur dan bakteri pada eksplant dalam kultur biasanya akan terdeteksi setelah 7 sampai 14 hari setelah kultur.

Kontaminan tersebut harus dihilangkan segera sejak terjadinya kontaminasi masih sedikit, jangan sampai menyebar menjadi air-borne kontaminan yang menyebar di ruang kultur. Spora mikroorganisma yang dorman sering terjadi pada permukaan eksplant sehingga resisten terhadap berbagai jenis disinfektan. Antibiotik dapat dimasukkan ke dalam media atau dengan cara merendam eksplant dalam larutan antibiotik. Beberapa kiat menghilangkan kontaminan sebagai berikut :

1. Mencuci eksplant dengan air sabun atau dicelup ke dalam ethanol terlebih dahulu dan kemudian dicuci dengan air yang mengalir
2. Kemudian direndam dalam larutan sodium hypochlorite (0.25–2.63 %) yang ditambah 1 drop

Tween-20 (polyoxyethylene sorbitol monolaurate)  
per 100 ml larutan.

3. Lama sterilisasinya 10 – 20 menit
4. Cuci dengan air steril untuk menghilangkan residu disinfektan
5. Beberapa mikroorganisma dapat dihilangkan dengan cara di rekultur beberapa kali sebelum masuk ke fase proliferasi.

## **FAKTOR KEBERHASILAN**

Faktor-faktor yang berkontribusi pada keberhasilan perbanyakan tanaman adalah:

1. Fasilitas
2. Pemilihan Eksplant
3. Lingkungan kultur
4. Komposisi media
5. Ketrampilan

### **1. Fasilitas**

Fasilitas yang diperlukan dalam menunjang/mendukung proses kultur jaringan ini adalah :

- A. Bahan kimia
- B. Ruangan : 1) Ruangan untuk pembuatan media, 2) Ruang untuk penanaman eksplant, 3) Ruang inkubasi / pemeliharaan kultur biak.
- C. Perlatan : Kotak kabinet steril / Laminar air flow, autoclave, oven, timbangan, kompor, AC, Lemari dingin, lampu, pisau, pinset, botol kultur, botol glas untuk larutan stock.
- D. Rumah skreen
- E. Ruang uji mutu beserta peralatanya.
- F. SDM dan finansial

## **2. Pemilihan eksplan**

Pemilihan eksplant memegang peranan penting terhadap keberhasilan regenerasi tanaman secara in vitro. Eksplant harus didapat dari tanaman yang sehat dan vigor. Kondisi tanaman sebelum dikulturkan banyak berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplant selanjutnya. Seperti perlakuan pupuk kimia atau alami pada tanaman sumber eksplant, cuaca dan kondisi lingkungan tumbuhnya berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan eksplant. Bagian tanaman (eksplant) yang berhasil dikulturkan dan dapat beregenerasi menjadi plantlet adalah eksplant yang diperoleh dari bagian yang sedang berkembang. Oleh karena itu jaringan atau organ yang belum tua adalah lebih morfogenetik dari pada bagian yang sudah tua.

Jaringan/organ yang meristematik adalah lebih baik untuk dipilih sebagai eksplant dari pada sumber jaringan yang lain karena:

1. klonal propertis
2. kultur survival
3. tumbuh cepat dan totipotentiality

Jadi materi yang bagus sebagai eksplant adalah bagian meristem, tunas pucuk, calon tunas ketiak, jaringan yang belum tua, jaringan yang cepat tumbuh.

## **Faktor yang perlu diperhatikan pada waktu inisiasi kultur meristem atau tunas pucuk:**

### **a. Umur dan status fisiologi tanaman.**

Material tersebut sebaiknya dipanen pada waktu masih dorman, masukan dalam suatu kantong plastik yang berfungsi kemudian disimpan dalam ruang pendingin bersuhu 3° C, sampai saat digunakan. Selanjutnya eksplant dipotong potong sesaat setelah *bud break* (pecah tunas).

### **b. Ukuran eksplant yang digunakan.**

Tunas pucuk biasanya tidak dapat langsung dipelihara secara *in vitro*, sebaiknya pada awal kultur (tahap pematangan), tunas pucuk yang digunakan tersebut berukuran agak besar. Selanjutnya tunas pucuk diperkecil sehingga diperoleh meristem pucuk ukuran 0,1 – 0,2 mm dan kemudian dipotong/ diiris lalu dikulturkan secara *in vitro*.

### **c. Posisi mata tunas pada batang atau cabang.**

Tunas pucuk yang dipanen didekat cabang terminal akan tumbuh lebih baik dari pada tunas pucuk didekat dasar cabang atau batang.

## **3. Lingkungan Kultur**

Yang dimaksud dengan lingkungan kultur disini adalah intensitas cahaya, lama penyinaran, temperatur,

konsentrasi oksigen (O<sub>2</sub>) atau CO<sub>2</sub> dan media kultur. Lingkungan kultur tersebut memainkan peranan penting dalam morfogenesis jaringan tanaman.

Pada umumnya proliferasi kalus terjadi didalam lingkungan yang gelap (tanpa penyinaran) dan kemudian apabila disinari kalus tersebut cenderung memacu embriogenesis, pertunasan dan meng-hijaukan kalus. Eksplant yang disinari 500–1000 lux, 16 jam per hari, selama beberapa hari atau beberapa minggu akan berkembang meningkat apabila intensitas ditingkatkan menjadi 5000–10000 lux pada minggu berikutnya, hal itu karena proses fotosintesa daun terpacu. Akan tetapi intensitas penyinaran yang tinggi tersebut akan menghambat perkembangan akar.

Temperatur ruang kultur sekitar 25° C. Sedang tanaman tropika seperti manggis bagus tumbuh di ruangan bersuhu 27° C - 29° C.

#### **4. Komposisi Media**

Komposisi nutrisi media merupakan faktor penting dan harus diperhatikan karena akan mempengaruhi keberhasilan regenerasi tanaman. Formulasi Murashige and Skoog (MS) adalah media yang banyak digunakan dalam Kultur Jaringan tanaman. Media dasar tersebut terdiri atas mikro dan makro elemen, vitamin, kemudian ditambah dengan berbagai macam ZPT pada konsentrasi tertentu. Pada

proses pertumbuhan eksplant secara *in vitro* tersebut sering terjadi peristiwa *browning*. Untuk menghilangkan *browning*, biasanya dilakukan rekultur beberapa kali atau ditambah dengan absorben seperti Activated charcoal atau polyvinyle pyrrolidone dalam media.

ZPT yang sering digunakan untuk perbanyakan secara *in vitro* adalah dari kelompok sitokinin dan auksin. Perbandingan konsentrasi auksin dan sitokinin dalam media dasar akan mempengaruhi arah organogenesis eksplant yang dikulturkan secara *in vitro* (Tisserat, 1985., Noerhadi, 1988; Lemos and Blake, 1996). Dan mereka juga mengatakan bahwa aktifitas auksin eksogen dipengaruhi oleh keberadaan sitokinin dan auksin endogen.

Dalam memproduksi tunas langsung dari kultur eksplant, maka ratio Auksin ke sitokinin ini perlu diperhatikan. Seperti yang dikemukakan oleh (George dan Sherrington, 1994) bahwa keseimbangan konsentrasi Auksin dan Sitokoinin berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplant.

Pada umumnya, media yang berisi auksin tinggi akan merangsang pertumbuhan kalus, tetapi beberapa species perlu penambahan sitokinin pada media untuk memacu pembentukan kalus. Bila konsentrasi auksin rendah dan konsentrasi sitokinin dinaikan biasanya

akan merangsang pembentukan tunas dari kultur kalus.

Auksin pada level rendah yang dikombinasikan dengan berbagai macam konsentrasi sitokinin pada media kultur meristem/ tunas pucuk /ruas/ batang muda dapat merangsang pertumbuhan tunas samping (aksilar). Media kultur jaringan yang hanya diperkaya dengan auksin saja pada konsentrasi tertentu dapat menginisiasi tumbuhnya akar. Penambahan ZPT seperti abscisic acid (ABA) atau Gibberelin (GA) ke media kultur diperlukan untuk merangsang perakaran atau perkembangan plantlet.

Benzil-amino purin (BAP) merupakan kelompok sitokinin turunan adenin paling aktif dalam proses pembelahan sel (Watimena, 1987). Dan ditegaskan lagi oleh Nurita-Toruan (1990) bahwa BAP adalah kelompok sitokinin yang paling efektif dalam memacu pembentukan tunas. Selanjutnya Bon dan Berthon (1987) berpendapat bahwa penambahan NAA 0,1 mg/l pada media dasar dapat memacu inisiasi eksplant *Sequidendron giganteum* dari pada tanpa NAA. Pada kultur biji manggis secara *in vitro* dapat terbentuk  $5,6 \pm 2,8$  tunas per eksplant pada media WPM + 2 ppm BAP + 0,2 ppm NAA. Dan pada eksplan batang muda manggis ukuran 1 cm terbentuk 5,4 tunas pada media yang sama (Triatminingsih, dkk. 1994).

Jadi media kultur jaringan tanaman tersebut terdiri atas beberapa komponen yaitu garam, vitamin, amino acid, zpt, sumber karbon (sukrosa), akuades, agar atau gelrite (sebagai pematat media). Komponen tersebut memenuhi satu atau lebih fungsi pertumbuhan tanaman secara *in vitro*.

Tabel 1. dibawah ini adalah beberapa tipe regenerasinya dan contoh media dengan penambahan ZPT tertentu yang dibutuhkan untuk meregenerasikan tanaman secara *in vitro*

## **5. Ketrampilan**

Pengalaman seseorang dalam melakukan pekerjaan kultur jaringan akan mempengaruhi keberhasilan teknik tersebut. Dengan banyaknya pengalaman seseorang melaksanakan pekerjaan kultur jaringan maka akan mempengaruhi kecepatan menyelesaikan pekerjaan kultur tersebut, yang pada akhirnya seseorang tersebut menjadi trampil, cekatan dan pandai.

Ketrampilan yang dibutuhkan adalah menghitung dan menimbang bahan kimia, mengiris eksplan, ataupun menggunakan peralatan seperti yang tercantum pada bab faslitas.

## **FUNGSI MINERAL**

Keberadaan mineral di dalam media kultur jaringan tanaman digunakan oleh sel tanaman untuk membangun blok-blok, untuk sintesa molekul organik atau sebagai katalisator didalam reaksi ensimatis. Ion-ion yang dari garam-garam berfungsi sebagai counterion di dalam transportasi dalam membentuk molekul ion tanaman didalam pergantian osmotik dan memelihara potensial elektrokimia tanaman. Seperti contoh berikut ini :

- N, S dan P merupakan komponen protein dan Nucleic acid
- Mg dan beberapa mikroelemen membentuk bagian esensial dari enzim dan sel organel serta penting didalam katalisator berbagai reaksi.
- Ca dan Boris ada di dinding sel dan khusus calcium mempunyai tugas penting dalam stabilitas biomembran.
- K & Cl: penting pada regulasi osmotik untuk memelihara potensial elektrokimia dan untuk aktivitas sejumlah ensims
- VITAMIN. Vitamin penting untuk banyak reaksi biokimia. Kebanyakan semua media untuk kultur sel tanaman dan jaringan ditambah Thiamin. Vitamin merupakan zat yang esensial untuk pertumbuhan

tanaman. Inositol sering diartikan sebagai vitamin yang nyata menstimulir perkembangan dan pertumbuhan tanaman. Pengaruh vitamin dalam perkembangan sel secara *in vitro* berbeda-beda tergantung pada species.

- MIKRO ELEMENTS Boron (B), diambil oleh akar dan ditransfer melalui xylem ke lain tempat/bagian dari tanaman. Dalam membran sel adalah penting adanya "Borate ester". Tidak ada enzim yang mengandung Boron atau yang diaktifkan oleh B.

## **METODE REGENERASI TANAMAN**

Metode regenerasi tanaman melalui kultur jaringan dapat dilakukan melalui salah satu dari 3 sistem yaitu :

1. Embryo kultur
2. Somatik embryogenesis
3. Organogenesis

### **1. Embryo Kultur**

Embryo kultur adalah kultur aseptik dari embryo zigotik. Embryo diambil dari biji/ovule dan ditanam pada lingkungan media pengganti endosperm (Media bernutrisi). Selanjutnya embryo akan berkembang dan terjadi perkecambahannya seperti/seolah-olah dari biji.

### **2. Somatik Embryogenesis**

Somatik atau asexual embryogenesis adalah memproduksi struktur seperti embryo dari jaringan somatik. Somatik embryo adalah struktur bipolar, meliputi calon akar sekaligus calon tunas yang bebas dan secara fisik tidak menempel pada jaringan asal eksplant/jaringan awal. Embryo-embryo ini selanjutnya berkembang dan berkecambah menjadi plantlet melalui beberapa kejadian yang mirip seperti terjadi pada embryo zygotik. Phenomena ini dapat terjadi pada

beberapa species tanaman secara kultur in vitro dari bermacam-macam tipe sel.

Somatik embryogenesis (SE) adalah suatu teknik memproduksi embryo somatik dari sel, jaringan atau organ. Teknik tersebut dapat terjadi secara langsung atau secara tidak langsung.

### **2.1. Somatik embryogenesis secara langsung**

Somatik embryogenesis secara langsung meliputi pembentukan embryo asexual dari sel tunggal atau group/ sekelompok sel dari suatu bagian jaringan/ eksplant tanpa melalui fase kalus. Embryogenesis langsung juga telah dilaporkan berhasil yang diperoleh dari penelitian kultur anther atau kultur protoplast. Contoh-contoh embryo somatik yang diperoleh:

- Seperti yang terjadi pada jeruk "Citrus" dimana bagian jaringan nuselar akan tumbuh/membentuk embryo nuselar (baik secara in vivo atau in vitro).
- Atau pada *Ilex aquifolium* dan *Ranunculus sceleratus* yang mana sel-sel bagian epidermal batang memproduksi/muncul embryo adventif.

### **2.2. Somatik embryogenesis secara tidak langsung**

Embryo yang terbentuk secara tidak langsung ini diawali dengan terbentuknya kalus terlebih dahulu. Pertumbuhan dan perkembangan kalus menjadi embryo ini dimulai dari bentuk proembryo, kemudian berkembang menjadi globular, selanjutnya bentuk hati, lalu berkembang menjadi bentuk terpedo dan akhirnya menjadi plantlet

Proses/tahapan Somatik Embryogenesis tidak langsung tersebut sebagai berikut :

- a. mendapatkan eksplant yang mantap, bebas mikroorganisme atau establisng eksplant dalam kultur.
- b. Proliferasi kalus/ inisiasi pro-embryo. Media pada tahap ini biasanya mengandung auksin dalam konsentrasi tinggi, berkisar 0.45 – 452  $\mu\text{M}$  2,4-D.
- c. Selanjutnya kalus proembryo tersebut ditransfer ke media yang rendah auksin untuk memacu pembentukan embryo dari calon pro-embryo sampai bentuk terpedo. Jika kondisinya tepat maka embryo tersebut berkecambah menjadi plantlet.

Pada umumnya hanya sebagian kecil persentase dari jaringan eksplant yang berkontribusi ke pembentukan kalus. Sel-sel atau jaringan tersebut biasanya berada pada lapisan permukaan atau secara fisik kontak dengan nutrisi media. Pada

waktu kalus dipindah ke media berisi auksin konsentrasi rendah maka akan meningkatkan pro-embryo dan pembentukan awal embryo berkembang menjadi bipolar embryo.

### **3. Organogenesis**

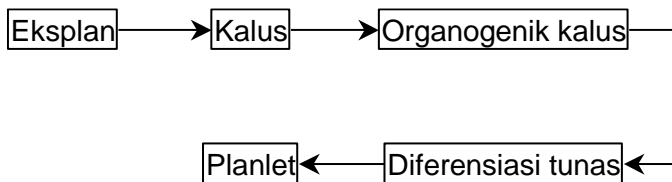
Sistem organogenesis adalah sistem memproduksi struktur unipolar yaitu memproduksi tunas atau akar. Tanaman yang berkembang melalui organogenesis dimulai dari pembentukan dan pertumbuhan calon tunasnya (tunas adventif) dari kalus atau dari inisiasi pertumbuhan tunas aksilar dari kultur tunas pucuk. Kemudian dilanjutkan ke tahap penumbuhan akar yaitu dengan jalan mensubkulturkan calon tunas atau tunas mikro ke media pengakaran. Tunas yang dihasilkan merupakan struktur unipolar dan secara fisik berlekatan/menyatu dengan jaringan asal, selanjutnya akar akan tumbuh dari tunas tersebut.

Produksi tunas adventif secara *in vitro* ini lebih umum dan lebih mudah dari pada pertumbuhan somatik embryogenesis. Produksi tanaman melalui sistem tersebut dapat diperoleh dari salah satu metode dibawah ini:

1. Menumbuhkan organ adventif melalui kalus dari eksplant tunas pucuk, daun, batang, dsb.

2. Produksi organ adventif langsung dari eksplant tanpa melalui fase kalus.
3. Produksi plantlet dari menumbuhkan tunas aksilar.

### 1. Produksi tunas adventif melalui kalus



Eksplant dikulturkan pada media yang mengandung auksin konsentrasi tinggi dan sitokinin dalam konsentrasi rendah untuk memacu pembentukan kalus yang organogenik. Produksi kalus juga dapat diperoleh pada media padat yang hanya mengandung auksin saja (2,4-D). Selanjutnya kalus yang organogenik tersebut dipindah ke media deferensiasi tunas. Setelah terbentuk tunas kemudian dipindah ke media pengakaran dan akhirnya menjadi plantlet.

### 2. Regenerasi tanaman langsung dari kultur eksplant

Prosedur regenerasi tanaman melalui metode regenerasi langsung dari kultur eksplant daun, anakan, umbi, batang, akar atau tuber sebagai berikut:

- a. Establising/ tahap pematapan. Eksplant dikulturkan pada media yang mengandung auksin dan sitokinin konsentrasi sedang (untuk menghalangi terbentuknya kalus), kemudian dilanjutkan dengan memindahkan eksplan yang telah mantap ke media inisiasi organ tunas.
- b. Multiplikasi tunas, diperoleh dengan jalan memotong/ membagi-bagi/ memisahkan sekelompok calon tunas dan menanam kembali ke beberapa botol kultur berisi media multiplikasi

Tabel 1. Media yang dibutuhkan untuk dipilih dari beberapa species tanaman yang mampu beregenerasi secara *in vitro* menjadi tanaman lengkap dan tipe regenerasinya.

(Species) Eksplant	Tipe regene rasi	Konsentrasi ZPT (mg/l)		
		Kallus atau Establis ment	Tunas atau Embryo genesis	Penga karan
(Krisan) Shoot- tip	AS	2 K, 0.02 NAA	2 K, 0.02 NAA,	
(Vitis spp) Flower, daun	SE-C	1 2,4-D, 0.1 BA	2 NAA, 0.1 BA	0.01 NAA
(Ananas sativa) Calon tunas aksilar	O-D	-	1.8 NAA, 2 IBA, 2.1 K	0.01 NAA
(Acacia kao) Akar, Pucuk tunas anakan	O-C	5 NAA, 6 IBA, 2 K	1.8 NAA, 2 IBA, 2.1 K	0.01 NAA
( <i>Garcinia mangostana</i> L). Biji	O-D		2 – 4BA, 0,1-0.2NAA	5-10 IBA

*Keterangan:*

*Tipe regenerasi O-C : organogenesis via kalus,*

*O-D: organogenesis langsung dari eksplant,*

*AS: menghasilkan tunas aksilar,*

*SE-C: Somatik embryogenesis via kalus,*

*SE-D: Somatik embryogenesis langsung,*

*K: Kinetin*

*NAA: Naphtalene Acetic Acid*

*BA: Benzyladenine*

*IBA: Indolebutyric Acid*



## **PROSEDUR KULTUR *IN VITRO* DUKU**

1. Persiapkan botol kultur yang sudah steril
2. Pembuatan Media
  - a. Pembuatan stock larutan Nutrisi WPM (ada 6 macam larutan stock)
  - b. Pembuatan larutan stock BAP dan NAA
  - c. Menimbang bahan pematat 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° C selama 15 menit
  - k. Selanjutnya media yang telah disterilisasi tersebut dimasukkan kedalam ruang media.
3. Persiapan eksplant. Eksplant yang digunakan adalah biji duku. Biji dipilih dari buah yang besar dan dipanen dari satu pohon. Setelah biji dikeluarkan dari buahnya dan dibersihkan kulit arinya segera disterilisasi
  4. Sterilisasi menggunakan Hg Cl<sub>2</sub> 0,2 % selama 5 menit kemudian dicuci dengan akuades steril 3 - 5 kali. Setelah itu direndam dalam askorbic acit 0,1 % selama 5 menit. dan kemudian ditanam pada media yang telah dipersiapkan (WPM + BAP 0,5 mg/l), selama 1 minggu.
  5. Inkubasi dibawah suhu 27°C–29°C, penyinaran 1000 lux, selama 16 jam per hari
  6. Biji yang telah pecah disubkultur ke media multiplikasi I yang hanya mengandung BAP 1 mg/l.
  7. Selanjutnya diinkubasi pada 27 °C – 29 ° C, penyinaran 1000 lux, selama 16 jam per hari, tunas akan tumbuh dalam waktu 3 – 5 minggu.
  8. Kemudian disubkultur ke media Multiplikasi II. WPM + 0,5 ppm BAP + 0,1 ppm NAA. Inkubasi

pada 27° C – 29° C, penyinaran 5000 lux, selama 16 jam per hari.

9. Tunas-tunas mikro yang telah tumbuh tersebut dipindah ke media pengakaran yaitu WPM + NAA 0.2 ppm. Inkubasi pada suhu 25 °C – 29 °C, penyinaran 5000 lux selama 16 jam per hari
10. Tunas-tunas mikro yang telah berakar tersebut siap diaklimatisasi pada media campuran pasir dan arang sekam.

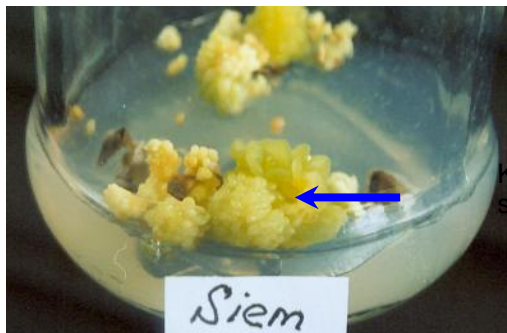


Gambar 1. Keragaan tunas duku pada media WPM + 0,5 ppm BAP + 0,1 ppm NAA

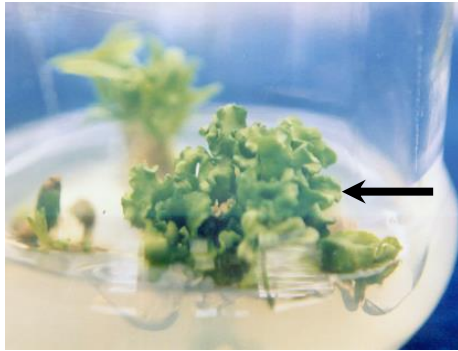
## **PANDUAN UNTUK PRODUKSI TUNAS DARI KALUS (Jeruk)**

1. Eksplant (daun) diambil dari tanaman induk yang ditumbuhkan di screen house. Sebaiknya eksplant yang akan digunakan adalah yang akan berbunga. Atau dari biji yang dikecambahkan.
2. Cuci daun dengan air sabun, kemudian cuci dengan 70% ethanol dan selanjutnya dibilas dengan air destilasi.
3. Sterilisasi permukaan daun dalam larutan sodium hypoclorit 1.1% selama 20 menit sambil dikocok-kocok. Kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali.
4. Potong daun tersebut dengan scalpel menjadi ukuran 1 cm<sup>2</sup> ditransfer ke medi MS agar berisi 4.5 uM 2,4-D.
5. Inkubasi dibawah suhu 25 – 29 C, penyinaran 1000 lux selama 16 jam per hari, kalus akan tumbuh pada 3 – 4minggu
6. Potongan kalus (0.5 cm<sup>2</sup>) disubkultur ke media agar berisi 1 uM BA untuk inisiasi tunas.
7. Inkubasi pada 25–29° C, penyinaran 1000 lux selama 16 jam per hari, tunas akan tumbuh dalam waktu 3– 5 minggu.

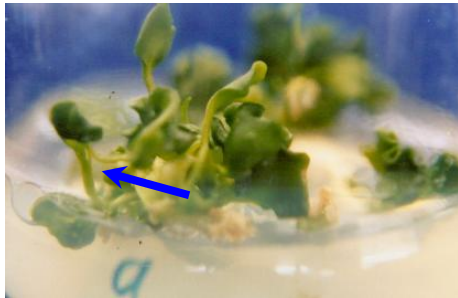
8. Transfer tunas-tunas tersebut ke media MS agar(penuh atau ½ MS) tanpa ZPT untuk memacu tumbuhnya akar
9. Inkubasi pada suhu 25–29° C, penyinaran 5000 lux selama 16 jam per hari.
10. Kemudian setelah 8 minggu, plantlet akan berakar.
11. Plantlet yang berakar tersebut ditransplanting ke media tanah



Kalus biji jeruk  
siem



Kalus yang telah berdiferensiasi menyerupai keping/daun lembaga



Diferensiasi lebih lanjut membentuk tunas.

## **MULTIPLIKASI TUNAS PUCUK MANGGIS**

Prosedurnya sebagai berikut :

1. Persiapkan botol kultur yang sudah steril
2. Pembuatan Media  
Media Dasar yang digunakan untuk Kultur Jaringan manggis adalah Murashige and Skoog (MS).
3. Penyiapan eksplant tunas pucuk. 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 eksplantt tunas pucuk tersebut dibuang/dipotong
  - b) Selanjutnya eksplantt 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.
4. Penanaman eksplant pada media pematapan. Eksplant yang sudah disterilisasi tersebut kemudian dikulturkan pada media MS + 0.1 ppm BAP dan

diinkubasi dalam gelap selama 1 minggu. Kemudian kultur dipindah ke ruangan yang bersuhu 27°C – 29°C, dengan penyinaran 1000 lux, selama 16 jam.

5. Tunas-tunas mikro akan tumbuh dalam waktu 3–5 minggu.
6. Transplanting ke media multiplikasi, yaitu setelah 3 minggu pada media pemantapan kemudian dipilih kultur yang bebas kontaminan dan selanjutnya di subkulturkan pada media MS + 5 ppm BAP selama 8 minggu.
7. Kultur dipelihara di ruangan yang bersuhu 26 °C ± 1° C dengan penyinaran lampu TL 20 Watt selama 8 jam perhari selama 16 jam, tunas akan tumbuh dalam waktu 3–5 minggu.

Media diperkaya dengan 20 g/l sukrosa dan 100 mg/l myo-inositol dan diberi bahan pematat 8 g/l.

Pada minggu ke-8 tunas dipindah ke media baru, selanjutnya dilakukan subkultur pada media WPM + 2 ppm BAP + 0,2 ppm NAA.

Tunas-tunas mikro yang berdaun (lebar daun normal) 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 (BAP) tersebut pada konsentrasi tinggi akan memacu multiplikasi tunas namun sisi pemanjangan tunas terhambat.

### **MASALAH YANG SERING DITEMUI**

Masalah yang sering ditemui pada tahap inisiasi tanaman buah berkayu adalah:

1. Eksplant *browning* dan diikuti oleh kematian eksplantt. Ini disebabkan oleh adanya produksi phenolic dari jaringan yang rusak/dirusak karena sterilisasi atau selama proses pemotongan. Beberapa larutan yang dianjurkan untuk mengatasi masalah ini adalah :
  - a. Cyctein
  - b. Ascorbid acid
  - c. Dithiothreitol (DTT)
  - d. Polyvinyl pyrrolidone (PVP)
  - e. Activated charcoal
2. Khlorosis atau kehilangan pigmen hijau. Penyebab khlorosis tersebut antara lain karena kekurangan Fe (zat besi). Untuk mengatasi masalah tersebut bisa dilakukan langkah sebagai berikut:
  - a. Menambahkan zat besi tersebut pada media dalam berbagai macam bentuk Fe yaitu dengan

meningkatkan konsentrasi Fe. Fe adalah komponen media yang esensial untuk pertumbuhan dan morfogenesis beberapa spesies tanaman. Kebanyakan tanaman hanya mengabsorpsi  $\text{Fe}^{2+}$ , sedang  $\text{Fe}^{3+}$  harus dikurangi menjadi bentuk  $\text{Fe}^{2+}$  di permukaan akar sebelum ditransport ke cytoplasma..Zat besi mengandung protein yang dapat dibedanya menjadi hemoprotein dan besi sulphur-protein. Hemoprotein adalah cytokrome yang mengandung besi-porphyrin kompleks sebagai prosthetic group. Bentuk cytokrome adalah bagian integral dari sistem redox dari transportasi elektron dalam chloroplas dan mitochondria sel tanaman. Cytochrome dibutuhkan untuk reduksi nitrat menjadi nitrit dengan bantuan enzim nitrat reduktase.

- b. Meningkatkan level sitokinin ke dalam media nutrisi.

## BAHAN KIMIA, RUMUS KIMIA DAN BERAT MOLEKUL SERTA KEGUNAANNYA

Informasi dan pengetahuan mengenai rumus kimia beserta berat molekul dan cara penyiapannya sangat diperlukan dalam membuat ataupun memodifikasi media kultur jaringan. Tabel dibawah ini menginformasikan beberapa bahan kimia yang digunakan dalam menyusun media kultur jaringan.

Tabel 2. Nama-nama bahan kimia, rumus kimia, berat molekul serta cara penyimpanan, kegunaannya dan cara penyiapannya

No	Nama bahan kimia	Rumus kimia dan berat molekul	Cara penyiapan dan penyimpanan	Kegunaan dan keterangan lain
1.	Thiamine hydrochloride, Vitamin B1 hydrochloride	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$ . HCl BM= 337,3	disimpan pada suhu ruang, dilarutkan dengan air	Esensial untuk pertumbuhan
2.	Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$ BM= 342,30	disimpan pada suhu ruang, dilarutkan dgn air	Sebagai sumber karbon
3.	Myoinositol, i-inositol, meso-inositol.	$C_6H_{12}O_6$ BM= 180,2	disimpan pada suhu ruang, dilarutkan dengan air	sebagai vitamin untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman
4.	Nicotinic Acid, Vitamin	$C_6H_5NO_2$ BM = 123,11	disimpan pada suhu ruang, dilarutkan dengan air	Esensial untuk pertumbuhan
5.	NAA, 1-Naphtalene Acetic acid	$C_{12}H_{10}O_2$ BM = 186,20	dilarutkan dg ethanol dan 1N NaOH. Penyimpanan dalam bentuk	Zat pengatur tumbuh auksin. Sterilisasinya dapat menggunakan autoclave.

No	Nama bahan kimia	Rumus kimia dan berat molekul	Cara penyiapan dan penyimpanan	Kegunaan dan keterangan lain
			tepung atau cair adalah pada suhu 2-8 ° C.	
6.	Kinetin, 6-Furfury- laminopurine.	$C_{10}H_9N_2O$ BM = 215,21	Dilarutkan dengan 1N NaOH Penyimpanan dalam bentuk tepung pada suhu 2-8° C, bila dalam bentuk cair pada suhu 0° C.	Zat pengatur tumbuh sitokinin. Sterilisasinya dapat menggunakan autoclave atau saringan.
7.	IBA, 3-Indolebutyric acid	$C_{12}H_{13}NO_2$ BM = 203,23	Dilarutkan dengan ethanol atau 1N NaOH. Penyimpanan dalam bentuk tepung atau cair pada suhu 2–8°C.	Zat pengatur tumbuh auksin, Sterilisasinya dapat menggunakan autoclave atau saringan.
8.	IAA, 3-Indoleacetic acid	$C_{10}H_9NO_2$ BM = 175,18	Dilarutkan dg ethanol dan 1N NaOH Penyimpanan dalam bentuk tepung ataupun cair adalah pada suhu 2-8 ° C.	Zat pengatur tumbuh auksin Sterilisasinya dapat menggunakan autoclave atau saringan.
9.	Glycine, Vitamin	$C_2H_5NO_2$ BM= 75,07	disimpan pada suhu ruang, dilarutkan dengan air.	Esensial untuk pertumbuhan.
10.	L-Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$ BM= 146,15	disimpan pada suhu ruang, dilarutkan dengan air.	Esensial untuk pertumbuhan

No	Nama bahan kimia	Rumus kimia dan berat molekul	Cara penyiapan dan penyimpanan	Kegunaan dan keterangan lain
11.	2-iP, N <sup>6</sup> -(2-Iso-pentenyl) adenine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> BM= 203,2	Dilarutkan dengan 1N NaOH Penyimpanan dalam bentuk tepung atau cair adalah pada suhu 0 ° C.	Zat pengatur tumbuh sitokinin. Sterilisasinya dapat menggunakan autoclave atau saringan.
12.	2,4-D, 2,4-Dichlorophenoxy-acetic acid	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> BM= 221.04	Dilarutkan dg ethanol atau 1N NaOH Dalam bentuk tepung disimpan pada suhu ruang, bila bentuk cair disimpan dalam suhu 0–5° C	Zat pengatur tumbuh auksin. Sterilisasi dengan autoclave.
13.	Colchicine	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub> BM= 399.4	disimpan pada suhu ruang, dilarutkan dengan air atau ethanol.	Untuk menggandakan chromosome. Zat ini masuk golongan sangat toxic
14.	Cystein, L-Cystein HCl	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub> SCI. H <sub>2</sub> O BM= 175,6	Disimpan pada suhu ruang, dilarutkan dengan air	Dapat mengatasi masalah <i>browning</i> pada eksplan.
15.	Casein hydrolysate	terdiri dari Protein 89.9 % dan NaCl ≤ 2,0 %,	Dilarutkan dengan air Disimpan dalam bentuk kering pada suhu ruang	Membantu pertumbuhan dan perkembangan sel.
16.	BA , N <sup>6</sup> -Benzy-ladenine, 6-BAP	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> BM= 225.25	Dilarutkan dengan 1N NaOH Disimpanan pada suhu ruang apabila dalam bentuk tepung,	Zat pengatur tumbuh sitokinin. Sterilisasinya dapat menggunakan autoclave atau saringan.

No	Nama bahan kimia	Rumus kimia dan berat molekul	Cara penyiapan dan penyimpanan	Kegunaan dan keterangan lain
			dan bila dalam bentuk cair di ruang bersuhu 2–8° C.	

## **SUMBER PUSTAKA**

- Bon, M.C. and J.Y. Berthon. 1987. Miropropagasi aspect of *Sequoidendron gigantium* Juvenil and mature clone. *Acta Hortic* 212. In vitro problems related to mass propagation. p. 489-497.
- Gamborg, O,G and J.P. Shyluk. 1981. Nutrition media and characteristic of plant cell and tissue culture.p. 21.-44. In Thorpe, T.A (Ed). *Plant tissue culture : Method and application in agriculture*. Academic press. NewYork.
- George. E.F and Sherrington. P.D., 1984. *Plant Growth Regulators in Plant propagation by tissue culture*. P.284 – 330.
- Guimaraes, M.L., M.C. Pimenta and J. Montezuma-de-Carvalho. 1987. Problem of soil adaptation in plantlets of (*Coffea arabica* L.) obtained via somatic embryogenesis *Acta Hortic* 212 : 315-321.
- Lemos. E. E. P.,and J. Blake. 1996. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. *Journal of Hort. Science*. 71 (3) : 395 - 403.
- Lindsey, K. and M.G.K. Jones. 1990. *Plant biotechnology in agriculture*. Prentice Hall Englewood cliffs, New Jersey. 241 p.
- Mariska, I., E. Gati., dan D. Sukmadjaja. 1987. Multiplikasi tunas tanaman mentha melalui kultur in vitro. *Pembr. Littri*. XII 3 (3-4) : 80 – 84.

- Nurita-Toruan, M. 1990. Perbanyak tanaman kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) dengan kultur jaringan. Puslitbun. Bogor. 18 hal.
- Tisserat. B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration *in* Dixon. R.A. : Plant cell culture a practical approach. IRL Press Oxford Washington DC. ISBN. 0-947946-22-5. P. 79 – 126.
- Triatminingsih, R., Karsinah dan E. Nazir. 1994. Micropropagasi tanaman manggis secara *in vitro* : Pertumbuhan dan perkembangan beberapa macam eksplant manggis (*Garcinia mangostana* L.). Prosiding seminar hasil penelitian bioteknologi II di Cibinong-Bogor, September 1994. Hal. 84–90.
- Triatminingsih, R., I. Fitriainingsih, E. Br.Sinaga dan D. Wahyuni. 2001. Pengaruh konsentrasi IBA dan perlakuan penyinaran terhadap pengakaran plantlet Manggis secara *in vitro*. J. Hort. 11(4): 232 – 236.
- Triatminingsih, R., Karsinah, H. Subakti, dan I. Fitriainingsih. 2003. Kultur *In Vitro* biji Duku. J. Hort. 13 (2): 77 – 81.
- Wainwright, H. and A. C. Harwood. 1985. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Cyclamen persicum* Mill. Using seedling tissue. J. Hort. Sci. 60 (3) : 397-403.

Wattimena, G.A. 1987. Zat pengatur tumbuh. Diktat kuliah. IPB Bogor. 657. hal.

..... 1988. Peranan kultur jaringan dalam mempertinggi produksi pertanian di Indonesia. Makalah pada seminar kultur jaringan di Malang 12 April 1988. 12 hal.