

BAB V

PEMULIAAN TANAMAN SECARA IN VITRO

Kompetensi Dasar :

1. Mampu menerapkan prinsip kultur jaringan pada seleksi jaringan, transfer eksplan, inkubasi dan aklimatisasi.
2. Mampu menulis "Critical book report" untuk 3 bab tpik kultur jaringan (kultur sel, kultur kalus; tanaman haploid; kultur protoplasma), dengan kriteria tertentu.
3. Mampu mendesain "mini research" untuk memperbanyak tanaman melalui kultur jaringan.

Penyediaan bibit untuk mengembangkan suatu tanaman atau untuk skala produksi merupakan salah satu aspek dan tahapan yang sangat penting. Untuk perkebunan, akan memerlukan bibit dalam jumlah yang sangat besar, seragam, varietas unggul, bebas hama dan penyakit serta ketersediaannya harus *continue*.

Beberapa tanaman hortikultura, tanaman berkayu, tanaman pangan banyak yang sulit diperbanyak dengan konvensional baik secara generatif ataupun vegetatif. Contohnya adalah tanaman manggis, untuk penyediaan bibit sampai saat ini masih terkendala, karena jumlah bijinya yang sedikit serta pertumbuhannya yang lambat hingga mencapai umur 10 tahun baru dapat berbuah. Teknik kultur jaringan sampai saat ini masih terus mencari alternatif untuk memecahkan persoalan ini.

Dengan berkembangnya teknik *in - vitro* ini, beberapa kendala dalam memperbanyak tanaman/ penyediaan bibit untuk beberapa jenis tanaman sudah dapat di atasi.

Jenis tanaman yang diperbanyak dengan teknik kultur jaringan terutama bertujuan untuk pemecahan masalah seperti : rendahnya perkecambahan biji,

tanaman-tanaman hibrida yang tetua jantannya steril, tanaman langka, tanaman yang diperbanyak secara vegetatif.

Dinegara maju seperti Amerika, Jepang, negara Eropa, teknik kultur jaringan sudah berkembang pesat, tidak hanya untuk memperbanyak, tetapi juga untuk tujuan:

1. Mendapatkan tanaman-tanaman bebas penyakit, terutama virus, jamur, bakteri.
2. Memproduksi senyawa metabolit sekunder.
3. Perbaikan tanaman melalui :
 - Manipulasi jumlah kromosom
 - Polinasi invitro
 - Penyelamatan embrio
 - Pembuatan tanaman haploid melalui kultur anther dan kultur ovul
 - Pembuatan tanaman hibrida somatik melalui fusi protoplas intraspesifik dan interspesifik
 - Transfer DNA/ gen/ organel untuk sifat yang dikehendaki
 - Mendapatkan tanaman yang memiliki variasi somaklonal.
4. Pelestarian plasma nutfah

A. Perbanyak Tanaman (Organogenesis) :

Eksplan yang ditanam pada media yang tepat, akan dapat beregenerasi dengan proses yang disebut organogenesis yaitu proses terbentuknya organ-organ, seperti: pucuk dan akar. Namun terdapat istilah tunas adventif: yaitu tunas yang terbentuk tidak pada tempatnya.

Bagian tanaman sebagai sumber eksplan seperti kotiledon, hipokotil, dan kalus, banyak digunakan dalam studi morfogenesis untuk menghasilkan sejumlah planlet. Ilmu fisiologi dan biokimia sangat diperlukan untuk mempelajari morfogenesis. Morfogenesis dari embrio somatik sangat pesat diteliti sejak tahun 1980 an. Dicatat ada 130 spesies dan berhasil menunjukkan sel bipolar, khususnya pada tanaman Cereal, rumput-rumputan, legum dan conifer.

Organogenesis dan embriogenesis tanaman sangat tergantung pada kemampuan sel tersebut dalam beregenerasi. Peneliti-peneliti terdahulu memulai penelitian dan mengalami kegagalan dalam meregenerasikan suatu jaringan menjadi tanaman.

Keterbatasan pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh menjadi hambatannya.

Setelah ditemukan bahwa Auksin dan Sitokinin serta zat pengatur tumbuh lainnya, sangat berperan dalam proses diferensiasi sel menjadi organ tertentu, maka kendala untuk organogenesis dan embriogenesis tanaman dapat dieliminir.

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.

1. Kultur Pucuk

Perbanyak tanaman melalui kultur pucuk telah banyak dilakukan pada laboratorium kultur jaringan komersial. Ada 2 cara yang dapat dilakukan untuk kultur pucuk yaitu:

- Melalui kultur pucuk (Shoot tip culture).
- Melalui kultur mata tunas (single node culture):

Tujuan dari kultur pucuk adalah untuk perbanyak secara vegetatif pada tanaman. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah ujung tunas lateral, atau terminal dengan ukuran kira-kira 20 mm. Pengaruh dominansi apikal dapat dihilangkan dengan menggunakan ZPT terutama Sitokinin kedalam medium, yang akan menghasilkan jumlah tunas yang banyak. Ukuran pucuk mempengaruhi keberhasilan kultur ini, pucuk berukuran lebih besar lebih cepat berkembang dan lebih tahan sehingga lebih banyak menghasilkan tunas aksilar.

Robbins pada tahun 1922 merupakan orang pertama yang melakukan kultur pucuk, setelah itu perkembangannya lambat. Baru tahun 1970-an banyak dipublikasikan hasil penelitian dengan menggunakan teknik ini.

Faktor penyebab digunakannya teknik kultur pucuk untuk tujuan komersial adalah:

1. Metode kultur pucuk dapat diterapkan pada berbagai jenis tanaman dengan menggunakan prinsip yang sama.
2. Memungkinkan untuk mendapatkan / mengontrol tunas yang dihasilkan adalah bebas virus.
3. Tanaman yang dihasilkan secara genetik seragam dan *true to type*
4. Pada banyak tanaman, memiliki laju perbanyak yang tinggi

Pada kultur pucuk, eksplan yang digunakan adalah pucuk apikal atau lateral yang mengandung jaringan meristematis. Pada kultur pucuk, banyak digunakan medium dengan konsentrasi sitokinin tinggi untuk mendorong pembentukan tunas aksilar.

Teknik kultur mata tunas lebih menguntungkan untuk diterapkan jika mempunyai tujuan mengeliminir perubahan genetik, namun laju multiplikasinya lebih rendah dibanding dengan kultur pucuk. Untuk perbanyak kentang skala besar dalam rangka mendapatkan kentang bebas fusarium, kultur ini sudah diterapkan di PAU IPB (Wattimena, 2000).

Eksplan untuk kultur mata tunas adalah mata tunas aksilar dari kecambah atau tanaman dewasa. Media yang digunakan hampir sama dengan kultur pucuk, sering ditambahkan giberellin untuk pemanjangan tunas untuk mempermudah pemisahan tunas - tunas yang terbentuk. Teknik ini banyak digunakan pada tanaman: krisan, daun dewa, kentang.



Gambar pucuk tanaman gaharu *in vitro* ini dapat digunakan sebagai sumber eksplan baru

2. Embriogenesis

Embriogenesis adalah proses terbentuknya embrio somatik. Embrio somatik adalah embrio yang bukan berasal dari zigot, tetapi berasal dari sel biasa dari jaringan tanaman. Jika embrio terbentuk dari kultur anther atau mikrospora, maka prosesnya disebut: androgenesis. Embrio yang berasal dari ovarium yang belum dibuahi disebut gynogenesis. Tanaman lengkap yang berasal dari regenerasi pada teknik kultur jaringan disebut planlet.

Norstog (1979) menyimpulkan bahwa pada proses embriogenesis somatik selalu didahului oleh pembentukan kumpulan sel yang belum terdiferensiasi, seperti protocorm dan dari protocorm kemudian terbentuk proembryonic bud.

Biji - biji angrek (seperti tanaman saprofit atau semi parasit) mengandung

embrio yang berdiameter kira - kira 0,1 mm, tidak mengandung endosperm atau kotiledon. Saat berkecambah, embrio ini akan membentuk protocorm (struktur seperti corm) yang berwarna hijau dan mampu berfotosintesis, tunas dan akar baru akan terbentuk jika senyawa - senyawa organik di dalam protocorm cukup.

Kemampuan untuk membentuk embrio aseksual dari jaringan ovular tanpa terjadinya fusi sel atau inti, dikenal sebagai apomiksis atau embrio somatik.

Pembentukan embrio somatik dapat berasal dari: sel - sel somatik diploid didalam kantung embrio (apospori), sel - sel nusellus (nucellar embryoni), sel somatik yang berasal dari eksplan yang dikulturkan.

Secara *in - vitro*, embrio somatik dapat terjadi dari sel - sel somatik yang berasal dari eksplan yang dikulturkan.

Embrio somatik yang dihasilkan secara *in - vitro* dapat berasal dari:

- Kultur anther
- Kultur suspensi
- Kultur kalus

Kultur kalus umumnya dapat dihasilkan pada media padat dengan penambahan ZPT 2,4 D. Untuk perkembangan kalus menjadi embriogenik, tidak diperlukan auksin, karena akan mengganggu morfogenesis. Suspensi sel embriogenik pada umumnya di inisiasi dari kalus embriogenik yang dikulturkan dalam medium cair.

Pembentukan embrio somatik yang berasal dari kalus dan kultur suspensi sel, telah banyak dilakukan. Kalus yang berasal dari inisiasi awal lebih mampu beregenerasi membentuk embrio somatik dibanding kalus hasil sub - kultur.

3. Kultur Embrio

Kultur embrio adalah memisahkan embrio yang belum dewasa / dewasa secara steril dan menumbuhkannya secara *in - vitro*, dengan maksud memperoleh tanaman yang viabel. Penelitian tentang kultur embrio dimulai oleh Hanning pada tahun 1904 dengan menggunakan tanaman Rapanus. Embrio yang dipisahkan dari bakal biji dalam berbagai tingkat perkembangan membutuhkan makanan yang optimal untuk pertumbuhannya.

Berdasar makanan yang dibutuhkan selama perkembangan, fase perkembangan embrio dibedakan atas:

1. Fase heterotrofik: bentuk embrio dalam fase akhir ini berbentuk bulat dan sangat tergantung pada endosperm sebagai sumber makanan.
2. Fase autotrofik: bentuk embrio dalam fase akhir ini berbentuk hati, embrio tidak tergantung lagi pada makanannya.

Pada prinsipnya ada 2 tipe kultur embrio:

1. Kultur embrio muda (*immature embryo*) berasal dari biji yang belum masak. Tipe ini digunakan untuk menghindari keguguran (*abortive*) embrio, hingga dihasilkan tanaman yang viabel. Tipe ini sangat sulit, terkait dengan cara pengirisan sumber eksplan dan nutrisi yang dibutuhkan. Sudarsono (2003), menggunakan sumber eksplan embrio kedelai muda untuk penelitian mencari kedelai tahan kering, Armini (2011), menggunakan embrio muda kelapa sawit untuk program *breeding* lanjutan
2. Kultur embrio dewasa, berasal dari biji yang masak. Tipe ini relatif mudah, penggunaan medium sederhana dengan mineral-mineral pada umumnya.

Faktor-faktor yang menentukan keberhasilan kultur embrio:

1. Genotip. Perbedaan kultivar, menyebabkan timbulnya embrio yang mudah dan sukar dikulturkan.
2. Tingkat perkembangan embrio. Embrio yang masih kecil lebih sulit dikulturkan dibanding dengan embrio yang sudah berkembang.
3. Kondisi pertumbuhan tanaman induk. Tanaman induk yang terkontrol biasanya menghasilkan sumber embrio yang lebih baik.
4. Komposisi media. Komposisi media untuk embrio awal dan dewasa sangat berbeda.
5. Oksigen, cahaya, temperatur.

Kegunaan kultur embrio:

1. Memperpendek siklus *breeding*
2. Uji kecepatan viabilitas biji
3. Untuk memperbanyak tanaman langka
4. Memperoleh hibrid yang langka

4. Kultur Meristem dan Mericlone

Kultur meristem adalah kultur yang menggunakan eksplan yang berasal dari jaringan meristem, biasanya diperoleh dari meristem apikal atau meristem tunas aksilar. Pada ujung pucuk, jaringan ini berada dibagian dalam, oleh karena

itu, untuk mengambil jaringan ini agar dapat digunakan sebagai eksplan, kita membutuhkan mikroskop.

Jadi pada setiap pengambilan sampel, terlebih dahulu dilakukan pengirisan bagian pucuk secara transversal, lalu jaringan meristem yang tertutupi oleh primordia daun akan dapat diambil, semua kegiatan ini dilakukan dibawah mikroskop.

Aplikasi kultur meristem ini adalah untuk: mengeliminir penyakit, terutama virus, karena jaringannya jauh berada dibagian dalam, sehingga penetrasi penyakit diharapkan belum menjauuhkan jaringan ini, penyimpanan plasma nutfah bebas virus

Kultur meristem telah banyak diterapkan pada berbagai tanaman. Pada anggrek cymbidium, ternyata dengan teknik ini dapat dihasilkan kelipatan jumlah planlet di banding kultur lainnya. Tanaman yang dihasilkan dari kultur meristem ini berasal dari jaringan vegetatif, sehingga planlet yang dihasilkan berupa klon (seragam).

Untuk pelaksanaan perbanyakan mikro dengan teknik kultur jaringan ini, apabila kita menggunakan eksplannya adalah daerah meristem pucuk (yaitu bagian ujung dari pucuk, dimana jaringannya terdapat dibagian dalam dan banyak dilapisi oleh jaringan- jaringan primordial yang nantinya akan membentuk tunas dan daun) yang berukuran sangat kecil ($\pm 0,2$ mm), dan dalam pelaksanaannya digunakan perlakuan pemberian zat kimia untuk membunuh penyakit, maka hasil yang diperoleh kemungkinan besar adalah bebas patogen.

Tanaman yang dihasilkan dari kultur meristem disebut meriklon (mericlone). Saat ini sudah banyak beredar anggrek meriklon terutama, Vanda dan Cymbidium, karena harganya yang cukup mahal. Namun sayangnya anggrek-anggrek tersebut adalah hasil import dari negara Taiwan. Tanaman meriklon lainnya adalah kedelai, kentang, anyelir, capsella.

Melalui kultur meristem, jaringan meristem sebagai sumber eksplan dapat langsung diregenerasikan untuk membentuk tunas dengan subkultur berulang dan menggunakan variasi ZPT, atau melalui fase kalus terlebih dahulu, seperti yang telah dilakukan ahli kultur jaringan Morel, yang memperoleh meristem pucuk anggrek yang bebas virus, kemudian dikulturkan membentuk kalus, kemudian dikulturkan untuk membentuk protocorm dan akhirnya dikulturkan untuk berdiferensiasi lebih lanjut guna membentuk tunas dan akar.

5. Kultur Akar

Untuk pembuatan kultur akar, pertama yang harus dilakukan adalah

mengisolasi akar dan menumbuhkannya dalam media cair kemudian di shaker (digojok) dengan kecepatan tertentu. Media yang diberikan adalah umumnya medium dasar (umumnya medium White) dengan penambahan garam-garam mineral yang sedikit berlebih seperti yodium dan besi, namun tergantung dari jenis tanamannya.

Penambahan ZPT umumnya adalah auksin, karena untuk menginduksi terbentuknya akar, sitokinin tidak dibutuhkan didalam kultur akar ini. Banyak keberhasilan kultur akar yang telah diperoleh, namun spesies yang berbeda memiliki respon yang berbeda dalam kultur ini.

Kultur akar saat ini yang dikembangkan adalah kultur akar berambut (hairy root). Kultur akar berambut diperoleh dengan menginokulasikan suspensi bakteri *Agrobacterium rhizogenes* pada bagian tanaman yang dilukai (pembahasan lebih lanjut pada produksi metabolit sekunder)

B. Kultur Protoplas dan Fusi Protoplas

Protoplas adalah sel dalam keadaan telanjang. Fusi protoplas (yang terjadi didalam sel tanpa campur tangan manusia) adalah proses alamiah yang terjadi pada tumbuhan rendah sampai tingkat tinggi. Pada proses pembuahan terjadi penyatuan gamet jantan (sub protoplas) dengan gamet betina (protoplas) menjadi zigot (hibrida seksual). Sel-sel tanaman tingkat tinggi berhubungan satu dengan lainnya melalui plasmodesmata, hubungan sel melalui plasmodesmata ini merupakan fusi protoplas dengan protoplas tetapi terjadi secara alamiah.

Modifikasi genetik dengan fusi protoplas bertujuan untuk:

1. Mengatasi masalah Incompatibilitas
2. Mengatasi masalah Sterilitas
3. Mendapatkan sifat yang diinginkan
4. Melakukan fusi sel guna menghasilkan hibrida somatik
5. Mendapatkan tanaman bebas virus, penyakit.
6. Mendapatkan tanaman dengan variasi somaklonal yang baik

Protoplas dapat diisolasi **secara mekanik** dengan menggunakan prinsip proses plasmolisis sel, juga dapat diisolasi **secara enzimatik**. Umumnya saat ini digunakan cara terakhir ini. Enzim-enzim yang digunakan untuk mengisolasi protoplas antara lain: selulase, driselase, zymolase, pectiolyase, pectinase, hemisellulase, maserase.

Sumber protoplas yang umum untuk diisolasi adalah: daun (paling

sering digunakan), pucuk, buah, akar, nodul akar. Jaringan mesofil daun (diutamakan berasal dari *in-vitro*) yang paling mudah diisolasi karena susunannya yang jarang sehingga penetrasi enzim lebih cepat.

Seluruh rangkaian isolasi protoplas, menuntut sterilitas lebih tinggi dibanding dengan kultur *in-vitro* biasa, hal ini dikarenakan kita bekerja dengan sel telanjang. Media untuk mengkulturkan protoplas maupun hasil fusi protoplas umumnya adalah media MS atau B5, dengan berbagai modifikasi garam mineral dan ZPT.

Osmotikum sangat dibutuhkan mulai dari proses isolasi, mengkulturkan hasil fusi protoplas, hingga terbentuk dinding sel. Larutan osmotikum biasanya digunakan mannitol dan sorbitol. Setelah dinding sel terbentuk maka harus diteteskan media tanpa mannitol atau sorbitol, untuk menurunkan tekanan osmotik. Jika tekanan osmotik tetap tinggi pembelahan dan regenerasi sel menjadi terhambat.

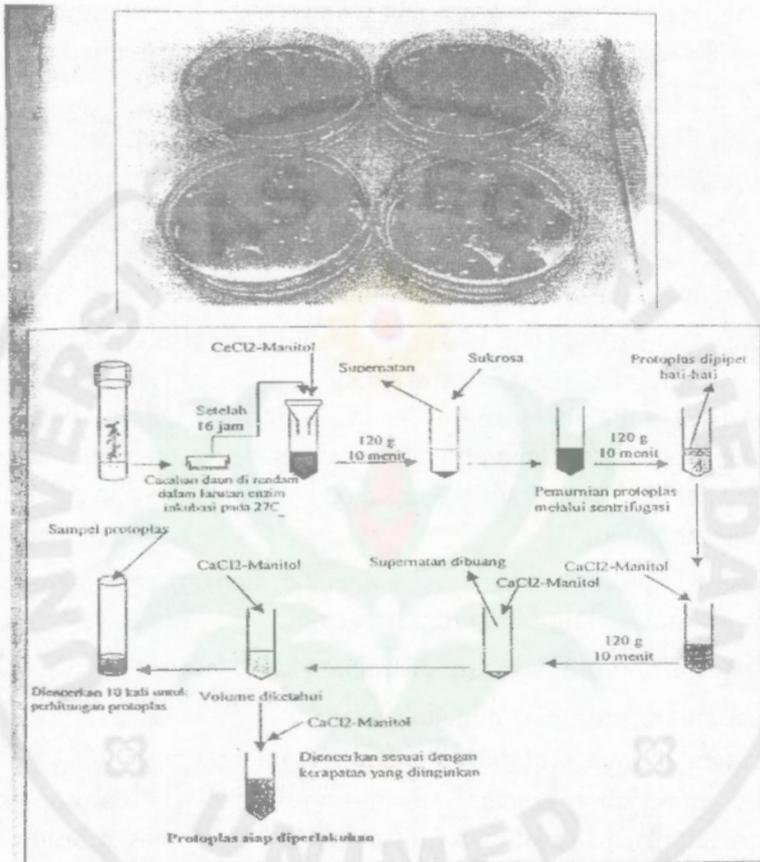
Fusi sel (protoplas) tanaman dilakukan dengan cara memfusikan 2 macam protoplas yang sama atau berbeda.

Teknik fusi protoplas yang dikembangkan saat ini :

- Fusi antara protoplas dengan protoplas
- Fusi antara sub protoplas dengan protoplas
- Fusi antara sub protoplas dengan sub protoplas. Sub protoplas terdiri dari: sitoplasma (protoplas tanpa inti), inti (karioplas, protoplas mini), kloroplas, mitokondria.

Pada gambar dibawah ini terlihat 1). Cacahan daun pada larutan enzim, untuk mendapatkan protoplas, 2). Tahapan isolasi protoplas. (atas kebaikan Bapak Dr. Agus Purwito, BDP IPB) :

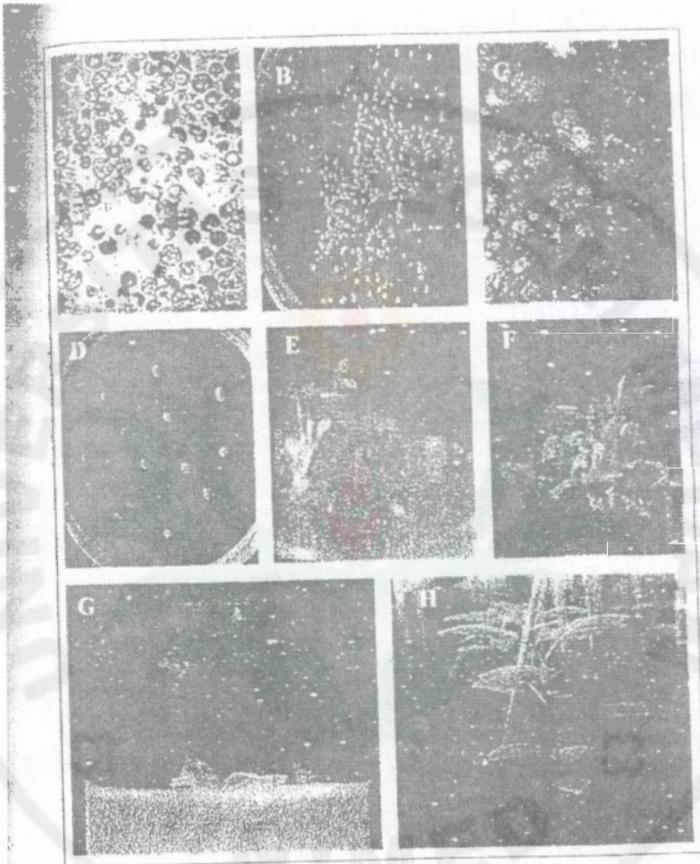
THE
Character Building
UNIVERSITY



Gambar: Tahapan isolasi protoplas

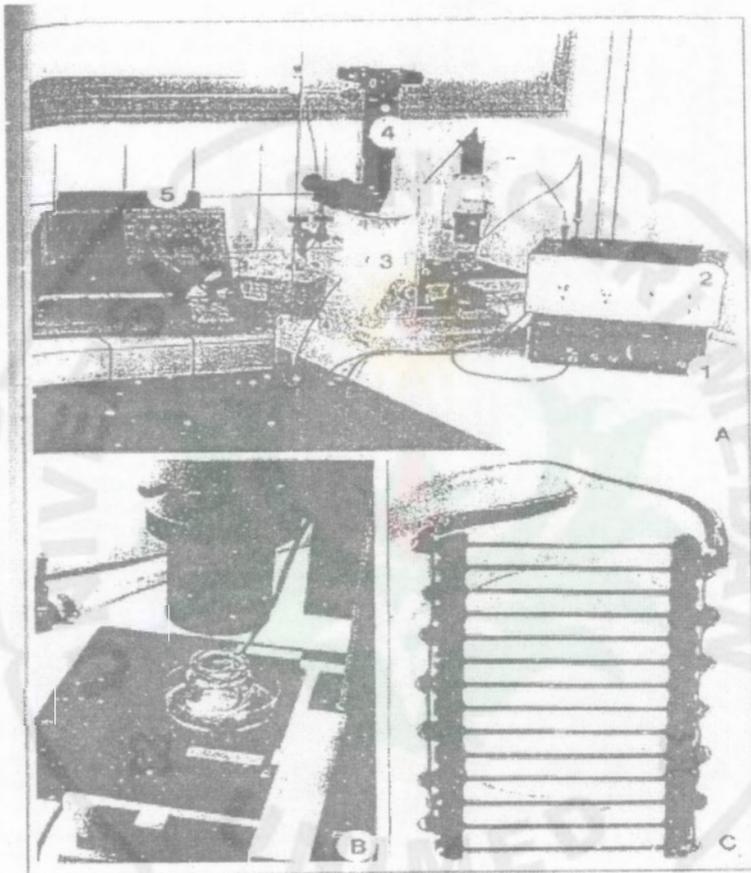
Berikut adalah proses isolasi, fusi, regenerasi menjadi tanaman (atas kebaikan Bapak Dr. Agus Purwito, BDP IPB) :



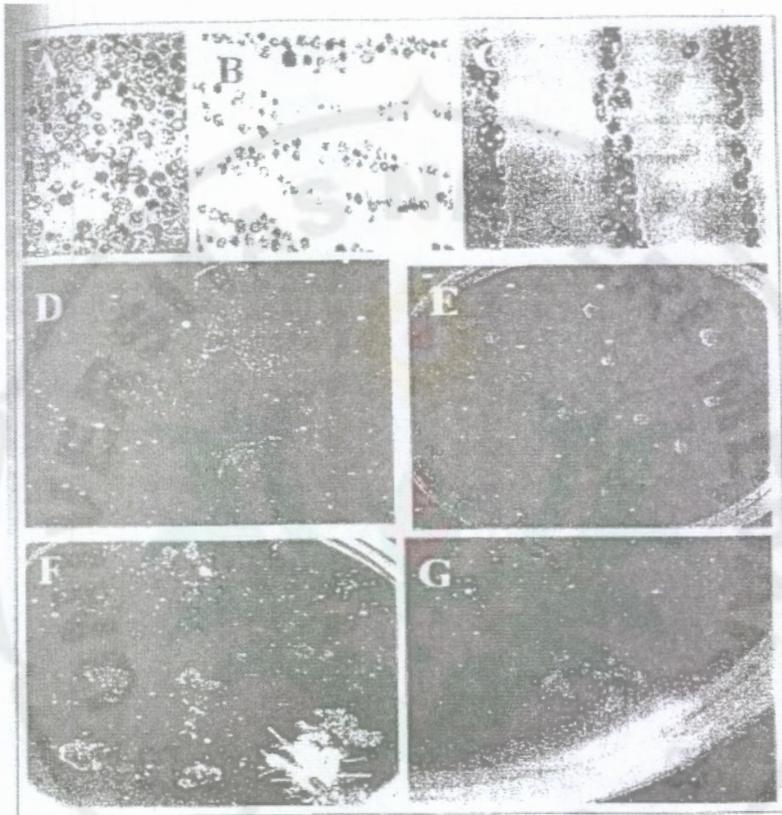


Gambar A= Protoplas segar beberapa saat setelah isolasi, B= Koloni-koloni sel (mikrokali) berumur 2 minggu setelah penaburan, C= mikrokali dalam pembesaran 10 kali, D= Mikrokali ditanam dalam medium regenerasi, E dan F= Regenerasi mikrokali menjadi tanaman, G= Regenerasi setelah dipindahkan dalam medium MS tanpa hormon, dan H= Aklimatisasi tanaman asal protoplas di polibag

Proses fusi protoplas dapat dilakukan secara kimia dan secara fisik dengan menggunakan alat elektrofusi. Dibawah ini adalah gambar peralatan elektrofusi protoplas (atas kebaikan Bapak Dr. Agus Purwito, BDP IPB) :



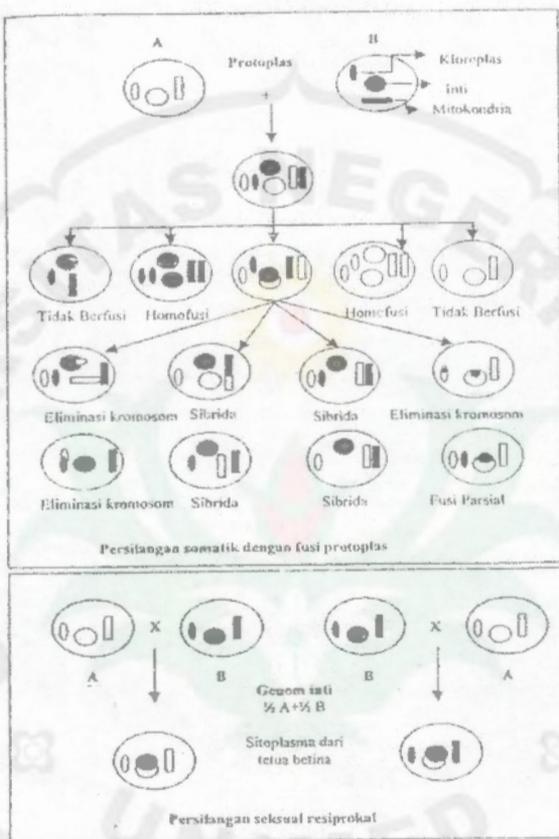
Gambar 1. Peralatan elektro fusi protoplas yang terdiri dari A1= Generator arus AC, A2= Generator arus DC, A3= Microskop inverted, A4= Kamera, A5=Osiloskop, B= Elektroda paralel dengan pemberat botol kecil yang diletakkan pada titik pandang mikroskop dan C= Elektroda paralel



Gambar Proses elektro fusi protoplas A. Protoplas segar hasil isolasi, B. Protoplas membentuk rantai akibat aplikasi arus AC, C. protoplas berfusi hasil aplikasi arus DC, D. Sel yang berasal dari protoplas yang sedang membelah, E. mikrocalli dalam medium regenerasi, F dan G. Regenerasi kalus menjadi tanaman

Proses elektrofusi protoplas (atas kebaikan Bapak Dr. Agus Purwito, BDP IPB):

THE
Character Building
UNIVERSITY



Gambar . Skema kemungkinan distribusi genom inti dan sitoplasmik pada sel hasil hibridisasi somatik dan hibridisasi seksual

Skema kemungkinan distribusi genom inti dan sitoplasmik pada sel hasil hibridisasi somatik dan hibridisasi seksual (atas kebaikan Bpk Dr. Agus Purwito, BDP IPB):

C. Kultur Sel dan Kultur Kalus

1. Kultur kalus

Pada awalnya kultur kalus bertujuan untuk mempelajari proses dediferensiasi dan diferensiasi sel dan jaringan pada kultur *in vitro* dan memperoleh kalus dari eksplan yang dikulturkan. Saat ini kultur kalus dan suspensi sel banyak dilakukan dalam penelitian untuk menghasilkan metabolit sekunder.

Kalus adalah kumpulan massa sel yang amorphus yang terdiri dari sel-sel / jaringan - jaringan yang membelah diri terus - menerus. Kalus tersusun oleh

sel-sel parenkim yang mana ikatannya dengan sel lainnya sangat renggang. Jaringan ini belum mengalami diferensiasi lanjut. Untuk menginduksi terbentuknya tunas, diperlukan media regenerasi, dengan modifikasi ZPT.

Kemampuan jaringan dalam membentuk kalus sangat terkait dengan:

- Umur fisiologi jaringan waktu isolasi dilakukan. Jaringan yang masih meristematis lebih mudah penanganannya dibanding jaringan yang sudah berdiferensiasi.
- Musim pada saat tanaman di isolasi.
- Jenis tanaman. Jenis tanaman berkayu seperti manggis sangat sulit untuk mendapatkan kalus yang variable.
- Bagian tanaman yang di isolasi, bagian yang sudah tua akan memerlukan modifikasi dengan merejuvenilisasikan selnya kembali

Medium yang digunakan untuk kultur kalus adalah medium dasar dengan modifikasi ZPT, umumnya digunakan auksin 2,4 - D, kadang - kadang digunakan bahan organik kompleks seperti sari pisang, air kelapa, yeast ekstrak.

Eksplan yang digunakan untuk menginduksi kalus adalah: batang, akar, daun, embrio, kotiledon dan lainnya. Eksplan awal ini kemudian ditempatkan pada media padat. Kalus yang tumbuh, harus disubkultur ke media baru dalam kurun waktu tertentu, agar ketersediaan hara dan airnya tetap ada dan mencegah terhambatnya pertumbuhan kalus akibat keluarnya senyawa-senyawa hasil metabolisme kalus tersebut.

Subkultur dapat dilakukan ke media yang sama atau media regenerasi. Hal ini tergantung kepada tujuan subkultur tersebut. Untuk tujuan menghasilkan senyawa / metabolit sekunder maka jangan menggunakan media regenerasi. Namun, sub-kultur yang berulang-ulang dengan sumber eksplan yang terdiri dari sel-sel yang heterogen dapat menyebabkan perubahan berupa:

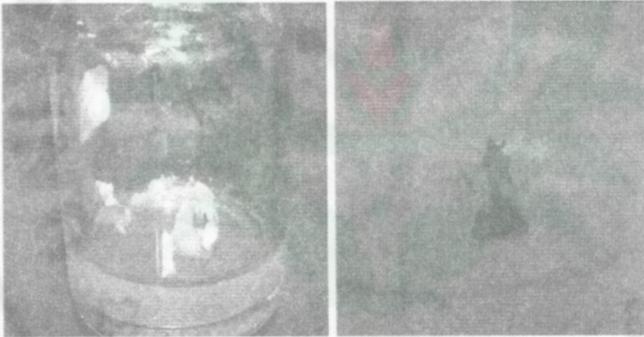
- Aberasi kromosom ; dapat terjadi pematihan kromosom, mengakibatkan terjadinya mutasi gen
- Poliploidi, yang disebabkan oleh pembelahan kromosom yang tidak diikuti dengan terbentuknya dinding sel anak, sehingga terjadi penggandaan jumlah kromosom.
- Delesi, Translokasi, Substitusi

Untuk melakukan praktek kultur kalus, dari pengalaman penulis menunjukkan, penempatan pada daerah gelap tanpa sinar akan lebih memacu pembentukan kalus. Hal ini dapat kita pahami bersama karena untuk proses pembentukan kalus, zat pengatur tumbuh yang sangat berperan adalah auksin. Auksin akan

sangat baik bekerja dengan kondisi gelap, sementara dengan adanya cahaya maka kerja auksin akan terganggu, sehingga kalus yang dihasilkan juga tidak baik kualitasnya.

Perlakuan membungkus dengan kain hitam pada tanaman yang akan diinduksi kalusnya, pada tanaman krisan menunjukkan respon yang sangat baik, dengan memperlihatkan kumpulan kalus yang terbetuk lebih banyak dibanding botol yang tidak dibungkus kain hitam.

Kalus yang baik adalah kalus yang variable dan mempunyai spot-spot hijau pada permukaan atasnya. Kalus yang padat akan sulit beregenerasi membentuk embriosomatik dan tunas.



Gambar a). Kalus yang berasal sumber eksplan daun bunga krisan. b). Kalus mampu beregenerasi membentuk embrio somatic dan tunas

2. Kultur sel

Kultur suspensi sangat berguna dalam penelitian metabolit primer maupun sekunder, juga untuk regulasi nitrogen di dalam organ dan asimilasi sulfur, metabolisme karbohidrat dan karbon fotosintetik. Namun kultur sel sulit dipakai untuk penelitian – penelitian path way (bio sintesis) senyawa tertentu.

Penelitian Skoog dan Miller (1957), mengenai keseimbangan hormon menjadi dasar penelitian selanjutnya, sampai pada penelitian mengenai transformasi dengan modifikasi menggunakan *Agrobacterium T - DNA*.

Kultur sel dilakukan dengan menggunakan eksplan adalah kalus. Kalus dipindahkan ke media cair untuk menginduksi sel-sel independen / inisiasi suspensi sel. Pada kultur sel ini juga harus dilakukan sub-kultur secara periodik, tergantung tujuannya, yaitu ke media yang sama / modifikasi untuk memperbanyak suspensi sel atau ke media regenerasi (media padat). Untuk regenerasi harus

didahulukan menginduksi munculnya tunas, setelah muncul tunas kemudian baru kemudian di induksi pembentukan akar.

Umumnya kultur sel digunakan untuk:

- Sumber protoplas
- Perlakuan dengan mutagen kimia, penyakit dan lain lain.
- Memproduksi metabolit sekunder
- Untuk keperluan seleksi *in-vitro* dalam pemuliaan tanaman.

Kultur sel terus berkembang terutama untuk melihat hubungan tanaman dengan mikroba, tidak hanya dalam pembentukan tunas tetapi juga dalam proses biokimia dan perkembangan virus, phytotoksin, resistensi penyakit

D. Kultur Anther

Kultur anter (*anther culture*) sering juga disebut kultur haploid. Jika serbuk sari yang digunakan sebagai sumber eksplan maka disebut kultur serbuk sari (*pollen culture*). Kultur serbuk sari ini lebih tepat disebut kultur haploid dibanding dengan kultur anter. Kultur haploid lain adalah kultur ovul, dimana sebagai sumber eksplannya adalah ovul. Kultur haploid adalah kultur yang menghasilkan tanaman haploid. Tanaman haploid adalah tanaman yang memiliki jumlah kromosom yang sama dengan jumlah kromosom gamet (N). Jadi tidak harus sama dengan kromosom dasar. Untuk tanaman diploid ($2N$), jumlah kromosom gamet (N) adalah sama dengan kromosom dasar, tetapi untuk tanaman tetraploid ($4N$) maka jumlah kromosom gamet adalah dua kali kromosom dasar ($N = 2X$). Dengan demikian istilah haploid pada tanaman tetraploid dibedakan atas dihaploid ($N = 2X$) dan monohaploid ($N = X$).

Keuntungan dari tanaman haploid adalah:

- Semua sifat ditampilkan dalam kondisi monohaploid, baik sifat dominan ataupun resesif.
- Seleksi pada level haploid jauh lebih mudah dibanding dengan level ploidi yang tinggi
- Penggandaan kromosom tanaman haploid akan menghasilkan tanaman dihaploid yang homozigot, penggandaan kromosom berikutnya akan menghasilkan tanaman tetraploid homozigot.
- Hibridisasi seksual dengan tanaman diploid akan menghasilkan tanaman triploid

- Dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman jantan super, yang sudah terlihat hasilnya misal pada asparagus yang menghasilkan rebung dalam jumlah tinggi.
- Tanaman diploid atau tetraploid dapat dilepas sebagai kultivar baru.

Sejarah kultur anter dimulai dengan keberhasilan Guha dan Maheswari pada tahun 1966 di India berhasil mengkulturkan anther dari tanaman *Datura innoxia*. Sejak saat itu kultur anther berkembang pesat. Kultur anther yang telah dilakukan adalah pada tanaman: padi, gandum, kacang kedele, kubis, cabe, anggur, tebu, kapas, tembakau, karet.

Faktor-faktor yang menentukan keberhasilan kultur anther adalah (Chu, 1982; Hu dan Zeng, 1984 ; Dixon, 1985) :

- Lingkungan pertumbuhan tanaman donor
- Suhu
- Lama penyinaran
- Intensitas cahaya dari tanaman donor, sangat menentukan keberhasilan kultur ini. Faktor ini sangat spesifik untuk masing-masing tanaman.
- Umur tanaman donor. Seharusnya pengambilan anther dilakukan pada tanaman yang mulai berbunga.
- Fase perkembangan serbuk sari. Untuk berbagai tanaman berbeda-beda. Pada tembakau, fase yang baik adalah pada waktu serbuk sari mulai membelah atau fase pollen grain mitosis (PGM). Pada sereal pada fase gase berinti satu (uni nucleate)
- Pra perlakuan dari anther : Anther sebelum dan sesudah ditanam dapat diberi suhu dingin untuk beberapa waktu kemudian dipindah ke ruang inkubasi. Pra perlakuan pada padi dengan suhu 10°C selama 4 - 7 hari
- Kultur media. Media untuk kultur ini dapat dengan media cair atau semi padat. Agar-agar dapat memberi pengaruh negatif terhadap pertumbuhan serbuk sari. Oleh karena itu dianjurkan memakai media cair dari pada media padat, jika media padat yang digunakan, gunakan agarose sebagai pengganti agar.
- Sukrose: Familia Solanaceae dan Liliceae memerlukan kandungan sukrose yang rendah (2 - 4 %). Gramineae dan Cruciferae memerlukan konsentrasi sukrose yang tinggi (8-12 %)
- Garam anorganik. Pada umumnya memakai garam anorganik dari media MS
- Vitamin dan zat pengatur tumbuh. Pada umumnya digunakan senyawa

organik dari MS. Kebutuhan ZPT tergantung dari jenis tanaman. Gramineae dan Cruciferae memerlukan ZPT, sedangkan solanaceae tidak.

Cara peletakan anther. Pada berbagai jenis tanaman, bagian yang melakukan kontak dengan media ada bagian yang datar, beberapa yang lain menghendaki bagian yang melengkung.

Lingkungan inkubasi. Suhu anjuran 25°C, dengan perlakuan gelap sampai terbentuk embrio atau kalus, kemudian dilakukan penyinaran.

Sub-kultur. Jika anther telah membentuk kalus dan embrio, maka harus di sub-kultur ke media baru, dengan kandungan sukrosa lebih rendah.



Gambar Sterilisasi alat tanam tahap ke II, dilakukan didalam laminar, tehnik perbanyakan tanaman dengan kultur organ (atas kebaikan Siti Roningsih, Herlina Sihotang Alumni UNIMED Jurusan Biologi Non Kependidikan 2002),

Beberapa koleksi tanaman in vitro di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman yang penulis miliki:



Gambar hasil perlakuan : a. kultur kalus euphorbia, b. kultur organ manggis, c. angrek, d. Pembentukan umbi mikro pada kentang dengan modifikasi ZPT, e. Tanaman angrek siap aklimatisasi.

Berikut ini adalah koleksi milik penulis di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman YAHDI:



Gambar isi buah anggrek yang berasal dari lapang, sesaat setelah disterilisasi, ditanam pada media MS dengan penambahan arang aktif dan ZPT BAP, untuk menginduksi terbentuknya Protocorm Like Bodys (PLB). b. PLB anggrek sudah berkembang membentuk tunas *in vitro* dengan penambahan Kinetin. c. Tunas anggrek berkembang baik pada media MS dengan penambahan arang aktif.





Gambar berturut-turut a-g adalah: Berbagai tanaman dengan berbagai perlakuan ZPT : a. Bunga Krisan dengan sumber eksplan internodus, b. Nenas, c. Manggis, d. Vanili, e. Cendana, f. Krisan dengan sumber eksplan nodus, g. Perbanyakan bawang putih, eksplan yang berasal dari lapang

Tanaman Angrek

Media yang digunakan :

- MS
- MS + Arang Aktif 0,5 g/l
- MS + Arang Aktif 1 g/l
- MS + Arang Aktif 1,5 g/l
- MS + Arang Aktif 2 g/l
- MS + Arang Aktif 3 g/l



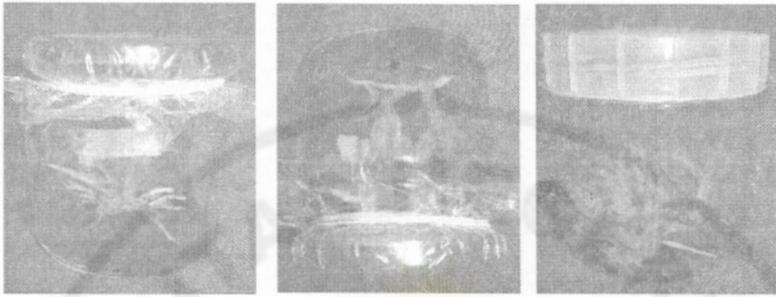
Media MS



MS + A A 0,5 g/l



MS + AA 1g/l



MS + AA 1,5 g/l

MS + AA 2 g/l

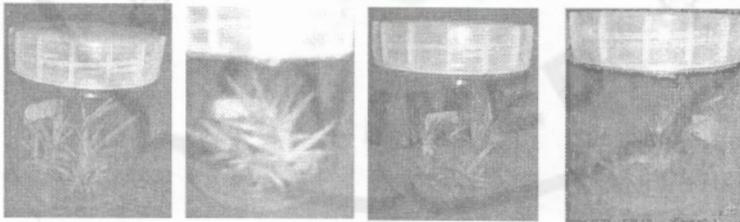
MS + AA 3g/l

Gambar tanaman anggrek dengan perlakuan berbagai dosis arang aktif

Tanaman Nenas

Media yang digunakan :

- MS
- MS + Air Kelapa 5 %
- MS + Air Kelapa 10 %
- MS + Air Kelapa 15 %



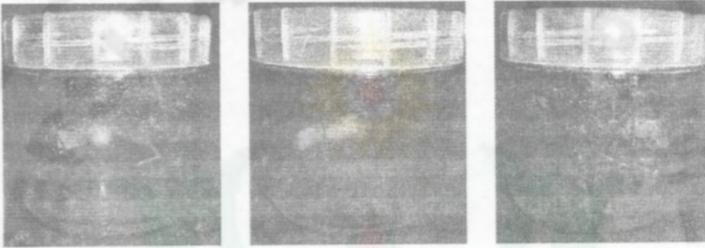
MS MS+Air Kelapa 5% MS+Air Kelapa 10% MS+Air Kelapa 15%

Gambar 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.

TANAMAN DAUN DEWA

Media yang digunakan :

- MS
- MS + NAA 0,1 ppm + BAP 0,2 ppm
- MS + NAA 0,2 ppm + BAP 0,4 ppm



MS MS + NAA 0,1 + BAP 0,2 MS + NAA 0,2 + BAP 0,4

Gambar daun dewa diatas memperlihatkan pada media MS, tidak dijumpai tunas/anakan sama sekali, namun pertumbuhan ruas dan akar lebih cepat dibandingkan dengan media lainnya. Pada media MS + NAA 0,1 ppm + BAP 0,2 ppm, pertumbuhan tunas sangat lambat, seperti tumbuh kalus pada dasar tanaman. Dan pada media MS + NAA 0,2 ppm + BAP 0,4 ppm, perumbuhan tunas, ruas, daun maupun akar lebih bagus dan subur dibandingkan dengan media lainnya.

TANAMAN KRISAN

Media yang digunakan :

- MS
- MS + Arang Aktif 0,5 g/l
- MS + Arang Aktif 1 g/l
- MS + Arang Aktif 1,5 g/l
- MS + Arang Aktif 2 g/l
- MS + Arang Aktif 3 g/l



MS MS + AA 0,5 g/l MS + AA 1 g/l



MS + AA 1,5 g/l



MS + AA 2 g/l



MS + AA 3 g/l

Pada media MS, pertumbuhan tanaman krisan sangat baik, ruas dan akar terlihat sangat subur. Pada media MS + Arang aktif 0,5 g/l, tanaman terlihat subur. Pada media MS + Arang aktif 1 g/l, pertumbuhan tanaman krisan tidak berbeda dengan pada media MS + Arang aktif 0,5 g/l.

Pada media MS + Arang aktif 1,5 g/l, terlihat lebih bagus dari pada media lainnya. Pada media MS + Arang aktif 0,2 g/l pertumbuhan ruas terlihat lebih tinggi. Pada media MS + Arang aktif 3 g/l, pertumbuhan ruas, daun, akar dan tunas mulai membesar

TANAMAN KENTANG (GRANULA)

Media yang digunakan :

- MS
- MS + Arang Aktif 0,5 g/l
- MS + Arang Aktif 1 g/l
- MS + Arang Aktif 1,5 g/l
- MS + Arang Aktif 2 g/l
- MS + Arang Aktif 3 g/l



MS



MS + AA 0,5 g/l



MS + AA 1g/l



MS + A A 1,5 g/l



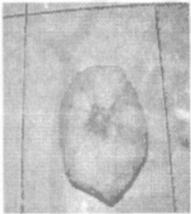
MS + A A 2 g/l



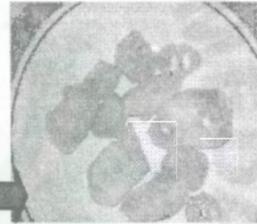
MS + A A 3g/l

Gambar kentang pada pengamatan minggu ke-11, semua tanaman kentang (granula) sudah mulai mengering. Tidak terdapat banyak perbedaan morfologi pada setiap media yang digunakan (MS, MS + Arang aktif 0,5 g/l, MS + Arang aktif 1 g/l, MS + Arang aktif 1,5 g/l, MS + Arang aktif 2 g/l, MS + Arang aktif 3 g/l).

STERILISASI DAN PENANAMAN EKSPLAN DARI LAPANG



1. Bahan yang digunakan sebagai eksplan dikupas kulitnya dan dibuang bagian ujungnya untuk mengeliminir kontaminasi (gambar: asam gelugur)



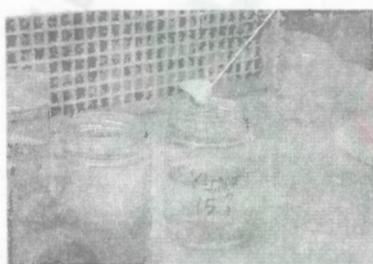
2. eksplan disikat perlahan dengan sikat gigi halus



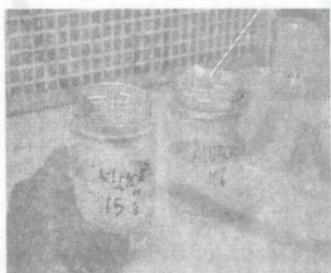
3. Eksplan dimasukkan ke dalam larutan deterjen dan direndam selama 5-10 menit (tergantung sumber eksplan), lalu dibilas 2 kali dengan air mengalir dan bilas dengan akuades steril sebanyak 2 kali



4. Eksplan dimasukkan ke dalam larutan fungisida atau bakterisida selama 2 jam kemudian dicuci dengan aquades steril. Perlakuan no 1-4 dilakukan di luar Laminar Air Flow Cabinet (LAFC) → dalam gambar :



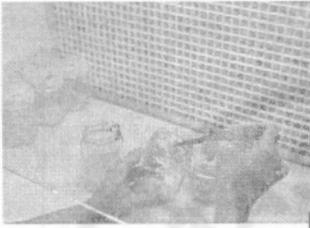
5. Seluruh eksplan dipindah ke laminar. Perlakuan no 5 - 8 dilakukan didalam LAFC . Eksplan dimasukkan dalam larutan klorok 15% selama 3-5 menit) lalu dicuci dengan aquades steril



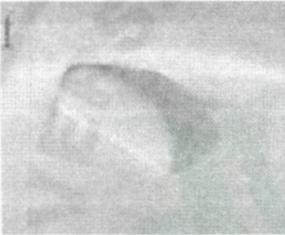
6. Eksplan dimasukkan dalam larutan kloroks 10 % selama 5 – 10 menit lalu dicuci dengan aquades steril sebanyak 3 kali



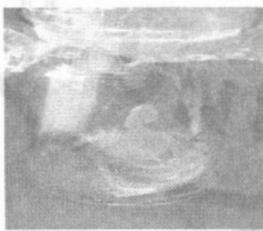
7. Eksplan dimasukkan ke dalam larutan antiseptic/ antibiotik (betadine/amoxilin 500 gram/tablet yang telah dilarutkan dalam 100 ml aquades steril)



8. Lakukan penanaman dengan menanamkan memasukkan eksplan ke media penanaman yang telah disiapkan lebih dahulu (dalam gambar bawang putih manggis)



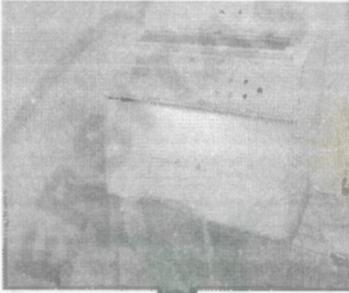
9. Lakukan Pembesaran di Ruang Kultur



PERBANYAKAN TANAMAN PADA MEDIA YANG BERBEDA

(KRISAN/KENTANG/NENAS/ANGGREK)

Prosedur



1. Hidupkan LAFK, nyalakan lampu UV (20 menit) dan pintu LAFK tetap tertutup



2.. Matikan lampu UV, hidupkan lampu fluorescense dan blower, semprot LAFK dengan alkohol 70%



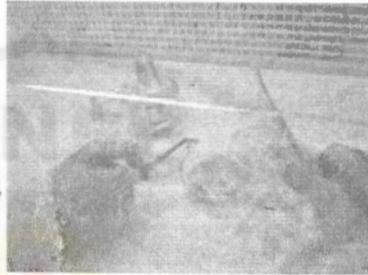
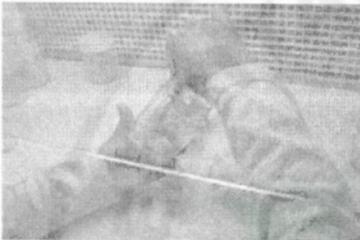
3. Ambil media yang akan digunakan dan planlet yang akan diperbanyak, letakkan di LAFK

4. Siapkan alat tanam, masukkan ke dalam LAFK, sterilisasi dengan alkohol 96% dan api bunsen

5. Panaskan mulut botol media dan mulut botol planlet dengan Bunsen selama 1 menit

6. Ambil planlet dengan menjepitnya dengan pinset dan memotongnya dengan gunting, dan letakkan pada petridish

7. Potong planlet antar ruas atau antar tunas



8. Pindahkan ke media perlakuan, panaskan mulut botol dan tutup rapat



9. Beri tanggal, label dan letakkan pada rak kultur



10. Pindahkan botol berisi tunas baru ke dalam ruang kultur untuk pertumbuhan lanjutan

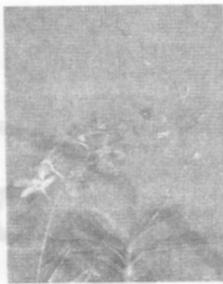
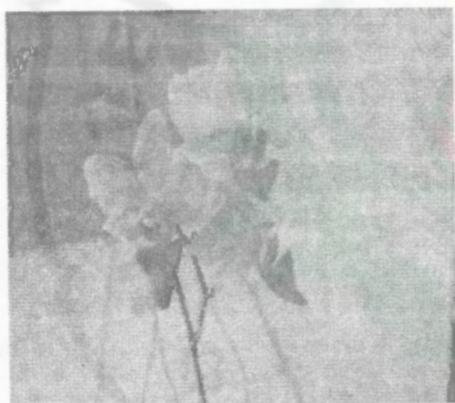


11. Lakukan pengamatan terhadap parameter, misalnya % kontaminasi, jumlah helai daun, tinggi tanaman, jumlah akar dan anakan/tunas

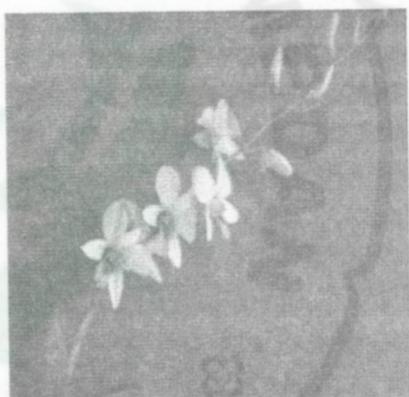
12. Pengolahan data



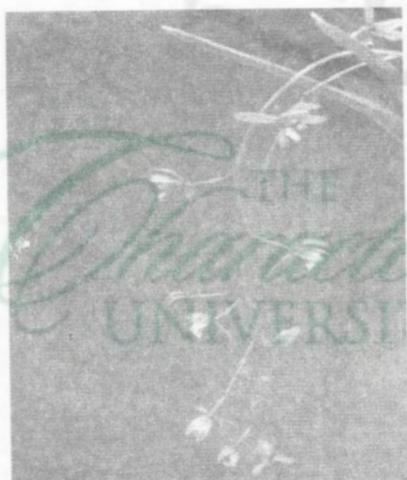
a. Anggrek Panda,

b. Dendrobium sp,
(ungu tua besar)c. Dendrobium sp
(ungu besar)

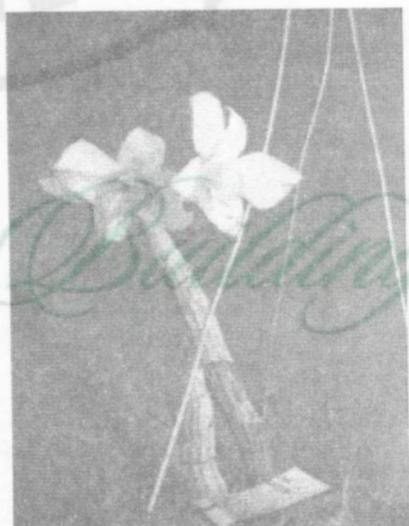
Dendrobium sp



Dendrobium (ungu muda besar) lokal



Anggrek Hutan

Anggrek asal Australia. Daun
senantiasa telah habis baru berbunga

Pertanyaan:

1. Perbanyakkan melalui kultur pucuk sering dilakukan dalam kultur jaringan. Dimana ada cara yang dapat dilakukan yaitu :
 - a. Embryogenesis
 - b. Kultur anther dan kultur kalus
 - c. Kultur suspensi dan kultur sel
 - d. Melalui kultur pucuk dan kultur mata tunas
 (Kunci Jawaban : D, Tipe Soal C₁)

2. Berdasarkan makanan yang dibutuhkan selama perkembangan, fase perkembangan embrio dibedakan atas dua yaitu fase heterotrofik dan fase autotrofik. Dimana fase autotrofik ialah :
 - a. Bentuk embrio dalam fase akhir ini berbentuk bulat dan sangat tergantung pada endosperm sebagai sumber makanan
 - b. Bentuk embrio dalam fase akhir ini berbentuk hati, embrio tidak bergantung lagi pada makanannya
 - c. Bentuk embrio dalam fase akhir ini berbentuk lonjong, embrio tergantung pada makanan
 - d. Bentuk embrio dalam fase akhir ini berbentuk bulat, embrio tidak bergantung lagi pada makanannya
 (Kunci Jawaban : B, Tipe Soal C4)

3. Proses terbentuknya embrio somatic disebut dengan :
 - a. Embrio
 - b. Kultur embrio
 - c. Embryogenesis
 - d. Embrio somatic
 (Kunci Jawaban : C, Tipe Soal C₂)

GLOSARIUM**Somatok embryogenesis:**

Proses terbentuknya embrio somatik

Kotiledon:

Kotiledon merupakan organ cadangan makanan pada biji sekelompok tumbuhan, sekaligus organ fotosintetik pertama yang dimiliki oleh tumbuhan yang baru saja berkecambah, Bakal daun yang terbentuk pada embrio.

Planlet:

Tanaman lengkap yang berasal dari regenerasi pada teknik kultur jaringan

Embrio somatik:

Embrio yang bukan berasal dari zigot tetapi berasal dari sel biasa/ sel omatic dari jaringan tanaman

Kultur embrio:

Kultur dengan sumber eksplannya adalah embrio, dengan cara memisahkan embrio yang belum dewasa/dewasa secara steril dan menumbuhkan secara *in vitro* dengan maksud memperoleh tanaman yang *viable*

Genotip:

Istilah yang dipakai untuk menyatakan keadaan genetik dari suatu individu atau sekumpulan individu populasi. Genotipe dapat merujuk pada keadaan genetik suatu lokus maupun keseluruhan bahan genetik yang dibawa oleh kromosom (genom)

Kultur meristem:

Kultur yang menggunakan eksplan yang berasal dari jaringan meristem, biasanya diperoleh dari meristem apical atau meristem tunas aksilar

Plasma nutfah:

Substansi yang terdapat dalam setiap kelompok makhluk hidup yang merupakan sumber sifat keturunan yang dapat dirakit untuk menciptakan jenis unggul atau kultivar baru

Virus:

Parasit berukuran mikroskopik yang menginfeksi sel organisme biologis. Virus hanya dapat bereproduksi di dalam material hidup dengan menginvasi dan memanfaatkan sel makhluk hidup karena virus tidak memiliki perlengkapan selular untuk bereproduksi sendiri

Meriklon:

Tanaman yang dihasilkan dari kultur meristem

Protoplas:

Sel dalam keadaan telanjang

Plasmodesmata:

Suatu saluran terbuka pada pada ruang antar sel di sebagai penghubung dengan sel tetangganya

Plasmolisis sel:

Merupakan dampak dari peristiwa osmosis dimana Jika sel tumbuhan diletakkan di larutan garam terkonsentrasi (hipertonik), sel tumbuhan akan kehilangan air dan juga tekanan turgor, menyebabkan sel tumbuhan lemah. Tumbuhan dengan sel dalam kondisi seperti ini layu. Kehilangan air lebih banyak akan menyebabkan terjadinya plasmolisis

Kalus:

Sekumpulan sel amorphous (tidak berbentuk atau belum terdiferensiasi) yang terbentuk dari sel-sel yang membelah terus menerus secara *in vitro*

Resisten:

Merujuk kepada ketahanan missal resisten terhadap penyakit.



THE
Character Building
UNIVERSITY