

**MAKALAH
KULTUR JARINGAN**



**Mata Kuliah Ilmu Kealaman Dasar
Dosen Pengampu : Salim Widono, SP., MP**

Disusun oleh : Kelompok 11

Dinda Tirta rahayu	F0117039
Rika Riantisya	F0117096
Yayang Afta Pratama	F0117118

**PROGRAM STUDI EKONOMI PEMBANGUNAN
FAKULTAS EKONOMI DAN BISNIS
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
2020**

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	i
DAFTAR ISI	ii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	1
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	2
BAB II PEMBAHASAN	
2.1 Pengertian Kultur Jaringan.....	3
2.2 Pemanfaatan Kultur Jaringan.....	3
2.3 Laboratorium dan Peralatan Kultur Jaringan.....	8
2.4 Media Kultur Jaringan.....	15
2.5 Tipe Kultur Jaringan.....	19
2.6 Tahapan Pekerjaan dalam Kultur Jaringan.....	23
2.7 System regenerasi tanaman pada kultur jaringan	25
2.8 Permasalahan dalam Kultur Jaringan.....	27
BAB III PENUTUP	
3.1 Kesimpulan.....	30
DAFTAR PUSTAKA	32

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan bioteknologi salah satunya adalah kultur jaringan, yang hingga sekarang berkembang begitu cepat dan signifikan. Apa dasar utama yang menjadikan kultur jaringan berkembang dengan cepat? Salah satunya adalah teknik pemakaian kultur jaringan yang dengan hanya menggunakan bagian sel tumbuhan, maka akan didapatkan tanaman yang sempurna yang dapat melakukan reproduksi. Jadi sebenarnya apa yang dimaksud dengan kultur jaringan? Kultur Jaringan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tumbuhan seperti protoplasma sel, jaringan atau organ yang serba steril, ditumbuhkan pada media buatan yang steril dalam botol kultur yang steril dan dalam kondisi yang aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman yang lengkap. Beberapa teknik dalam kultur jaringan menuntut syarat-syarat tertentu yang harus dipenuhi dalam pelaksanaannya, dan syarat pokok kultur jaringan adalah laboratorium dengan segala fasilitasnya berupa alat-alat kerja, sarana pendukung terciptanya kondisi aseptik terkendali dan fasilitas dasar seperti air, listrik maupun bahan bakar.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Bagaimana pengertian serta sejarah singkat mengenai Kultur Jaringan?
- b. Bagaimana pemanfaatan Kultur Jaringan ?
- c. Bagaimana standart laboratorium dan peralatan Kultur Jaringan serta media yang digunakan?
- d. Apa saja Tipe Kultur Jaringan?
- e. Bagaimana tahapan pekerjaan dalam Kultur Jaringan sekaligus system regenerasi tanaman pada kultur jaringan?
- f. Apa saja permasalahan dalam Kultur Jaringan?

1.3 Tujuan

- a. Untuk mengetahui bagaimana pengertian serta sejarah singkat mengenai Kultur Jaringan.
- b. Untuk mengetahui bagaimana pemanfaatan Kultur Jaringan.
- c. Untuk mengetahui bagaimana standart laboratorium dan peralatan Kultur Jaringan serta media yang digunakan.
- d. Untuk mengetahui apa saja Tipe Kultur Jaringan.
- e. Untuk mengetahui bagaimana tahapan pekerjaan dalam Kultur Jaringan sekaligus system regenerasi tanaman pada kultur jaringan.
- f. Untuk mengetahui apa saja permasalahan dalam Kultur Jaringan.

BAB II

PEMBAHASAN

2.1 Pengertian Kultur Jaringan

Kultur jaringan tanaman adalah suatu teknik untuk menumbuhkan sel, jaringan ataupun irisan organ tanaman di laboratorium pada suatu media buatan yang mengandung nutrisi yang aseptik (steril) untuk menjadi tanaman secara utuh. Kondisi steril merupakan suatu syarat mutlak keberhasilan pelaksanaan kultur jaringan, sehingga kondisi ini harus tetap dijaga selama proses kultur berlangsung. Walaupun hanya satu spora jamur atau hanya satu sel bakteri yang masuk ke media kultur, maka pekerjaan kultur akan gagal dan tidak akan dihasilkan tanaman baru.

Kultur jaringan tanaman didasari oleh teori totipotensi sel (*cellular totipotency*) yang menyebutkan bahwa setiap sel tanaman memiliki kapasitas untuk beregenerasi membentuk tanaman secara utuh. Tanaman baru yang diperoleh dengan cara ini bersifat identik dengan induknya, dan disebut plantlet. Jumlah tanaman baru yang dihasilkan tidak hanya satu, tapi bisa puluhan hingga ratusan (dari satu bahan tanam atau eksplan) sehingga teknik kultur jaringan digunakan sebagai metode perbanyakan tanaman. Metode perbanyakan tanaman yang dilakukan dengan teknik kultur jaringan tergolong perbanyakan vegetatif, artinya tidak melibatkan adanya fertilisasi antara sel telur dan sel kelamin jantan seperti halnya pembentukan biji pada tanaman, itu sebabnya plantlet yang dihasilkan identik dengan induknya. Perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan disebut juga mikropropagasi atau perbanyakan mikro. Kata 'mikro' mengacu pada bahan tanam awal yang digunakan yaitu eksplan yang berukuran kecil (micro=kecil), bahkan dapat mencapai ≤ 1 mm pada kultur meristem.

2.2 Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan

Kultur jaringan dimanfaatkan untuk beberapa tujuan, diantaranya:

1. Transformasi Genetik/Rekayasa genetika

Teknik kultur jaringan kini tidak hanya digunakan sebagai teknik

perbanyak tanaman. Pekerjaan biologi molekuler seperti transformasi genetik / rekayasa genetika juga membutuhkan teknik kultur jaringan jika transfer gen dilakukan secara *in vitro*. Jadi teknologi menghasilkan tanaman transgenik secara *in vitro* mutlak membutuhkan kultur jaringan. Menumbuhkan target transformasi berupa ‘kalus’, ‘*protocorm like bodies*’ maupun ‘tunas *in vitro*’ untuk menjadi kandidat plantlet transgenik, membutuhkan keahlian kultur jaringan.

2. Memperbanyak *GM (Genetically Modified) Plants* atau yang dikenal sebagai tanaman transgenik

Tanaman transgenik memiliki karakteristik agronomi yang spesifik sesuai dengan *gene of interest* yang disisipkan. Perbanyak tanaman ini harus dilakukan secara vegetatif agar anakan yang dihasilkan secara genetik identik dengan induknya. Perbanyak tanaman melalui kultur jaringan akan mempercepat proses perbanyak untuk dihasilkannya anakan yang seragam dan identik secara genetik dengan induknya.

3. Perbanyak tanaman hibrid yang memiliki sifat-sifat unggul

Tanaman hibrid merupakan hasil persilangan antara dua tanaman yang masing-masing membawa karakter spesifik, sehingga karakter yang dimilikinya merupakan perpaduan atau kombinasi yang berasal dari dua tetua. Tanaman hibrid harus diperbanyak secara vegetatif untuk mempertahankan sifat unggul yang dimilikinya. Kultur jaringan merupakan metode perbanyak vegetatif sehingga sangat tepat digunakan untuk perbanyak tanaman hibrid.

4. Memperbanyak tanaman yang tidak memiliki biji

Tanaman tanpa biji seperti pisang harus diperbanyak secara vegetatif. Secara vegetatif konvensional pisang diperbanyak melalui anakan dan atau mata bonggol. Namun perbanyak tanaman pisang dengan teknik kultur jaringan sudah umum dilakukan oleh pelaku agribisnis untuk komoditi pisang secara komersial. Selain diperoleh bibit dalam jumlah banyak

dengan waktu yang relatif singkat, juga diperoleh bibit yang seragam dan sehat.

5. Mempermudah pengiriman tanaman dalam *container* steril

Pengiriman tanaman jarak jauh dapat dipermudah jika tanaman yang dikirim tersebut berukuran relatif kecil serta bebas patogen. Bebas patogen diperlukan untuk mengatasi masalah karantina yang biasanya disyaratkan oleh negara tujuan. Ukuran tanaman yang relatif kecil serta kondisi steril hanya dimungkinkan jika tanaman tersebut dihasilkan melalui kultur jaringan.

6. Memperbanyak tanaman yang bijinya sulit berkecambah (Anggrek, *Nepenthes*)

Tanaman anggrek dan *Nepenthes* adalah jenis tanaman yang memiliki biji yang sulit berkecambah pada kondisi normal pada media tanah sebagaimana umumnya jenis tanaman angiospermae (tumbuhan berbiji) lainnya. Jenis tanaman ini memiliki biji sangat kecil, tanpa cadangan makanan (atau walaupun ada, sangat sedikit), sehingga biji tersebut membutuhkan cadangan makanan dari luar (eksternal) untuk berkecambah. Pada penanaman secara *in vitro* di laboratorium, biji-biji jenis tanaman ini ditanam pada media steril yang mengandung nutrisi dan sukrosa, yang digunakan oleh embrio biji untuk tumbuh dan berkecambah. Selain tidak tersedianya cadangan makanan eksternal, penanaman secara normal pada media tanah dapat menyebabkan biji-biji anggrek yang sangat kecil tersebut dimakan serangga seperti semut atau hanyut oleh siraman air.

7. Menghasilkan tanaman bebas virus dari kultur meristem

Meristem adalah bagian tanaman yang sel-selnya bersifat meristematik (aktif membelah). Meristem terletak di ujung tunas (apikal maupun aksilar) dan ujung akar. Jaringan pembuluh (xylem dan phloem) belum berkembang pada meristem dan virus umumnya ada pada jaringan pembuluh, sehingga meristem menjadi bebas virus. Kultur meristem yang menghasilkan tanaman bebas virus pertama diperkenalkan

oleh George Morrell pada tahun 1960 an. Morrell kala itu mendapatkan anakan yang bebas virus dari kultur anggrek *Cymbidium* yang terserang virus. Hingga kini kultur meristem banyak dipergunakan untuk memperbanyak tanaman secara komersial.

8. Fusi Protoplas

Tujuan dari fusi protoplas adalah untuk menyilangkan (*crossing*) tanaman yang dilakukan secara *in vitro*. Yang pertama dilakukan adalah membuat kultur sel (dari organ dengan sel-sel somatik) dari tanaman yang akan disilangkan tersebut. Selanjutnya dilakukan isolasi protoplas yaitu dengan jalan mendegradasi dinding sel dengan enzim selulase dan pektinase sehingga yang tersisa hanya protoplasmanya (sel tanpa dinding sel). Kemudian dilakukan kultur protoplas dan selanjutnya dilakukan fusi (peleburan) antara dua tipe protoplas tersebut secara *in vitro*. Hasil peleburan tersebut kemudian ditumbuhkan untuk jadi tanaman. Tanaman hasil memperbanyak melalui fusi protoplas ini akan membawa sifat- sifat yang diturunkan dari dua tanaman yang berbeda.

9. Embryo Rescue

Beberapa spesies tanaman embrionya tidak berkembang setelah terjadinya fertilisasi. Untuk kasus seperti ini maka dilakukan kultur embrio. Penyelamatan embrio melalui kultur embrio ini disebut *embryo rescue*. Misalnya para *breeder* (pemulia tanaman) jeruk keprok di Balai Penelitian Hortikultura di Indonesia melakukan kultur embrio setelah melakukan persilangan jeruk secara konvensional. Hal ini disebabkan oleh gugurnya bunga setelah fertilisasi terjadi sehingga para pemulia jeruk melakukan kultur embrio setelah melakukan persilangan buatan.

10. Menghasilkan tanaman *double haploid* melalui kultur mikrospora

Dihasilkannya tanaman *double haploid* yang homozigot melalui kultur mikrospora atau kultur anther memiliki arti yang sangat penting bagi bidang pemuliaan tanaman karena cara ini dapat mempersingkat waktu yang dibutuhkan pemulia tanaman secara konvensional.

Sejarah Singkat

Sejarah singkat perkembangan kultur jaringan tanaman secara kronologis dapat diringkas seperti pada Tabel 1:

Tabel 1.
Sejarah singkat kultur jaringan tanaman

Tahun	Tokoh/Peneliti	Kontribusi
1902	C. Haberlandt	Orang pertama yang mengkulturkan sel tanaman secara in vitro pada medium buatan
1922	WJ Robbins dan W. Kotte	Kultur akar dalam jangka pendek (kultur organ)
1934	P R White	Demonstrasi kultur akar tomat
1939	R J Gautheret dan P Nobecourt	Pengkulturan kalus pertama dan dalam jangka waktu relatif lama menggunakan eksplan dari jaringan empulur pada wortel
1939	P R White	Kultur kalus dari jaringan tumor pada tembakau hibrid hasil persilangan antar spesies of <i>Nicotina glaucum X N. longsdorffi</i>
1941	J Van Overbeek	Penemuan penggunaan air kelapa untuk kultur embrio pada wortel.
1942	P R White dan A C Braun	Penelitian pada crown gall dan pembentukan tumor pada tanaman dan menumbuhkan jaringan tanaman yang bebas tumor.
1948	A Caplan dan F C Stewart	Penggunaan santan kelapa ditambah 2,4-D untuk proliferasi pada kultur jaringan wortel dan kentang.
1950	G Morel	Kultur jaringan tanaman monokotil menggunakan santan kelapa.
1953	W H Muir	Penemuan teknik kultur sel dengan melakukan kultur sel yang berasal dari kalus .
1953	W Tulecke	Kultur haploid dari polen tanaman Gymnospermae (tumbuhan berbiji terbuka)
1955	C O Miller, F Skoog dan kawan-kawan	Penemuan sitokinin, yaitu Kinetin dan menemukan faktor-faktor yang menyebabkan pembelahan sel.
		Kultur jaringan tanaman

1955	E bal	Gimnospermae .
1957	F Skoog dan C O Miller	Hipotesis yang menyebutkan bahwa pembentukan akar atau tunas dari kultur kalus diregulasi oleh proporsi atau rasio auksin dan sitokinin dalam medium.
1960	E C Cocking	Isolasi protoplas menggunakan enzim serta kultur protoplas.
1960	G Morel	Pengembangan teknik kultur tunas apikal.
1964	G Morel	Morel mengembangkan teknik kultur meristem dan mendapatkan anakan tanaman anggrek yang bebas virus dari induk tanaman yang terjangkit virus.
1966	S G Guha and S C Maheshwari	Kultur anter dan kultur polen dan mendapatkan embrio haploid.
1974	J P Nitsch	Kultur mikrospora dari tanaman <i>Datura</i> dan <i>Nicotiana</i> untuk menggandakan jumlah kromosom dan panen biji dari tanaman <i>double haploid</i> yang homozigot dalam waktu 5 bulan.
1978	G Melchers	Fusi protoplas untuk mendapatkan hibrid somatik
1983	K A Barton , W J Brill dan J H Dodds Bengochea	Inseri gen dengan menggunakan vector plasmid menggunakan target transformasi berupa protoplas tanaman.
1983	M D Chilton	Transformasi gen pada individu sel tanaman tembakau serta produksi tanaman tembakau transgenik.

Sumber : AgriInfo (2011)

2.3 Laboratorium dan Peralatan Kultur Jaringan

2.3.1 Laboratorium

Laboratorium kultur jaringan minimal memiliki empat ruang, yakni dapur, ruang preparasi, ruang tanam dan ruang kultur (ruang inkubasi).

1. Dapur

Merupakan tempat pencucian alat-alat sebelum disterilisasi. Di dapur terdapat tempat pencucian (shink) dengan kran, bak sampah serta rak tempat menaruh alat-alat setelah dicuci.

2. Ruang preparasi

Merupakan tempat pembuatan media. Pada ruangan ini diletakkan rak yang berisi zat kimia, timbangan, *magnetic stirrer*, kulkas (tempat zat kimia yang harus disimpan pada suhu dingin, seperti zat pengatur tumbuh, media kemasan, vitamin, dan lain-lain) serta meja untuk melakukan pekerjaan pembuatan media. Jika autoklaf yang digunakan untuk sterilisasi memakai daya listrik, maka alat ini juga diletakkan di ruang preparasi. Namun jika autoklaf yang digunakan adalah jenis yang memakai kompor, maka sebaiknya diletakkan di dapur dan tidak di ruangan preparasi. Ruangan preparasi harus dijauhkan dari nyala api karena terdapat banyak bahan kimia. Selain menghindari bahaya kebakaran karena adanya bahan kimia yang mudah terbakar, tetapi juga agar terhindar dari suhu tinggi yang mungkin dapat merusak bahan kimia yang ada di ruangan tersebut. Meja yang ada di ruang preparasi juga digunakan untuk melakukan preparasi eksplan sebelum dibawa ke ruang tanam.

3. Ruang tanam

Ruang tanam merupakan ruang untuk menanam kultur. Ruangan ini harus dijaga sterilitasnya agar pekerjaan kultur dapat terhindar dari kontaminasi dan berjalan dengan sukses. Untuk alasan sterilitas ini, ruang tanam juga dilengkapi dengan lampu pembunuh mikroorganisme. Lampu ini dinyalakan 30 menit sebelum pekerjaan dimulai dan dimatikan ketika sudah mulai menanam. Pada laboratorium kultur yang lebih modern, sebelum memasuki ruang tanam, setiap orang harus disterilisasi dengan memasuki ruang pembersih yang dilengkapi dengan sprayer otomatis yang menyemprotkan *safety disinfectant* ke tubuh orang. Di dalam ruang kultur terdapat meja kerja steril. Meja kerja steril ini dapat berupa enkas yaitu meja kerja yang sangat sederhana dan tidak menggunakan daya listrik atau yang lebih modern dan menggunakan daya listrik yaitu *laminar air flow cabinet*. Ruang tanam sebaiknya dilengkapi dengan pendingin (AC) untuk memberikan kenyamanan pada pekerja kultur.

4. Ruang kultur (inkubasi)

Ruang kultur merupakan ruang untuk meletakkan dan menumbuhkan hasil kultur yang kita tanam. Ruangan ini dilengkapi dengan pendingin yang bisa diatur suhunya. Umumnya suhu yang dibutuhkan berkisar 20-24°C karena morfogenesis dalam kultur umumnya terjadi pada kisaran suhu tersebut. Di dalam ruang kultur diletakkan rak-rak kultur yang digunakan untuk menaruh kultur. Ruang ini juga harus dijaga sterilitasnya untuk menghindarkan kultur dari kontaminan. Sterilitas dijaga dengan jalan menyemprotkan desinfektan secara berkala serta membersihkan ruangan serta menyingkirkan kultur yang sudah terkontaminasi. Kultur yang sudah terkontaminasi ini akan menjadi sumber kontaminan untuk kultur yang sehat.

2.3.2 Peralatan Kultur Jaringan

Berikut akan dibahas berapa peralatan penting yang umumnya digunakan dalam kultur jaringan. Peralatan ini meliputi:

1. Timbangan digital

Timbangan (*balance*) digital beragam jenisnya, gunanya secara umum adalah untuk menghitung satuan massa suatu benda dengan teknik digital. Dalam lab kultur, alat ini digunakan untuk menimbang bahan/zat yang digunakan dalam kultur, misalnya zat pengatur tumbuh, bahan untuk media, gula, agar, dan lain sebagainya.



Gambar 1. Timbangan digital

2. *Magnetic stirrer*

Magnetic stirrer digunakan untuk proses pembuatan media serta pembuatan larutan dari senyawa yang berbentuk padat. *Magnetic stirrer* memiliki dua fungsi yaitu untuk pemanasan (*heating*) dan pengadukan (*stirring*) (Gambar 2). Dengan fungsi tersebut maka alat ini dilengkapi dengan dua tombol putar, yakni tombol “stirrer” (pengaduk) dan tombol “heat” (untuk pemanasan). Alat ini dilengkapi dengan magnet sebagai pengaduk.



Gambar 2. *Magnetic stirrer*

3. Autoklaf

Autoklaf adalah alat untuk sterilisasi dengan metode uap panas (*steam heating*). Ada dua jenis jika dilihat dari daya yang digunakan. Yang pertama adalah autoklaf yang menggunakan kompor (Gambar 3) dan yang kedua adalah autoklaf yang menggunakan daya listrik. Keduanya memiliki cara kerja yang sama dalam proses sterilisasi.



Gambar 3. Autoklaf yang menggunakan daya kompor

4. Oven

Sterilisasi juga bisa dilakukan dengan oven, namun hanya bisa untuk alat-alat kecil dan *glasswares* dan tidak bisa untuk sterilisasi media. Di dalam laboratorium, oven diletakkan di ruang preparasi. Metode sterilisasi dengan oven dikenal dengan *dry heating*, karena proses sterilisasi menggunakan udara kering yang panas. Ada banyak ragam oven, namun satu diantaranya dapat dilihat pada Gambar 4. Oven ini menggunakan daya listrik, dilengkapi dengan pengatur suhu dan waktu, sehingga proses sterilisasi bisa dilakukan dengan menekan tombol sesuai dengan kebutuhan. Angka yang menunjukkan suhu dan waktu pengovenan akan terbaca secara digital.



Gambar 4. Oven

5. Meja Kerja (Enkas, laminar)

Meja kerja dalam kultur jaringan disebut juga meja tanam, adalah tempat yang digunakan untuk menanam. Meja kerja yang sederhana

disebut enkas (Gambar 5). Enkas tidak menggunakan daya listrik. Di bagian depan terdapat dua lubang yang digunakan untuk memasukkan tangan penggunanya. Bagian dalam enkas dijaga sterilisasinya dengan jalan menyemprotnya dengan alkohol atau spiritus. Demikian pula alat/ bahan yang akan digunakan serta tangan penggunanya juga disemprot dengan alkohol. Meja kerja lainnya adalah laminar air flow cabinet (LAFC) (Gambar 6). LAFC lebih modern dari enkas, menggunakan daya listrik dan dilengkapi dengan lampu ultra violet (UV) yang berguna untuk membunuh mikroorganisme serta lampu neon sebagai penerang.



Gambar 5. Enkas



Gambar 6. *Laminar air flow cabinet* yang diletakkan berjajar

6. Rak kultur

Rak kultur merupakan tempat untuk meletakkan eksplan setelah ditanam pada media steril dan menumbuhkannya hingga menjadi

plantlet. Rak kultur diletakkan dalam ruang kultur atau ruang inkubasi. Semua proses morfogenesis hingga terbentuknya plantlet berlangsung di ruang kultur pada rak kultur (Gambar 7).



Gambar 7. Rak kultur

7. *Glasswares* dan Peralatan kecil lainnya

Glasswares adalah semua peralatan kecil yang terbuat dari bahan gelas seperti gelas ukur, gelas dan labu Erlenmeyer, serta botol kultur. Alat-alat ini dapat disterilisasi dengan oven maupun dengan autoklaf. Alat-alat ini harus dibungkus dengan kertas saat sterilisasi agar kondisi steril tetap terjaga sampai alat tersebut digunakan. Botol-botol bekas seperti botol selai, botol minuman dan botol infus yang terbuat dari bahan gelas dapat digunakan untuk botol kultur.

Peralatan kecil lainnya terdiri dari *dissecting kit* (perataan untuk memotong/mengiris), pinset, spatula dan lain-lain yang umumnya terbuat dari bahan logam (*stainless steel*). Spatula merupakan pengaduk atau digunakan untuk mengambil bahan berupa serbuk. Pinset digunakan untuk memegang / menjepit benda, umumnya digunakan pada saat penanaman eksplan. Scalpel adalah gagang pisau yang dalam penggunaannya berpasangan dengan *blade* (pisau). Gunanya adalah untuk mengiris/memotong, dalam hal ini bahan eksplan yang akan ditanam. Bagian pisau dijual secara terpisah dari scalpel (gagang) nya

dan sudah dalam keadaan steril dan bersifat sekali pakai. Peralatan kecil dari bahan logam ini juga harus dibungkus dengan kertas saat sterilisasi. Sterilisasi dapat dilakukan dengan oven maupun dengan autoklaf.

2.4 Media Kultur Jaringan

Media Kultur Jaringan merupakan faktor penentu dalam perbanyakan kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak. Media kultur yang baik seharusnya menyediakan unsur hara baik makro maupun mikro, sumber vitamin dan asam amino. Sumber karbohidrat, zat pengatur tumbuh, senyawa organik sebagai tambahan seperti air kelapa, ekstrak buah, dll. Bahan pematat berupa agar-agar dan gelrite dan juga menyediakan arang aktif untuk kasus tertentu beberapa tanaman.

Unsur hara makro dan mikro diberikan dalam bentuk garam-garam anorganik. Pada umumnya biasa diberikan dalam komposisi tertentu seperti media berupa MS, WPM, BS dll, tergantung dari jenis tanaman yang akan dikulturkan. Vitamin yang banyak digunakan adalah vitamin B12 (thiamin), nicotinic acid, vitamin B6, dan vitamin E atau C untuk antioksidan. Asam amino yang akan dipakai sebagai sumber N organik, yang biasa digunakan adalah glycine, asparagin, glutamine, alanin dan threonin.

Media yang baik harus selalu berada pada PH yang optimal yaitu 5,5 – 5,8. Selain itu, harus dibuat dalam tempat steril, autoclave sering dipakai untuk sterilisasi dalam pembuatan media kultur jaringan.

Salah satu media kultur jaringan adalah :

a. Garam-garam anorganik

Garam-garam mineral merupakan gabungan unsur-unsur esensial makro dan mikro. Konsentrasi optimum dari tiap-tiap komponen untuk mencapai kecepatan pertumbuhan yang maksimal untuk berbagai tanaman sangatlah bervariasi.

- Unsur Makro

Merupakan unsur yang dibutuhkan dalam jumlah besar yang terdiri atas : C, H, O, N, S, P, K, Ca, dan Mg.

- Unsur Mikro

Merupakan unsur yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit yang terdiri atas : Cl, B, Mo, Mn, Cu, Fe, Zn, Co.

b. Zat-zat organik

Zat-zat organik yang biasanya ditambahkan pada medium kultur jaringan adalah gula, myo-inositol, vitamin, asam-asam amino, dan zat pengatur tumbuh.

- Gula

Gula diberikan pada medium kultur jaringan berfungsi untuk sumber energy yang diperlukan untuk induksi dan pertumbuhan sel, kalus, tunas tanaman.

- Myo-inositol

Myo-inositol ditambahkan pada medium untuk membantu differensiasi dan pertumbuhan jaringan. Myo-inositol merupakan perantara pada perubahan glukosa menjadi asam galakturonat, juga berperan sebagai precursor untuk pembentukan pektin dan penyusunan dinding sel.

- Vitamin

Vitamin ditambahkan pada medium untuk mempercepat pertumbuhan dan differensiasi kalus, serta menurunkan stress tanaman/eksplan. George dan Sherrington mengungkap beberapa macam vitamin yang umum digunakan pada berbagai macam medium dasar antara lain : Thiamin-HCl, Nicotinic Acid, Pyridoxin HCl, Ca D-Pantotenate, Biotin, Folic, dan lain-lain.

- Asam-asam Amino

Asam amino merupakan sumber N organik yang lebih cepat diambil daripada N anorganik didalam medium yang sama. Sumber N yang berbeda ini, akan memberikan pengaruh yang berbeda juga. Adapun asam-asam amino yang sering digunakan pada medium dasar, pada umumnya adalah : L-Arginin, L-Aspartic acid, L-Cystein, L-Glutamate, L-Asparagin, L-Methionine, L-Tyrosine, Glycine.

- **Zat Pengatur Tumbuh**
Merupakan komponen yang dibutuhkan untuk pembuatan media.



c. **Substansi organik kompleks**

Banyak jenis substansi organik kompleks yang telah dicobakan ke medium kultur jaringan antara lain yeast ekstraks, mal ekstraks, bermacam-macam bahan tanaman seperti air kelapa, endosperm jagung, orange juice, tomato juice, dll.

Beberapa yang sudah digunakan adalah air kelapa, yang diindikasikan mengandung sitokinin endogen yang tinggi sehingga diharapkan dapat menginduksi tunas tanaman. Penelitian terakhir mendapatkan kandungan air kelapa yaitu asam amino, asam organik, asam nukleat, purin, gula, gula alcohol, vitamin, mineral, zat pengatur tumbuh.

ZPT yang terdapat didalam air kelapa adalah :

- 9-B-D ribofuranosyl zeatin
- Zeatin
- N-N-Diphenyl urea
- 2(3-methyl but 2-ethyl amino)-purin 6-one

Beberapa kelemahan substansi organik kompleks ini (kecuali air kelapa) adalah tidak konsisten kadarnya dan tidak diketahui dengan pasti komposisinya.

Media kultur jaringan tumbuhan sangat ditentukan oleh :

1) **PH Media**

PH tertentu dibutuhkan untuk pertumbuhan jaringan tanaman agar tidak mengganggu fungsi membrane sel dan PH sitoplasma. Jaringan yang ditumbuhkan pada medium kultur biasanya mempunyai PH berkisar antara 4,8-5,8. PH ini perlu dipertahankan selama medium kultur digunakan.

2) Bahan Pekat

Medium yang komposisinya sudah ditetapkan, diberi bahan pekat. Bahan pekat yang sering digunakan adalah agar-agar sejumlah 7-10 gr/l. Bahan pekat lain yang jarang digunakan adalah gelrite, yakni bahan yang lebih bening dari pada agar-agar. Pemakaian gelrite juga lebih sedikit dibanding dengan agar-agar untuk mencapai kepadatan yang sama sekitar 2 gr/l.

Penggunaan bahan pekat baik gelrite maupun agar-agar memiliki banyak kelemahan yaitu :hanya sebagian eksplan yang kontak dengan medium terjadi gradient nutrisi yang tidak sama, mobilitas zat hara menjadi kurang baik dan terjadi akumulasi zat-zat toksik yang dikeluarkan oleh eksplan.

3) Arang Aktif

Arang aktif merupakan arang yang dihasilkan dari proses pemanasan yang menggunakan uap atau udara yang panas. Bahan ini dapat mengabsorpsi berbagai bahan(zat). Banyak digunakan dalam medium inisiasi, regenerasi, dan pengakaran tanaman kultur.

Beberapa pengaruh zat arang aktif didalam kultur jaringan tumbuhan adalah :

- Mengabsorpsi senyawa toksik yang terdapat dalam media.
- Mengabsorpsi ZPT.
- Merangsang perakaran.
- Memacu pertumbuhan jumlah anakan.

2.5 Tipe Kultur Jaringan

Ditinjau dari bahan eksplan yang digunakan, kultur jaringan tanaman dibedakan menjadi :

A. Kultur meristem (*meristem cultures*)

Meristem adalah bagian tanaman yang sel-selnya bersifat meristematik dan aktif membelah. Pada tubuh tanaman posisi meristem ada pada ujung tunas (tunas apikal maupun aksilar) yang berfungsi menambah panjang tunas, pada ujung akar berfungsi menambah panjang akar serta pada kambium batang yang menyebabkan bertambah besarnya diameter tanaman. Pada tanaman suku gramineae (rumput-rumputan) terdapat meristem khusus yang disebut 'meristem interkalar' yang posisinya ada pada buku (node) batang yang menyebabkan bertambah panjangnya ruas (internode) batang.

Kultur meristem merupakan sistem organogenesis secara langsung, sehingga memungkinkan diperoleh anakan yang secara genetik lebih stabil jika dibandingkan melalui fase kalus. Produksi tanaman bebas virus dengan kondisi genetik yang stabil melalui kultur meristem telah dilakukan oleh perusahaan hortikultura yang besar untuk tanaman kentang, tebu, pisang dan apel. Makin besar ukuran eksplan akan mempermudah proses kultur dan menyebabkan lebih banyak plantlet yang dihasilkan, namun akan diperoleh anakan tanaman yang bebas virus makin sedikit seperti percobaan yang dilakukan Dale & Cheyene (1993) pada tanaman clover (*Tripolium patense*).

B. Kultur ujung tunas (*shoot-tip cultures*)

Kultur ujung tunas menggunakan eksplan bakal tunas apikal atau tunas aksilar, berukuran 3-20 mm, menyertakan beberapa primordia daun dan jaringan pembuluh. Eksplan bakal tunas aksilar dapat berupa 'nodal segment' (irisian buku) karena pada irisan buku (buku merupakan bekas tempat daun tumbuh) terdapat bakal tunas aksilar. Eksplan ditanam pada media induksi tunas (media dengan kandungan sitokinin) untuk memunculkan 'pre-existing' tunas yang ada dalam eksplan.

Tunas dalam jumlah banyak bisa muncul (multiplikasi tunas),

namun bisa juga hanya dihasilkannya satu tunas dari satu eksplan. Jika dihasilkannya banyak tunas, tunas-tunas tersebut disubkultur ke media perakaran (media dengan auksin) untuk dihasilkannya plantlet. Namun jika yang muncul hanya satu tunas, maka dilakukan kultur ‘nodal segment’ kembali dari satu tunas yang dihasilkan tersebut.

Perbanyak tanaman dengan kultur ujung tunas ini sukses dilakukan untuk tanaman pisang. Metode ini disebutkan superior (dibandingkan perbanyak pisang secara konvensional dengan *sucker*) dalam hal hasil optimal yang diperoleh, keseragaman bibit, kebersihan bibit karena bebas penyakit serta sifat *true to type* yang diturunkan (Ngomuo *et al.* 2014).

C. Kultur embrio (*Embryo cultures*)

Kultur embrio adalah mengkulturkan embrio zigotik secara *in vitro*. Embrio zigotik adalah hasil fertilisasi antara sel telur dengan inti sel sperma yang terjadi pada proses fertilisasi ganda tanaman angiospermae.

Embrio zigotik dapat digunakan sebagai bahan eksplan namun untuk kondisi tertentu atau alasan tertentu sebagai berikut:

- a. Embrio tidak bisa ditumbuhkan dalam kondisi biasa secara *in vitro* karena tidak memiliki cadangan makanan. Misalnya pada tanaman anggrek. Biji-biji anggrek yang berukuran sangat kecil dan berjumlah sangat banyak (mencapai ribuan sampai jutaan) dari sebuah kapsul tidak memiliki endosperm (cadangan makanan) yang diperlukan oleh biji untuk perkecambahan. Biji-biji ini harus ditumbuhkan secara *in vitro* dengan memberi nutrisi buatan untuk dapat berkecambah dan tumbuh menjadi seedling (tanaman).
- b. Embrio hasil fertilisasi tidak berkembang dan mati. Contohnya adalah ‘embryo rescue’ pada embrio zigotik hasil persilangan buatan yang dilakukan para pemulia tanaman jeruk keprok. Setelah melakukan persilangan buatan, embrio muda diambil dari tanaman induk dan ditumbuhkan secara *in vitro* karena pada tanaman induknya embrio tersebut tidak berkembang dan mati.

D. Kultur dan fusi protoplas (*Protoplast cultures and fusion*)

Istilah protoplas mengacu pada sel tanaman tanpa dinding sel atau isi sel yang terbungkus hanya oleh membran plasma. Protoplas dari sebuah sel dapat dipisahkan dari dinding selnya secara enzimatik maupun secara mekanik. Protoplas yang sudah terpisah dari dinding selnya ini dapat diregenerasikan menjadi tanaman secara utuh.

Isolasi protoplas secara enzimatik pertama kali dilakukan oleh E.C. Cocking awal tahun 1960. Sedangkan regenerasi protoplas menjadi tanaman secara utuh pertama dilakukan pada protoplas daun tembakau melalui kultur protoplas yang dilakukan oleh Takebe *et al.* pada tahun 1970 (Tomar & Dantu, 2010).

Isolasi protoplas dan kultur protoplas menjadi dasar dilakukannya fusi protoplas atau hibridisasi *in vitro* dari dua tetua tanaman dengan sifat-sifat yang unggul. Fusi protoplas atau hibridisasi *in-vitro* ini dilakukan karena adanya inkompatibilitas (ketidakcocokan) yang terjadi pada persilangan buatan yang dilakukan secara konvensional di lapangan sehingga gagal terbentuk embrio. Hasil fusi protoplas ini bisa ditumbuhkan menjadi tanaman secara utuh yang membawa sifat dari dua tetua dari mana protoplas tersebut berasal. Fusi protoplas ini juga memungkinkan dilakukannya persilangan antar dua tanaman yang secara taksonomi memiliki hubungan kekerabatan yang jauh, dimana secara konvensional persilangan tersebut sulit dilakukan.

E. Kultur mikrospora (*microspore cultures*)

Mikrospora merupakan sel kelamin (gamet) jantan pada tanaman angiospermae dan dapat dijumpai pada bunga tanaman yang masih kuncup. Mikrospora dapat dikatakan sebagai *immature pollen* (polen yang belum masak fisiologis). Secara alamiah, mikrospora akan berkembang menjadi polen atau serbuk sari. Polen ini nantinya akan berkembang menjadi inti sperma 1 dan inti sperma 2 pada penyerbukan ganda tanaman angiospermae. Namun pada kultur mikrospora,

mikrospora dibelokkan arah perkembangannya menjadi embrio, bukan menjadi polen.

F. Kultur Kalus dan Kultur Suspensi (*Callus Cultures and Suspension cultures*)

Kalus adalah kumpulan sel yang belum terdiferensiasi. Kalus terbentuk pada bekas luka atau irisan pada organ tanaman. Secara *in vitro* kalus akan terbentuk pada bagian irisan/luka dari organ yang dikulturkan, namun pada beberapa spesies tanaman, kalus dapat terbentuk pada bagian sebelah dalam (*interior*).

Secara teori, semua organ/jaringan tanaman yang sel-selnya masih hidup dapat membentuk kalus secara *in vitro*. Akan tetapi jaringan tanaman yang masih muda (belum ada lignifikasi pada dinding selnya), atau jaringan muda yang bersifat meristematis akan lebih mudah menghasilkan kalus. *Seedling* (kecambah) yang dibuat secara *in vitro* dari biji (yang sudah disterilkan) sangat baik digunakan sebagai bahan eksplan untuk pembuatan kalus. Kalus akan terbentuk jika eksplan ditanam pada media kultur yang mengandung auksin dan sitokinin dengan rasio yang sama atau media yang mengandung 2,4-D. Kalus merupakan bentuk 'antara' sebelum terbentuknya embrio dalam proses *indirect* embriogenesis somatik maupun sebelum terbentuknya organ pada *indirect* organogenesis. Kalus juga merupakan bahan *stock* untuk kultur suspensi.

G. Kultur Biji (*Seed Cultures*)

Kultur biji dilakukan untuk biji tanaman yang tidak dapat dikecambahkan secara *eks vitro* ataupun kalau dapat berkecambah secara *eks vitro* maka persentase perkecambahannya sangat rendah. Hal ini disebabkan karena biji-biji tersebut berukuran sangat kecil dan sedikit atau tidak sama sekali memiliki endosperm (cadangan makanan). Beberapa literatur menyebutkan kultur biji tanpa cadangan makanan ini juga disebut sebagai kultur embrio. Cadangan makanan pada biji

diperlukan oleh embrio biji untuk proses respirasi sehingga menghasilkan energi untuk berkecambah. Alasan ini menyebabkan biji-biji tanaman ini harus dikecambahkan secara in vitro dengan memberikan sumber karbohidrat eksternal untuk respirasi. Selain itu, pada media juga ditambahkan nutrisi untuk pertumbuhan lanjutan dari biji yang sudah berkecambah. Salah satu contoh tipe biji seperti ini adalah biji tanaman anggrek.

2. 6 Tahapan Pekerjaan dalam Kultur Jaringan

Untuk mengetahui tahapan yang harus disiapkan kita perlu yang namanya media atau peralatan yang diperlukan seperti : timbangan digital, magnetic stirrer, autoklaf, oven, rak kultur, glasswares serta ditunjang dengan adanya ruang tanam dan ruang kultur .

Pada dasarnya pekerjaan kultur jaringan meliputi tiga tahap sampai penanaman kultur (*culture establishment*) dan tiga tahap setelah itu sebelum pindah ke lapangan :

- Isolasi bahan tanaman
- Sterilisasi eksplan
- Penanaman eksplan pada media steril yang sesuai (*culture establishment*) setelah eksplan ditanam ada empat fase lagi yang diperlukan sampai tanaman siap di tanam di lapang yaitu :
 - a. Perbanyak propagul
 - b. Pengakaran
 - c. Aklimitisasi
 - d. Pemindahan tanaman ke lapangan

1. Isolasi Bahan Tanam (Eksplan)

Dalam tahapan ini melakukan pemilihan dan pemeliharaan induk. Perlu diketahui bahwa tanaman induk yang diambil harus memiliki kualitas yang bagus agar eksplan yang dihasilkan tidak menjadi sumber kontaminan sehingga aseptik harus dijaga dengan memberikan penyemprotan pestisida dan diberi pupuk agar pertumbuhan vigor.

Kemudian melakukan pemotongan tunas apical untuk merangsang tumbuhnya tunas lateral. Tunas lateral ini yang nantinya digunakan sebagai bahan eksplan dengan sel sel yang aktif membelah dan memiliki daya regenerasi yang tinggi sehingga cocok digunakan dalam pengembangan eksplan.

2. Sterilisasi Eksplan

Yang perlu diperhatikan dalam sterilisasi permukaan bahan eksplan adalah konsentrasi sterilan dan lamanya perendaman. Angka yang tepat biasanya diperoleh melalui penelitian awal (trial and error), karena sangat spesifik untuk masing-masing spesies tanaman serta jenis dan umur bahan eksplan. Konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan kematian pada sel-sel tanaman, sedangkan konsentrasi yang terlalu rendah tidak efektif karena tidak mampu membunuh mikroorganisme yang ada di permukaan eksplan. Jika tanaman induk sumber eksplan merupakan tanaman hasil kultur dan berada dalam botol kultur, maka prosedur sterilisasi ini tidak diperlukan. Misalnya jika bahan eksplan adalah seedling (bibit) anggrek dalam botol, maka sterilisasi bahan eksplan tidak diperlukan karena tanaman induk sumber eksplan sudah steril.

3. Penanaman eksplan

Eksplan yang sudah steril dipotong menjadi bagian yang lebih kecil kemudian ditanam pada media yang lebih steril. Media tanaman yang ditanami tanaman mengandung ZPT tertentu sesuai dengan tujuan kultur. Jika yang diinginkan adalah pembentukan kalus, maka bahan eksplan ditanam pada media induksi kalus.

4. Perbanyak (Proliferasi) Propagul

Propagul adalah bentukan baru hasil morfogenesis yang terbentuk dari jaringan eksplan yang ditanam. Propagul dapat berupa kalus, tunas atau embrio somatik. Proliferasi tersebut dapat dilakukan dengan

melakukan subkultur ke medium baru, dapat berupa medium induksi kalus untuk memperbanyak kalus dan medium induksi tunas untuk memperbanyak tunas.

5. Pengakaran

Tahap pengakaran adalah tahap dimana tunas-tunas yang sudah tumbuh dipindahkan ke media induksi akar agar terbentuk plantlet. Pengakaran dapat dilakukan secara in-vitro (di laboratorium) atau eksvitro (di luar laboratorium). Induksi akar secara in-vitro dilakukan tetap di laboratorium dalam kondisi aseptik.

Induksi akar secara eks-vitro dilakukan dengan jalan melakukan transplanting tunas-tunas mini ke media semi steril di luar laboratorium. Pangkal-pangkal tunas ini biasanya dicelupkan dahulu ke larutan yang mengandung auksin untuk merangsang tumbuhnya akar sebelum akhirnya ditanam pada media semisteril yang sudah disiapkan. Pengakaran eks-vitro kini banyak dilakukan, dianggap lebih efisien karena menghindarkan pekerja dari pekerjaan in-vitro yang rumit dan hati-hati.

6. Aklimatisasi dan Pemandahan Tanaman ke Lapang

Tanaman mikropropagasi tidak dapat langsung ditanam di lapangan dikarenakan butuh penyusuan berbeda dengan tanaman normal di lapangan. Kondisi mikro botol menyebabkan perkembangan kultur jaringan tidak memiliki zat lilin sementara itu stomata yang dimiliki juga tidak berfungsi sehingga sangat memiliki resiko jika langsung ditanam di lapangan. Aklimatisasi dalam kultur in-vitro adalah suatu proses adaptasi dari tanaman hasil kultur in-vitro (plantlet) terhadap cekaman lingkungan baru sebelum ditanam di lapang. Kondisi lingkungan baru tersebut meliputi suhu, cahaya dan kelembaban. Tahap aklimatisasi ini juga merupakan tahap yang krusial dalam kultur jaringan. Kematian plantlet setelah aklimatisasi seringkali terjadi sehingga tahap ini perlu dilakukan secara hati-hati.

2.7 System regenerasi tanaman pada kultur jaringan

a. Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik adalah proses terbentuknya struktur menyerupai embrio dari sel-sel somatik. Fase yang dilewati dalam embriogenesis somatik ini serupa dengan fase terbentuknya embrio zigotik hasil fertilisasi. Embriogenesis somatik terbentuk dari individu sel atau sekelompok sel, kemudian memasuki globular stage (fase bentuk bundar), heart stage (fase bentuk hati) dan torpedo stage (fase bentuk menyerupai torpedo) baru kemudian menjadi embrio. Pada fase torpedo, meristem ujung batang dan meristem ujung akar sudah dapat terdeteksi. Meristem ujung batang nantinya akan berkembang menjadi tunas dan meristem ujung akar menjadi akar. Proses terbentuknya embrio somatik ini dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung (melalui kalus).

Embriogenesis somatik secara tidak langsung, contoh yang sering diberikan adalah tanaman wortel (*Daucus carota*). Embriogenesis secara langsung jarang dilakukan dalam kebanyakan tanaman melalui kultur jaringan dibandingkan metode secara langsung. Contoh yang umum diberikan adalah untuk tanaman alfalfa (*Medicago falcata*).

b. Organogenesis

Organogenesis adalah proses terbentuknya organ dari jaringan baik itu secara langsung ataupun secara tidak langsung. Pada umumnya program regenerasi melalui organogenesis terjadi dalam 3 tahap :

1) Organogenesis secara langsung dari eksplan yang memiliki tunas

Organogenesis secara langsung dari eksplan yang memiliki primordia tunas dapat terjadi jika jaringan eksplan yang digunakan memiliki bakal tunas (pre-existing shoots) yang belum muncul ke permukaan. Tunas apikal (apical buds), tunas lateral (laterally buds), dan irisan buku/ruas pada batang (nodal segment) dapat dijadikan bahan eksplan untuk pilihan tipe ini. Media kultur dimodifikasi dengan menambahkan hormon untuk induksi tunas sehingga bakal tunas tersebut

dapat muncul ke permukaan.

2) Organogenesis secara langsung dari eksplan yang tidak memiliki tunas

Organogenesis secara langsung dari eksplan yang tidak memiliki bakal tunas dapat terjadi jika tunas muncul secara langsung misalnya dari irisan daun. Tunas yang muncul dari jaringan tanaman yang tidak memiliki bakal tunas disebut tunas adventif. Istilah tunas adventif juga digunakan untuk memperbanyak tanaman secara vegetatif konvensional, misalnya untuk tunas yang muncul dari stek daun tanaman cocor bebek (*Coleus sp.*).

3) Organogenesis secara tidak langsung melalui fase kalus

Organogenesis secara tidak langsung terjadi jika organ yang terbentuk (dalam hal ini tunas) terjadi melalui fase kalus. Contohnya adalah pada kultur umbut kelapa sawit Kalus yang awalnya terbentuk dari eksplan umbut kelapa sawit disubkultur ke media yang mengandung hormon untuk induksi tunas. Selanjutnya tunas-tunas ini dipindahkan ke media pengakaran untuk membentuk plantlet secara utuh.

2.8 Permasalahan dalam Kultur Jaringan

Beberapa permasalahan yang timbul pada kultur tanaman secara in-vitro dapat diringkas sebagai berikut:

a. Kontaminasi oleh mikroorganisme

Kontaminasi oleh mikroorganisme merupakan permasalahan yang paling utama dalam kultur jaringan dan menyebabkan kegagalan, sehingga kondisi aseptik merupakan persyaratan yang paling utama dalam pekerjaan kultur in-vitro. Hal ini disebabkan karena media kultur mengandung gula dan nutrisi lainnya yang tujuannya untuk pertumbuhan eksplan, namun disisi lain hal ini bisa dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai sumber makanan untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme yang umumnya menjadi sumber kontaminan pada kultur jaringan adalah bakteri dan fungi.

Sumber kontaminasi dapat berasal secara internal dari jaringan eksplan maupun secara eksternal dari luar jaringan eksplan. Secara

internal dari jaringan eksplan bisa disebabkan oleh prosedur sterilisasi permukaan (*surface sterilization*) eksplan yang kurang sempurna sehingga eksplan tidak benar-benar bebas dari mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut kemudian tumbuh ketika eksplan ditanam pada media kultur.

Sumber kontaminan eksternal dapat berasal dari lingkungan kultur seperti media kultur, meja kerja serta pekerja kultur. Proses sterilisasi media yang kurang sempurna menyebabkan adanya bibit mikroorganisme dalam media kultur (misalnya spora jamur) yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang dan kemudian dapat tumbuh dengan waktu.

b. Pencoklatan (*Browning*)

Pencoklatan (*browning*) yang terjadi pada media kultur merupakan permasalahan dalam kultur jaringan karena menyebabkan kematian jaringan eksplan. *Browning* disebabkan oleh eksudasi senyawa fenolik dari jaringan eksplan. Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder terbanyak yang terdapat pada jaringan tanaman. Senyawa fenolik tersebut terekudasi dari jaringan tanaman akibat luka irisan baik ketika eksplan diambil dari tanaman donor maupun ketika preparasi jaringan eksplan.

Eksudasi senyawa fenolik ini menyebabkan aktivasi enzim Polyphenol oxidase (PPO) yang merupakan enzim oksidatif (Litz & Vijayakumar, 1988) sehingga terjadi oksidasi senyawa fenolik yang menyebabkan kematian jaringan eksplan. Oksidasi senyawa fenolik ini menghasilkan senyawa kuinon yang sangat reaktif dan beracun bagi tanaman sehingga menyebabkan sel-sel tanaman mengalami nekrosis dan mati (Titov *et al.* 2006; Ozyigit, 2008).

c. Vitrifikasi

Vitrifikasi disebabkan oleh kerusakan secara fisiologis pada tanaman sehingga menampilkan fenotip daun atau batang tanaman 'glassy'

(bening, seperti gelas). Tanaman hasil perbanyakan secara in-vitro seringkali menunjukkan fenotip seperti ini. Keadaan ini akan diikuti oleh nekrosis dan kematian jaringan eksplan atau tanaman.

Vitrifikasi terjadi karena sel-sel tanaman mengandung air yang berlebihan (*hyperhydricity*), defisiensi klorofil, dan kurangnya lignifikasi pada dinding sel. Beberapa faktor yang mempengaruhi terjadinya vitrifikasi pada tanaman hasil perbanyakan in vitro adalah : jenis pemat, hormon, senyawa organik dan inorganik, temperatur ruang kultur, cahaya dan lingkungan botol kultur (Pasqualetto, 1990). Pada kultur tanaman *Chlorophytum borivilianum* (jenis tanaman obat), Sharma & Mohan (2006) mendapatkan bahwa beberapa hal yang dapat mengurangi vitrifikasi adalah penggunaan botol kultur yang memiliki aerasi; penurunan konsentrasi BAP dari 2 mg/L menjadi 0 mg/L pada saat subkultur; penggunaan sitokinin jenis kinetin dibandingkan jenis BAP.

Uap air yang berlebihan pada botol kultur dapat menyebabkan vitrifikasi. Kondisi ini dapat disebabkan misalnya oleh matinya AC (*Air conditioning*) ruang kultur (misalnya karena daya listrik yang tidak mencukupi) sehingga memicu adanya uap air yang berlebih dalam botol kultur. Dengan demikian ketersediaan daya listrik yang cukup merupakan persyaratan mutlak untuk sebuah laboratorium kultur jaringan.

BAB III PENUTUP

3.1 Kesimpulan

Teknik kultur jaringan atau kultur in-vitro adalah teknik menumbuhkan organ, jaringan, sel (atau protoplas) tanaman secara in vitro pada media yang mengandung nutrisi di laboratorium dalam kondisi aseptik. Teknik ini didasari oleh teori totipotensi sel, yaitu teori yang menyebutkan bahwa sel tanaman memiliki potensi untuk tumbuh menjadi tanaman secara utuh.

Teknik ini digunakan untuk berbagai tujuan, yang utamanya adalah untuk memperbanyak tanaman. Perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan ini tergolong perbanyak secara vegetatif dan anakan yang dihasilkan akan sama dengan induknya (*true-to type*). Selain sifat *true to type* pada anakannya, teknik perbanyak dengan cara ini lebih efisien karena dari bahan tanam yang berukuran kecil akan dihasilkan anakan dalam jumlah banyak. Selain itu, area yang dibutuhkan untuk proses perbanyak juga jauh lebih sedikit dibandingkan perbanyak vegetatif konvensional. Bibit tanaman yang dihasilkan dengan kultur jaringan juga lebih bersih dan sehat, sehingga untuk tujuan perdagangan bibit, maka bibit hasil kultur jaringan akan lebih baik.

Teknik perbanyak ini sangat penting artinya terutama untuk memperbanyak tanaman unggul hibrida, tanaman hasil persilangan, tanaman unggul transgenik, tanaman yang tidak memiliki biji, dan tanaman yang bijinya tidak memiliki cadangan makanan. Selain itu melalui kultur meristem (bagian ujung tunas yang meristematik dan tanpa jaringan pembuluh) dapat dihasilkan tanaman bebas virus. Persilangan secara in-vitro melalui kultur dan fusi protoplas juga sudah berhasil dilakukan orang. Hal ini sangat penting untuk mengatasi persilangan antar spesies/kultivar yang inkompatibel jika dilakukan di lapang. *Embryo rescue* melalui kultur embrio juga dilakukan melalui teknik kultur jaringan. Tujuannya adalah untuk menyelamatkan embrio zigotik hasil persilangan di lapang yang tidak dapat berkembang secara normal atau gugur sebelum menjadi biji.

Pekerjaan rekayasa genetika juga membutuhkan pengetahuan dan keahlian teknik kultur jaringan. Target transformasi yang berupa sel, kalus,

protokorm maupun *protocorm like bodies* diproduksi, kemudian ditumbuhkan menjadi tanaman secara utuh untuk menghasilkan tanaman transgenik. Semua proses tersebut harus dilakukan *in vitro*. Oleh karena itu, pengetahuan mengenai sistem regenerasi pada kultur jaringan serta tahap-tahap perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan perlu diketahui dan dipahami oleh mereka yang bekerja pada rekayasa genetika.

Permasalahan yang sering timbul dalam perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan adalah kontaminasi oleh mikroorganisme, browning pada media dan vitrifikasi, yang kesemuanya menyebabkan kematian pada jaringan eksplan. Permasalahan tersebut dapat dicegah dengan melakukan proses kultur dengan benar serta pemeliharaan dan perlakuan terhadap tanaman donor eksplan.

Masalah lainnya yaitu variasi somaklonal yang seringkali menghasilkan fenotip menyimpang dari induknya. Penyimpangan ini dapat bersifat genetik (merubah struktur dan sekuen DNA) maupun epigenetik (disebabkan oleh aktivasi/in-aktivasi gen tertentu karena faktor lingkungan). Namun kadangkala variasi somaklonal dapat bersifat menguntungkan jika penyimpangan tersebut secara tidak sengaja menghasilkan kultivar baru yang unggul.

Penyediaan bibit unggul yang seragam, bersih dan sehat menjadi tantangan dalam bisnis hortikultura ataupun bibit komoditas lainnya di bidang perbenihan di Indonesia. Tantangan ini bisa terjawab melalui perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan sebagaimana yang sudah dilakukan di negara lain. Kebutuhannya akan luas lahan yang relatif sedikit juga memberikan solusi terhadap menyempitnya luas kepemilikan lahan sehingga bisnis bibit dengan perbanyakan *in vitro* akan lebih mudah dikerjakan.

DAFTAR PUSTAKA

AgriInfo. 2011. Brief history of plant tissue culture (<http://agriinfo.in/default.aspx?page=topic&superid=3&topicid=1881>;diunduh 10 Juli 2015)

Ahmad I, Hussain T, Ashraf I, Nafees M, Maryami, Raffay M & Iqbal M. 2013. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am-Eurasian J. Agric.* 13 (4): 539-547

Andersone U & Ievinsh. 2002. Changes of Morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds in vitro. *Ann. Bot.* 90: 293-298

Burger DW. 1988. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. *Hort. Sci.* 23: 1066-1068

Dale PJ & Cheyne VA. 1993. The elimination of clover diseases by shoot tip culture. *Ann. Appl. Biol.* 123: 25-32

Dwiyani R, Purwantoro A, Indrianto A & Semiarti E. 2012. Konservasi anggrek alam Indonesia *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* melalui kultur embrio. *Bumi Lestari* 12 (1) : 93-98

<https://www.berbagaireviews.com/2018/05/sejarah-kultur-jaringan-dan-pengertian.html>

<https://leqi.files.wordpress.com/2009/02/sejarah-singkat-kultur-jaringan-tanaman.pdf>

<https://p4ndhit.files.wordpress.com/2010/03/sejarah-kultur-jaringan-tumbuhan1.pdf>