

BAB I

PENDAHULUAN

Kompetensi Dasar:

1. Mampu mendeskripsikan teori sel yang merupakan dasar kultur jaringan.
2. Mampu menjabarkan konsep "Totipotensi sel".
3. Mampu menganalisis kegunaan kultur jaringan.
4. Mampu meneskripsi pembagian teknik kultur jaringan.

Perkembangan ilmu Biologi akhir akhir ini sangat pesat dan sejajar dengan bidang- bidang lainnya seperti telekomunikasi dan komputer. Dengan prinsip dasar pemanfaatan sistem biologi pada level sel atau bagian-bagian sel untuk menghasilkan produk yang diperlukan, maka muncullah cabang ilmu biologi terapan yang disebut **kultur jaringan**.

Kultur jaringan merupakan terjemahan dari **Tissue culture**. **Tissue** dalam bahasa Indonesia adalah jaringan yaitu sekelompok sel yang mempunyai fungsi dan bentuk yang sama, **Culture** diterjemahkan sebagai kultur atau pembudidayaan. Sehingga kultur jaringan diartikan sebagai budidaya jaringan/ sel tanaman menjadi tanaman utuh yang kecil yang mempunyai sifat yang sama dengan induknya.

Street (1977) mengemukakan terminologi, Plant tissue culture is generally used for the aseptic culture of cells, tissues, organs, and their components under defined physical and chemical condition *in vitro*. Atau : Kultur Jaringan adalah kultur aseptik dari sel, jaringan, organ, atau bagian lain yang kompeten untuk dikulturkan dalam komposisi kimia tertentu dan keadaan lingkungan terkendali.

Thorpe (1990) melanjutkan definisi tersebut, Plant cell/ tissue culture, also referred to as *in vitro*, aseptic, or sterile culture is an important tool in both basic and applied studies as well as in commercial application.

Artinya, kultur jaringan dapat didefinisikan sebagai metode untuk mengisolasi bagian tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ dan menumbuhkannya dalam media yang tepat dan kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap.

Kadang kala kultur jaringan juga disebut sebagai kultur *in vitro*, mengapa demikian ?, jika kita tarik dari definisi masing-masing kata yaitu: berasal dari *in vitro culture*. **Culture** diterjemahkan sebagai kultur (pembudidayaan, budidaya), **in** diterjemahkan sebagai didalam, **vitro** berasal dari kata vitrus, yang artinya gelas kaca, transparan, sehingga kultur *in vitro* adalah budidaya sel, jaringan pada tabung kaca

Yang menjadi pertanyaan adalah, mengapa sel atau jaringan atau bagian-bagian tanaman tersebut dapat beregenerasi menjadi individu/ tanaman utuh ?, sementara di awalnya hanyalah sebuah sel atau sepotong jaringan ? adakah sesuatu yang tersimpan yang dimiliki sebuah sel sehingga sel tersebut dapat beregenerasi menjadi tumbuhan utuh ?.

Keadaan ini dapat terjadi karena adanya kemampuan totipotensi pada sel/ jaringan. Totipotensi sel adalah kemampuan total suatu sel untuk dapat meregenerasikan dirinya menjadi individu/ tanaman utuh jika ditempatkan pada media dan kondisi yang tepat. Pertanyaan lanjutan akan muncul, yaitu mengapa kemampuan total ini dapat dibangun atau dimiliki oleh sel dan sel dapat beregenerasi ? Hal ini tentulah dikarenakan sel tersebut memiliki materi/ substansi genetik (DNA).

Kemampuan totipotensi ini belum sepenuhnya berlangsung sukses pada hewan dan manusia. Sampai saat ini pada sel hewan keberhasilan baru pada tahap **pluripotensi**, walaupun kita ketahui bersama bahwa "Dolly and Dolly" hasil kloning berhasil sukses diciptakan namun ada beberapa hal yang perlu dicatat dari eksperimen tersebut, bahwa sel-sel yang digunakan sebagai sumber eksplan untuk menciptakan Dolly adalah bersumber dari sel-sel germinal (sel-sel yang berhubungan dengan sel kelamin), tepatnya dari sel kelenjar mammae, bukan dari sel somatic, hal lain yang dapat dicatat adalah bahwa kesuksesan tersebut tidak bertahan lama seperti halnya jika kita mengkulturkan sel-sel tumbuhan yang kemudian kita akan dapat menghasilkan tumbuhan utuh dan dapat diperbanyak.

Perkembangan sampai saat ini ialah jika kita mengkulturkan sel / jaringan usus pada media yang sesuai untuk pertumbuhan dan regenerasi, maka hasil yang didapat adalah sel/ jaringan usus yang dikulturkan tadi memperbanyak

diri dalam jumlah besar, namun belum dapat berdiferensiasi lebih lanjut, kecuali jika sumber jaringan tersebut berhubungan dengan sel-sel germinal, seperti kasus domba Dolly yang berasal dari kelenjar mammae.

Teori dasar dari kultur jaringan adalah apa yang diusulkan oleh **Gottlieb Haberlandt** dari **German Academy of Science** pada tahun 1902 dengan eksperimen yang dilakukan dengan "Kultur sel tunggal" yang diisolasi dari sel vegetatif, hingga penelitian berhasil. Haberlandt disebut sebagai Bapak Kultur jaringan (Father of plant tissue culture)

Penelitian dilanjutkan oleh pioneer-pioneer seperti White (1963), Bhojwani (1983), Robb (1922) yang berhasil mengkulturkan ujung akar tomat yang masih sangat meristematis.

Tehnik kultur jaringan ini berkembang didasarkan pada penelitian-penelitian Scheilden dan Schwann tentang kompetensi sel secara total yang disebut totipotensial. Scheildein (1833) dan Schwann (1839) mengatakan, sel merupakan unit dari structural dan fungsional dari organisme yang dapat berkembang secara otonomi. Teori ini di uji coba oleh Voching (1878) pada induksi kalus dan akhirnya kalus dapat beregenerasi, tumbuh ke bagian atas membentuk tunas dan ke bagian bawah membentuk akar (bipolar)

Kultur jaringan atau budidaya jaringan merupakan awal revolusi dalam bioteknologi, dan disebut sebagai pionir/ cikal bakal munculnya bioteknologi lanjutan seperti transfer gen dsb. Kloning pada anggrek merupakan sukses yang pertama, dimana satu mata tunas yang ditanam dengan media cair dan penggojokan dapat menghasilkan 10 juta tanaman anggrek yang seragam dalam waktu 1 tahun.

Kultur *in vitro* banyak digunakan untuk melanjutkan atau memperbaiki metode pemuliaan tradisional/konvensional dan untuk melakukan modifikasi terhadap tanaman dan perbaikan tanaman.

Banyak masalah sudah terpecahkan dengan menggunakan tehnik kultur jaringan ini, beberapa masalah terpecahkan seperti masalah penyilangan dari tanaman yang inkompatibel, induksi tanaman haploid dengan menggunakan kultur *in vitro*, dengan tehnik yang terkontrol dapat memproduksi interspesifik dan intergenerik hybrids. Contoh lain adalah kultur embrio, ovary dan ovul pada tanaman barley yang digunakan untuk memperoleh tanaman monoploid, mekanisme ini digunakan untuk mengatasi masalah dormansi biji.

Perkembangan lanjutan dari kultur *in vitro* adalah budidaya protoplas yang merupakan sukses besar dengan hasil yang sangat penting untuk kepentingan banyak ilmu. Dampak dari keberhasilan isolasi protoplas, maka sel hidup

yang telanjang, yang dinding selnya dihilangkan secara enzimatis dengan selulase dan pektinase, maka budidaya jaringan maju selangkah lagi, yaitu dengan berhasilnya mengadakan fusi protoplas dengan bantuan zat-zat kimia antara lain Poli Etilen Glikol (PEG) atau arus listrik, maka terjadilah apa yang disebut Somatik Cross.

Beberapa hasil somatic cross yang telah berhasil yaitu: Pomato, suatu silangan antara kentang (Potato) dan tomat (Tomato). Silangan yang masih berupa jaringan, diperoleh antara kedele dengan jagung, antara kedele dengan padi.

Belum tuntas penelitian mengenai fusi protoplas, budidaya jaringan telah maju selangkah lagi, yaitu dengan keberhasilan para ilmuwan menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang pertama dihasilkan adalah metabolit berberin dari *Coptis japonica*, diikuti dengan metabolit lainnya.

Banyak hal dapat dilakukan dengan menggunakan tehnik kultur jaringan antara lain :

1. Membuat perbanyakkan tanaman. Dengan menggunakan tehnik *in vitro* ini kita dapat menghasilkan jumlah tanaman yang berlipat ganda dalam waktu singkat, seragam, bermutu handal. Beberapa penelitian telah dilakukan oleh Harahap (2005a, 2006a, 2007) pada perbanyakkan tunas *in vitro* tanaman manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan berbagai modifikasi ZPT dan pola pematangan eksplan yang berbeda dan menunjukkan keberhasilan.



2. Memacu pertumbuhan. Harahap telah memanfaatkan arang aktif dalam kultur *in vitro* untuk meningkatkan pertumbuhan anggrek, pemberian arang aktif 3 gr/ liter media mampu meningkatkan jumlah tunas anakan anggrek dendrobium



Media MS



MS + Arang Aktif 0,5 g/l



MS + Arang Aktif 1 g/l



MS + A.A 1,5 g/l



MS + AA 2 g/l



MS + AA 3 g/l

Penggunaan air kelapa pada kultur in vitro juga dapat memacu terbentuknya anakan pada nenas in vitro, namun konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menghambat pembentukan tunas anakan.



MS



MS + Air Kelapa (AK) 5 %



MS + A K 10 %

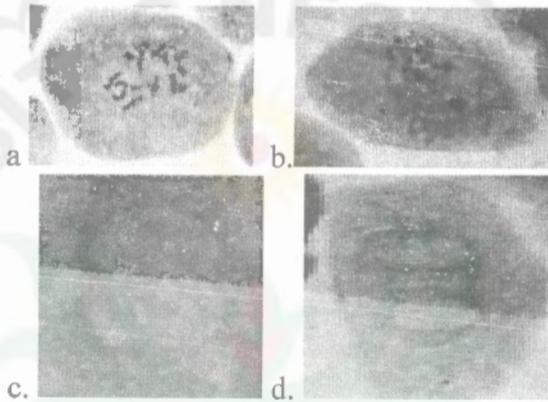


MS + A K 15 %

Pada media MS, tanaman nenas tumbuh seperti biasa, tunas/anakan tidak terlalu banyak. Pada media MS + Air Kelapa 5%, tunas/anakan yang tumbuh terlalu rapat. Pada media MS + air kelapa 10%, pertumbuhan tunas lebih banyak dan lebih segar. Dan pada media MS + air kelapa 15%, tidak dijumpai adanya tunas/anakan sama sekali dan pertumbuhan nenas juga kurang baik.

3. Memanipulasi jumlah kromosom, dengan zat kimia seperti kolkhisin, asenaphthen atau menggunakan jaringan endosperm ($3n$), dan lainnya. Harahap (1994), mendapatkan jumlah kromosom kacang hijau dari 23

menjadi 46 kromosom dengan menggunakan larutan kolkhisin, juga ditemukan sel-sel yang memiliki dua inti, pembesaran inti dan lain-lain. Harahap (1998), juga menemukan penggandaan jumlah kromosom akar bawang merah akibat perlakuan kolkhisin dengan dosis tertentu.



a. Sel kacang hijau dengan jumlah kromosom=23,
 b. kromosom mengalami kelipatan,
 c.d. sel menuju pembelahan

4. Mendapatkan tanaman haploid dan double haploid melalui kultur anther. Iswari (2000) mendapatkan tanaman padi haploid yang berasal dari anther padi. Suharsono dan Muswita (2004) mendapatkan tanaman cabe haploid yang berasal dari anther cabe.
5. Polinasi yang dilakukan secara *in vitro*, untuk mengatasi embrio-embrio yang secara normal sering mengalami gugur (abortif).
6. Mendapatkan tanaman yang memiliki variasi somaklonal, dengan menggunakan zat pengatur tumbuh atau perlakuan fisik. Harahap (2005a) dengan menggunakan teknik induksi mutasi dengan radiasi sinar gamma mampu meningkatkan variasi genetik tanaman manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan telah dilakukan analisis perubahan / pertumbuhan (Harahap, 2003 ; 2005a) serta telah didapat lethal dosis 50 % (Harahap, 2005b), analisis perubahan genetik yang dianalisis dengan penanda isozim (Harahap, 2005a ; Harahap, 2006b), respon pertumbuhan, perubahan morfologi, perubahan histologi, Harahap, 2006c, 2006d).
7. Fusi Protoplas, yang bersifat intraspesifik ataupun interspesifik. Purwito (1999), mendapatkan tanaman kentang yang beragam hasil perlakuan fusi protoplas dengan menggunakan PEG dan elektrofusi.

8. Sebagai alat untuk Bioteknologi dalam transfer gen-gen tertentu. Kultur jaringan sangat mutlak dibutuhkan, karena dalam setiap transfer gen tertentu, maka mau tidak mau harus melibatkan tahapan kultur jaringan karena pelaksanaan hampir seluruh kegiatan transfer gen semuanya diintegrasikan ke jaringan/ sel tanaman, setelah itu dilakukan pengamatan apakah gen yang ditransfer terintegrasi ke jaringan tanaman tersebut dan selanjutnya bagaimana ekspresi gen tertentu tersebut pada jaringan tanaman itu.

Dalam pelaksanaan metode kultur jaringan syarat-syarat tertentu harus dipenuhi. Syarat pokok adalah laboratorium dengan segala sarana dan prasarana serta fasilitasnya. Laboratorium harus menyediakan alat-alat kerja, seperti autoklav, laminar air flow cabinet, kompor, panci-panci, meja, botol-botol, alat alat tanam dan lain-lain. Kondisi yang tercipta harus aseptik, sarana pendukung lainnya seperti air, listrik dan bahan bakar minyak atau gas harus *ready stock*.

Untuk melaksanakan tehnik kultur jaringan ini, para pelaksananya harus memiliki latar belakang ilmu – ilmu dasar tertentu seperti botani, fisiologi tumbuhan, kimia dan fisika. Untuk penelitian yang berafiliasi kearah terapan, dibutuhkan pengetahuan ilmu ilmu lainnya, seperti biokimia, mikrobiologi, sitologi, histologi, bioteknologi (Suryowinoto, 1994). Para peneliti yang berkecimpung dibidang ini dituntut memiliki ketekunan dan kesabaran yang tinggi serta dapat bekerja secara serius dan intensif.

Perbanyak dengan menggunakan tehnik kultur jaringan, sangat diperlukan pada tanaman-tanaman yang (Gunawan 1992, Wattimena 2000, Harahap, 2008):

1. Memiliki persentase perkecambahan biji sangat rendah. Dengan bantuan ZPT tertentu hal ini dapat diatasi.
2. Tanaman hibrida yang berasal dari tetua yang tidak steril
3. Hibrida - hibrida yang unik. Hibrida ini merupakan sumber daya genetik untuk kelengkapan koleksi sumber plasma nutfah.
4. Tanaman langka, dilakukan perbanyak normal dengan kultur sel, kalus, tunas atau dengan mengkombinasikan perlakuan dengan batang bawah dari tanaman lain yang memiliki kecepatan tumbuh jauh lebih cepat sehingga memungkinkan diperoleh percepatan pelestarian pohon unik dan langka tersebut
5. Tanaman yang diperbanyak dengan cara vegetatif, seperti pisang, kentang, strobery, krisan, anggrek dll.

Keuntungan lain dari penggunaan tehnik ini adalah, didapatkannya tanaman dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat, beberapa peneliti telah mendapatkan hasil yang berbeda secara significant dengan menggunakan tehnik ini, didapatkan jumlah tanaman yang beribu –ribu, dimana jumlah sedemikian tidak mungkin dapat dicapai dengan perbanyakan secara konvensional.

Hanya saja dengan tehnik ini terdapat juga faktor pembatas seperti, tenaga kerja, fasilitas yang terbatas, dan terdapatnya kontaminasi. Dalam pelaksanaan metode kultur jaringan ini, semua kegiatan dilakukan di dalam laboratorium sehingga sangat diperlukan sterilitas yang tinggi.

Seleksi tanaman merupakan kegiatan pertanian yang telah ada sejak manusia mulai mengadakan budidaya pada tanaman. Seleksi tanaman dengan segala tujuannya (mengeliminir penyakit, meningkatkan hasil, variasi somaklonal, transfer gen tertentu dan lain-lain) jika dilakukan secara konvensional, memerlukan jumlah tanaman yang sangat banyak, lahan yang luas, memerlukan pemeliharaan yang intensif dan memerlukan waktu yang lama.

Namun dengan adanya kultur jaringan ini, diperoleh tanaman yang memiliki sifat sesuai keinginan kita, misalnya bebas penyakit, mempunyai hasil tinggi, bervariasi secara genetik, dapat kita hasilkan dalam waktu yang lebih singkat.

Walaupun banyak tanaman dapat diregenerasikan namun masih banyak tanaman, terutama tanaman tropik, belum sepenuhnya dapat dimengerti mekanisme regenerasinya sehingga masih ada kendala dalam regenerasinya dan sampai saat ini masih terus dilakukan penelitian untuk hal ini, dengan berdasar pada percobaan terdahulu yang memberi latar belakang yang sistematis untuk pemecahan masalah.

Beberapa teknik Kultur Jaringan yang sudah kita kenal saat ini adalah:

1. Kultur Organ (Organ Culture) : Kultur yang menggunakan sumber eksplan adalah organ tanaman, seperti: akar, batang, daun, pucuk, tunas aksilar, aksilar, embrio.
2. Kultur Kalus (Callus Culture) : kalus adalah kumpulan sel yang *a morf*, kumpulan sel yang belum berdiferensiasi lanjut. Kultur kalus merupakan kultur yang terdiri dari sel-sel yang belum terorganisir, terdiri dari sel dan jaringan parenkim.
3. Kultur Suspensi sel (Suspension Culture) : Kultur sel bebas atau kumpulan sel yang ditempatkan pada media cair, dan dishaker (digojok) dengan kecepatan tertentu. Eksplan awal untuk kultur sel biasanya adalah kalus.
4. Kultur protoplasma : Kultur yang memperlakukan eksplan dengan enzim tertentu sehingga dihasilkan sel tunggal yang tidak memiliki dinding sel.

Untuk keperluan hibridisasi somatik, maka difusikan dua macam protoplas intraspesifik ataupun interspesifik

5. Kultur Anther : yaitu kultur yang berasal dari anther sebagai sumber eksplan (alat reproduktif) tanaman.
6. Kultur Ovul : yaitu kultur yang berasal dari ovul sebagai sumber eksplan (alat reproduktif) tanaman.
7. Kultur embrio. Kultur yang sumber eksplannya adalah embrio tanaman.
8. Dan lain lain

Seleksi tanaman merupakan kegiatan pertanian yang telah ada sejak manusia mulai mengadakan budidaya pada tanaman. Seleksi tanaman dengan segala tujuannya (untuk mengeliminir penyakit, meningkatkan hasil, variasi somaklonal, transfer gen tertentu dan lain-lain) jika dilakukan secara konvensional, memerlukan jumlah tanaman yang sangat banyak, lahan yang luas, memerlukan pemeliharaan yang intensif dan memerlukan waktu yang lama.

Namun dengan adanya kultur jaringan ini, diperoleh tanaman yang memiliki sifat sesuai keinginan kita, misalnya bebas penyakit, mempunyai hasil tinggi, bervariasi secara genetik, dapat kita hasilkan dalam waktu yang lebih singkat.

Pertanyaan:

1. Istilah Tissue Culture biasa diartikan sebagai kultur jaringan. Dimana kultur jaringan ialah :
 - a. Menghasilkan tanaman baru yang berbeda dengan induknya
 - b. Membudidayakan tanaman yang masih kecil
 - c. Budidaya jaringan/sel tanaman menjadi tanaman utuh yang kecil yang mempunyai sifat yang sama dengan induknya
 - d. Budidaya sel dan jaringan baru yang dihasilkan dari tanaman yang hampir punah tetapi ada perbedaan sifat yang dihasilkan(kunci jawaban : C, tipe soal C₂)
2. Contoh kultur yang menggunakan bahan eksplan dari lapang untuk inisiasi disebut dengan :
 - a. Kultur kalus
 - b. Kultur organ
 - c. Kultur haploid
 - d. Kultur protoplasma(kunci jawaban : B, tipe soal C₁)

3. Banyak hal dapat dilakukan dengan menggunakan teknik kultur jaringan antara lain kecuali :
- Membuat perbanyakkan tanaman
 - Memacu pertumbuhan
 - Memanipulasi jumlah kromosom, dengan zat kimia
 - Tidak mempercepat tanaman dalam pertumbuhan dan perkembangan
- (Kunci jawaban : D, tipe soal C₂)

Test Essay:

- Kultur jaringan merupakan terjemahan dari **Tissue culture**. **Tuliskan pengertiannya.**
- Mengapa perbanyakkan dengan menggunakan tehnik kultur jaringan sangat diperlukan pada tanaman ?
- Dengan menggunakan tehnik kultur jaringan, banyak hal dapat dilakukan, tuliskan minimal 5 hal yang dapat dilakukan dengan tehnik ini.

GLOSARIUM

Kultur jaringan:

Budidaya jaringan/sel tanaman menjadi tanaman utuh yang kecil yang mempunyai sifat yang sama dengan induknya

In vitro:

Dari bahasa Latin, berarti "di dalam kaca" adalah istilah yang dipakai dalam biologi untuk menyebutkan kultur suatu sel, jaringan, atau bagian organ tertentu di dalam laboratorium

Totipotensi:

Kemampuan total suatu sel untuk dapat meregenerasikan dirinya menjadi individu/tanaman utuh jika ditempatkan pada media dan kondisi yang tepat

Ploripotensi:

Sel-sel yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel dalam tubuh, namun tidak dapat membentuk suatu organisme baru

Kloning:

Proses menghasilkan individu-individu dari jenis yang sama (populasi) yang identik secara genetik

Sel germinal:

Sel kelamin, yaitu sel kelamin betina dan sel kelamin jantan

Sel somatik:

Semua jenis sel yang membentuk suatu organisme, kecuali sel gamet organisme tersebut

Regenerasi:

Menumbuhkan kembali bagian tubuh yang rusak atau lepas

Meristematis:

Jaringan yang sel-selnya selalu membelah serta belum berdiferensiasi

Embrio:

Hasil peleburan sel kelamin jantan dan betina, misal: eukariota diploid multisel dalam tahap paling awal dari perkembangan.

Protoplas:

Sel (tanaman) yang telah kehilangan dinding selnya

Enzim:

Biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia organik

Selulase:

Nama bagi semua enzim yang memutuskan ikatan glikosidik beta-1,4 di dalam selulosa, sedodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya

Pektinase:

Enzim yang digunakan dalam proses degradasi molekul pektin (sejenis kompleks polisakarida)

Metabolit sekunder:

Senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme tersebut dan ditemukan dalam bentuk yang unik atau berbeda-beda antara spesies yang satu dan lainnya

Kromosom:

Struktur di dalam sel berupa deret panjang molekul DNA dan berbagai protein terkait seperti histon dan faktor transkripsi yang terdapat pada beberapa deret, yang merupakan informasi genetik suatu organisme.

Kolkhisin:

Alkaloid toksik dan karsinogenik yang diperoleh dari ekstrak tumbuhan Colchicum autumnale dan beberapa anggota suku Colchicaceae lainnya

Asenaphthen:

Hidrokarbon polisiklik aromatik (PAH) yang terdiri dari naftalena dengan etilen

Endosperm:

Jaringan yang diproduksi di dalam biji oleh tanaman berbunga setelah pembuahan. Jaringan ini mengelilingi embrio dan memberikan nutrisi dalam bentuk pati atau dapat berisi minyak dan protein

Haploid:

Kondisi (individu) dengan separuh jumlah genom sel normal (sel somatiknya); biasa dilambangkan dengan $x = n$.

Polinasi:

Jatuhnya serbuk sari pada permukaan putik (kepala putik).

Variasi genetik:

Variasi yang terjadi pada bahan genetik, umumnya terekspresi pada fenotif

Histologi:

Bidang biologi yang mempelajari tentang struktur jaringan secara detail menggunakan mikroskop pada sediaan jaringan yang dipotong tipis.

Isozim:

Variasi yang terjadi pada bagian enzim yang tidak aktif (yang terjadi biasanya perubahan pada daya kerja enzim) tetapi enzim masih tetap berfungsi.