

**PENGANTAR BIOTEKNOLOGI**  
**KULTUR JARINGAN TUMBUHAN**



**Disusun oleh:**  
**Lianah, S.Pd M.Pd**

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur kepada Allah SWT kami panjatkan atas segala rahmat dan hidayahnya yang lelah memberikan kekuatan, kesempatan sehingga bahan ajar berupa buku Bioteknologi kultur jaringan Tumbuhan yang diharapkan oleh mahasiswa dapat mendukung implementasi Program Studi Tadris Biologi Fakultas Tarbiyah IAIN Walisongo Semarang di lingkungan Kementerian Agama yang masih sangat minim mendapatkan buku –buku yang bersifat umum seperti Bioteknologi kultur jaringan ini.

Penulis sadar sepenuhnya bahwa buku ini tidak mungkin terselesaikan tanpa bantuan dari semua pihak. Dengan teriring rasa hormat penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada rekan-rekan kolega dan para mahasiswa yang telah menginspirasi. Semoga buku bioteknologi ini bermanfaat bagi khasanah kepustakaan.

Kami menyadari sepenuhnya bahwa buku ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu kami berharap semoga kritik dan saran yang komunikatif dapat membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan. Harapan kami semoga buku ini memberikan manfaat yang berarti bagi upaya peningkatan mutu pembelajaran Pengantar Bioteknologi, khususnya dilingkungan Tadris Biologi di lingkungan Direktorat Jenderal Pendidikan Islam Kementerian Agama Indonesia

Semarang, Maret 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
BAB I: PENDAHULUAN.....	1
BAB II: LABORATORIUM KULTUR JARINGAN	13
A. Pendahuluan.....	13
B. Pokok Bahasan.....	14
C. Pembahasan.....	14
1. Pengorganisasian.....	14
2. Peralatan dan bahan .....	18
3. Prosedur laboratorium kultur jaringan .....	33
D. Rangkuman .....	48
E. Latian soal dan jawaban.....	50
BAB III: TAHAP PERSIAPAN .....	54
A. Pendahuluan.....	54
B. Pokok Bahasan.....	54
C. Pembahasan.....	55
1. Pengertian kultur jaringan.....	55
2. Tahap-tahap persiapan kultur jaringan.....	56
3. Manfaat kultur jaringan.....	59
D. Rangkuman .....	62
E. Latian soal dan jawaban .....	64
BAB IV: PEMILIHAN DAN STERILISASI EKSPAN .....	68
A. Pendahuluan.....	68
B. Pokok Bahasan.....	68
C. Pembahasan.....	69
1. Pengertian sterilisasi eksplan .....	69
2. Macam-macam sterilisasi.....	69
3. Cara pemilihan eksplan.....	73
4. Proses sterilisasi .....	74
D. Rangkuman .....	78
E. Latian soal dan jawaban.....	79

<b>BAB V: PEMBUATAN MEDIA KULTUR</b>	
<b>JARINGANAN.....</b>	<b>81</b>
A. Pendahuluan.....	81
B. Pokok Bahasan.....	83
C. PEMBAHASAN.....	83
1. Pembuatan media kultujaringan.....	83
2. Komposisi dalam pembuatan media.....	85
3. Langkah-langkah pembuatan media.....	91
D. Rangkuman.....	96
E. Latian soal dan jawaban.....	98
<b>BAB VI :KULTUR PROTOPLAS .....</b>	<b>101</b>
A. Pendahuluan.....	101
B. Pokok Bahasan.....	101
C. Pembahasan.....	101
1. Pengertian protoplas.....	101
2. Pengertian fusi protoplas.....	102
3. Prosedur pembuatan kultur protoplas .....	105
D. R angkuman .....	107
E. Latian soal dan jawaban.....	108
<b>BAB VII: KULTUR HAPLOID DAN DIPLOID .....</b>	<b>110</b>
A. Pendahuluan.....	110
B. Pokok Bahasan.....	111
C. Pembahasan.....	111
1. Kultur Haploid dan Diploid .....	112
2. Kultur Antera pada Teknologi Haploid ....	115
D. Rangkuman .....	120
E. Latian soal dan jawaban.....	120
<b>BAB VIII: REGENERASI TANAMAN DARI</b>	
<b>KALLUS.....</b>	<b>122</b>
A. Pendahuluan.....	122
B. Pokok Bahasan.....	123
C. Pembahasan.....	123
1. Pengertian Regenerasi Kallus .....	123
2. Prosedur Regenerasi Tanaman.....	127

3. Pembentukan Plantlet melalui JalurSomatiEmbriogenesis.....	128
D. R angkuman .....	132
E. Latian soal dan jawaban.....	132
<b>BAB IX : INDUKSI KALLUS .....</b>	<b>134</b>
A. Pendahuluan.....	134
B. Pokok Bahasan.....	135
C. Pembahasan.....	135
1. Faktor-factoryang mempengaruhi induksi kalus .....	135
2. Macam-macam induksi kalus .....	139
D. Rangkuman .....	141
E. Latian soal dan jawaban.....	141
<b>BAB X : SUSPENSI SEL.....</b>	<b>144</b>
A. Pendahuluan.....	144
B. Pokok Bahasan.....	145
C. Pembahasan.....	145
1. Pengertian Suspensi sel.....	145
2. Prosedur Suspensi sel.....	148
D. Rangkuman .....	152
E. Latian soal dan jawaban.....	152
<b>BAB XI: MIKRO PROPAGASI .....</b>	<b>157</b>
A. Pendahuluan.....	157
B. Pokok Bahasan.....	159
C. Pembahasan.....	159
1. Pengertian mikropropagasi .....	159
2. Tahap-tahap mikropopagasi.....	160
D. Rangkuman .....	172
E. Latian soal dan jawaban.....	173
<b>BAB XII: MIKROGRAFFTING .....</b>	<b>175</b>
A. Pendahuluan.....	175
B. Pokok Bahasan.....	176
C. Pembahasan.....	176
1. Pengertian mikrografting .....	176

2. Proses dalam mikrografting .....	179
3. Tahap-tahap.....	182
4. Keuntungan dan Kekurangan.....	182
D. Rangkuman .....	183
E. Latihan soal dan jawaban.....	183
<b>BAB XIII: PENCOKLATAN.....</b>	<b>187</b>
A. Pendahuluan.....	187
B. Pokok Bahasan.....	189
C. Pembahasan.....	189
1. Masalah pencoklatan.....	189
2. Penyebab terjadinya masalah kecoklatan..	191
3. Cara mengatasi pencoklatan .....	194
D. Rangkuman .....	197
E. Latihan soal dan jawaban.....	197
<b>BAB XIV: PETUNJUK PRAKTEK PRAKTEK           BUDIDAYA JAMUR TIRAM.....</b>	<b>203</b>
<b>BAB XV : APLIKASI PRAKTEK BIOTEKNOLOGI           BUDIDAYA JAMUR TIRAM LAPORAN           PRAKTIKUM.....</b>	<b>208</b>
A. TUJUAN.....	208
B. DASAR TEORI.....	208
C. ALAT DAN BAHAN.....	211
D. CARA KERJA .....	211
E. HASIL.....	212
F. PEMBAHASAN.....	216
G. KESIMPULAN.....	220
<b>GLOSARI .....</b>	<b>222</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>223</b>

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

Issue pemanasan global, perubahan iklim yang semakin ekstrem dan kesadaran global akan pentingnya konservasi tidak terlepas dari semakin meningkatnya krisis kepunahan sumberdaya hayati terutama tumbuhan di dunia. Sebagaimana yang tertuang di dalam *the Gran Canaria Declaration* (BGCI 2000), dikatakan bahwa:”sekitar dua pertiga jenis tumbuhan dunia abad 21 ini menghadapi ancaman bahaya kepunahan di alam yang disebabkan oleh pertumbuhan populasi penduduk, deforestasi, hilangnya habitat, pembangunan yang destruktif, penggunaan sumberdaya yang berlebihan, dan ekspansi agrikultur”. Malaysia, Indonesia, Brazil dan Sri Lanka merupakan 4 negara dengan jumlah tumbuhan terancam tertinggi di dunia (*The International Union for Conservation of Nature and natural Resources 2000*). Di bumi terdapat keanekaragaman yang menggambarkan adanya berbagai perbedaan tanaman alam, baik dalam wujud keanekaragaman yang mencakup jumlah maupun frekuensi ekosistem, serta jenis-jenis yang spesifik terdapat di wilayah tertentu. Keanekaragaman hayati (*Biodiversity*) merupakan “payung” dari derajat keanekaragaman alam dan kehidupan. Dari permasalahan tersebut :Bagaimana cara mendapatkan bibit tumbuhan yang sudah langka terutama dan susah berkembangbiaknya karena perubahan parameter lingkungan berubah dan lain-lainnya.Maka salah satu upaya yang tepat dilakukan yaitu teknik kultur jaringan

tentunya. Contoh perbanyakkan kultur jaringan secara alami sebenarnya sudah ada yaitu pada tumbuhan cocor bebek. Bagian daunnya dipotong-potong ditanam akan tumbuh semua. Allah SWT telah berfirman pada ayat yang berkaitan dengan tumbuhan diterangkan dalam al-Qur'an surat al-an'am ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا مَخْرُجًا مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِن طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالزُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan Maka kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.

Sejarah Penggunaan teknik kultur jaringan dimulai oleh Gottlieb Haberlandt pada tahun 1902 dalam

usahanya mengkulturkan sel-sel rambut dari jaringan mesofil daun tanaman monokotil. Tetapi usahanya gagal karena sel-sel tersebut tidak mengalami pembelahan, diduga kegagalan itu karena tidak digunakannya zat pengatur tumbuh yang diperlukan untuk pembelahan sel, proliferasi dan induksi embrio. Pada tahun 1904, Hannig melakukan penanaman embrio yang diisolasi dari beberapa tanaman crucifers. Tahun 1922, secara terpisah Knudson dan Robbin masing-masing melakukan usaha penanaman benih angrek dan kultur ujung akar. Setelah tahun 1920-an, penemuan dan perkembangan teknik kultur jaringan terus berlanjut. Allah SWT telah berfirman dalam surat QS. Al- Hijr: 20

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ  
 وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشًا وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾

Artinya:

[19]. Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran.

[20]. Dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rizki kepadanya.

**Kultur jaringan** berasal dari kata *Kultur* adalah budidaya dan *jaringan* adalah sekelompok sel yang

mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Jadi, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya. Manfaat dari teknik kultur jaringan tanaman ini diharapkan juga memperoleh tanaman baru yang bersifat unggul. Adapun keuntungannya yaitu : Pengadaan bibit tidak tergantung pada musim. Bibit dapat diproduksi dalam jumlah banyak dengan waktu yang relatif cepat. Bibit yang dihasilkan seragam dan bebas penyakit. Pengangkutan bibit lebih murah dan mudah. Perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan dilaksanakan dalam suatu laboratorium yang aseptik dengan peralatan seperti pada laboratorium Mikrobiologi dilengkapi dengan alat- alat khusus contoh *Laminar Air Flow Cabinet(LAFC)* dan fasilitas lain yang cukup lengkap untuk pelaksanaan kultur jaringan tumbuhan, selain laboratorium juga dilengkapi dengan green house.

Kultur jaringan merupakan salah satu cara vegetatif dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun , mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik pula yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya, sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap.

Metode untuk memperbanyak tanaman, khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangkan secara generatif. Bibit dihasilkan dari kultur jaringan mempunyai beberapa keunggulan antara lain sifat

identik dengan induknya, mutu kesehatan terjamin, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibanding dengan perbanyakan konvensional. Jenis pembiakan vegetatif yang masih baru dikembangkan adalah Kultur jaringan merupakan salah satu teknik perbanyakan tanaman yang menggunakan sel/organ/jaringan tanaman. Potongan jaringan atau organ yang dikulturkan ini dinamakan eksplan hortikultura karena menghasilkan buah tidak berbiji seperti semangka, pisang, dan lain-lain. Triploid juga penting dalam kehutanan karena meningkatkan kualitas pulp seperti pada *Populus* sp. Jaringan tanaman yang triploid adalah endosperma yang berasal dari gabungan gamet jantan dan dua sel sinergik. Kultur endosperma yang pernah dicoba dan berhasil misalnya padi, cendana, puring, apel, *Citrus grandis*, dan *Petroselinum hortense*. Embryo rescue. Teknik kultur in vitro dapat dimanfaatkan untuk mendapatkan hibrida unik yang secara konvensional tidak dapat diperoleh karena embrio gugur pada umur beberapa hari setelah polinasi. Embrio yang sangat muda diseksi dan ditumbuhkan dalam media in vitro sampai menjadi tanaman lengkap. Kultur embrio dewasa mempunyai masalah dalam perkecambahannya karena tidak ada endosperma atau endospermanya rusak. Seleksi sel resisten terhadap berbagai stres baik abiotik maupun biotik. Media kultur dengan berbagai faktor stres seperti kandungan NaCl tinggi, Al tinggi, toksin fungi dan bakteri yang ditambahkan Eksplan secara aseptik diletakkan dan dipelihara dalam medium padat atau cair yang cocok dan dalam keadaan steril. Dengan cara

demikian sebagian sel pada permukaan irisan tersebut akan mengalami proliferasi dan membentuk kalus. Kalus yang terbentuk dipindahkan ke dalam media deferensiasi yang cocok, maka akan terbentuk tanaman kecil yang lengkap disebut plantlet. Dengan teknik Kultur Jaringan ini hanya dari satu irisan kecil suatu jaringan tanaman dapat dihasilkan kalus yang dapat menjadi plantlet dalam jumlah besar. Ide memperbanyak tanaman dengan jalan mengkulturkan bagian kecil jaringan atau organ muncul dari pendapat bahwa tanaman tingkat tinggi terdiri dari sekumpulan sel. Sel-sel yang sama membentuk jaringan yang melakukan tugas tertentu pada setiap organ dalam tubuh tanaman. Sel-sel ini mempunyai kemampuan untuk melakukan seluruh proses hidup. Kemampuan sel ini disebut totipotensi. Kemampuan alamiah untuk memproduksi sendiri tanpa perkawinan sel jantan dan betina inilah yang mendasari orang memperbanyak tanaman dengan mengkulturkan jaringan. Proses ini disebut juga *in vitro* (terpisah dari induk). Istilah kultur jaringan atau *in vitro* adalah teknik memperbanyak tanaman dengan menggunakan potongan kecil jaringan atau sel yang dipelihara dalam satu media dan dikerjakan seluruhnya dalam kondisi aseptis. Teknik kultur *in vitro* ini dapat dimanfaatkan untuk membantu program pemuliaan sehingga akan dihasilkan tanaman yang lebih baik. Beberapa alasan yang mendukung hal ini sebagai berikut : Teknik kultur *in vitro* dapat menghasilkan tanaman dengan tingkat ploidi yang berbeda dalam waktu relatif singkat dibandingkan metode konvensional. Contohnya : haploid melalui

kultur polen yang mempunyai jumlah kromosom  $\frac{1}{2}$  dari sel somatik, triploid melalui kultur endosperma. Haploid dapat digunakan untuk mendeteksi sifat-sifat resesif yang berguna. Sifat-sifat ini tidak diekspresikan bila ada allele dominan pada kromosom homologusnya. Setelah kromosom digandakan akan diperoleh diploid homozigot yang fertil dengan sifat yang diinginkan. Triploid mempunyai nilai penting dalam media tumbuh dapat membantu proses seleksi ketahanan sel yang kompeten (mampu beregenerasi) dengan tujuan akhir pengembangan tanaman yang resisten. Seleksi in vitro dapat menghemat lahan percobaan seperti yang umum diperlukan dalam seleksi lapangan, dapat memberikan tekanan seleksi yang seragam sehingga mengurangi escape (tanaman lolos tekanan seleksi), serta dapat dilakukan pada populasi sel yang berjumlah jutaan. Seleksi dengan cara ini dapat menyingkat waktu dan mengurangi biaya. Dapat menghasilkan hibrida baru, interspesifik maupun intraspesifik melalui fusi protoplasma. Fusi protoplasma juga dikenal dengan istilah hibridisasi somatik. Melalui cara ini halangan alamiah seperti inkompatibilitas dapat diatasi. Menyediakan protoplasma sel somatik maupun sel generatif (polen) sebagai bahan dalam transfer gen dalam rangka pembentukan sel transgenik. Kelebihannya tidak memerlukan tempat yang luas. Untuk memperbanyak tanaman tertentu yang sulit atau lambat diperbanyak secara konvensional. Dapat dilakukan sepanjang tahun tidak mengenal musim. Bibit yang dihasilkan lebih sehat dan seragam. Memungkinkan

dilakukannya manipulasi genetik. Stok tanaman dapat disimpan dalam waktu lama. Kelemahan dibutuhkan keahlian khusus untuk melaksanakannya. Dibutuhkan biaya awal yang relatif tinggi untuk laboratorium dan bahan kimia. Tanaman yang dihasilkan berukuran kecil, aseptik, dan biasa hidup di tempat yang berkelembaban tinggi sehingga memerlukan aklimatisasi ke lingkungan eksternal. Metode setiap spesies tidak sama. Manfaat produksi tanaman bebas pathogen produksi bahan-bahan farmasi pelestarian plasma nuftah pemuliaan tanaman dan rekayasa genetika perbanyak tanaman klonal dengan cepat.

Untuk menghasilkan bibit secara in-vitro yaitu mulai budidaya, eksplan yang digunakan sampai dengan enzim yang digunakan untuk fusi protoplasma. Eksplan adalah tanaman yang dipakai untuk perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan, misal jaringan meristem tanaman atau daun muda, kepala sari, atau serbuk sari, putik, lembaga, (endosperm) atau embrio, kotiledone atau hipokotil. Dalam kegiatan kultur jaringan perlu memerlukan bahan-bahan yang dibutuhkan dalam proses kegiatan kultur jaringan. Bahan-bahan yang digunakan dalam kegiatan kultur jaringan diantaranya: Ruangan yang memenuhi standart khusus, bahan dan alat yang sesuai. Disamping itu hal yang perlu diperhatikan adalah bahan sterilisasinya, kandungan unsur kimia dalm media, hormon yang digunakan substansi organiknya ditambahkan serta gelap terangnya saat inkubasi. Dan dalam kegiatan kultur jaringan, tidak sedikit masalah-masalah yang muncul sebagai

pengganggu dan bahkan menjadi penyebab tidak tercapainya tujuan kegiatan kultur yang dilakukan. Gangguan kultur secara umum dapat muncul dari bahan yang ditanam, dari lingkungan kultur, maupun dari manusianya.

Permasalahan dalam kultur ada yang dapat diprediksi sebelumnya dan ada pula yang sulit diprediksi kejadiannya. Untuk yang tidak dapat diprediksi, cara mengatasinya tidak dapat secara preventif tetapi diselesaikan setelah kasus itu muncul, misal kontaminasi. *Kontaminasi* adalah gangguan yang sangat umum terjadi dalam kegiatan kultur jaringan. Munculnya gangguan ini bila dipahami secara mendasar adalah merupakan sesuatu yang sangat wajar sebagai konsekuensi penggunaan yang diperkaya. Fenomena kontaminasi sangat beragam, keragaman tersebut dapat dilihat dari jenis kontaminasinya (bakteri, jamur, virus, dll). Upaya mencegah terjadinya kontaminasi. Biasakan membersihkan berbagai sarana yang diperlukan dalam kultur jaringan. Yakinkan bahwa proses sterilisasi media secara baik dan benar. Sebaiknya melakukan proses penanaman bahan pada keadaan nyaman dan cari waktu yang longgar. Masalah yang lain yang sering muncul yaitu terjadinya pencoklatan. Pencoklatan adalah suatu karakter munculnya warna coklat atau hitam yang sering membuat tidak terjadinya pertumbuhan dan perkembangan *eksplan*. Peristiwa pencoklatan sesungguhnya merupakan peristiwa alamiah yang biasa yang sering terjadi. Pencoklatan umumnya merupakan

suatu tanda-tanda kemunduran fisiologi *eksplan* dan tidak jarang berakhir pada kematian *eksplan*.

Dari sekian banyak permasalahan yang harus diteliti dan dicermati komposisi media. Media tumbuh pada kultur jaringan sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan *eksplan* dan bibit yang akan dihasilkannya. Oleh karenanya macam-macam media kultur jaringan telah banyak ditemukan sesuai dengan nama penemunya. Medium yang digunakan mengandung garam-garam mineral yang terdiri dari unsur-unsur makro dan mikro, sumber karbon, vitamin, asam-asam amino, bahan organik kompleks (Air kelapa, air jeruk, daging, ekstrak kamir, ekstrak buah pisang, ekstrak dll.) dan zat pengatur tumbuh (hormon auksin, sitokinin, geberelin). Sedangkan Zat pengatur tumbuh termasuk inhibitor yaitu fenolik dan asam abisik.

Hormon auksin didalam tubuh tanaman dihasilkan oleh pucuk-pucuk batang, cabang, ranting-ranting yang menyebar keseluruh tubuh tanaman. Penyebaran auksin ini arahnya dari atas ke bawah sampai titik tumbuh akar, melalui jaringan ploidem atau jaringan parenkim. Oleh karena itu pada teknik kultur jaringan digunakan jaringan meristem, sebab pada jaringan ini terdapat hormon pengatur pembelahan sel sehingga keadaanya selalu membelah. Penambahan auksin dimaksud membantu pembelahan sel. Plantlet akan tumbuh dari kalus setelah dipindah dari medium deferensiasi. Apabila mediumnya cocok maka akan terjadi organogenesis terbentuk akar atau tunas yang selanjutnya akan terjadi embriogenesis dengan

mengadakan perubahan kandungan hormon pengatur tumbuh.

Sekarang telah banyak macam tanaman yang berhasil diperbanyak dengan kultur jaringan *in-vitro* yakni mengkombinasikan media dengan zat pengatur tumbuh. Hormon pengatur tumbuh dapat dibedakan menjadi beberapa golongan yaitu: Auksin, Sitokinin, dan golongan geberelin dan inhibitor. Golongan auksin yaitu Indol Asam Asetat (IAA), Indol Asam Butirat (IBA), Naftalin Asam Asetat (NAA), dan 2,4 D Dikloro Fenol Asetat (2,4-D). Zat tumbuh yang tergolong Sitokinin adalah Kinetin Zeatin, Ribosil dan Bensil Aminopurin (BAP). Zat Pengatur yang termasuk Geberelin antara lain adalah GA1, GA2, GA3, GA4. Sedangkan zat pengatur tumbuh inhibitor antara lain adalah fenolik dan asam abisik.

Problem utama berkaitan dengan proses pertumbuhan adalah bila *eksplan* yang ditanam mengalami *stagnasi*, dari mulai tanam hingga kurun waktu tertentu tidak mati tetapi tidak tumbuh. Untuk menghindari hal itu dapat dilakukan dengan *preventif* menghindari bahan tanam yang tidak *juvenil* atau tidak *meristematik*. Karena awal pertumbuhan *eksplan* akan dimulai dari *sel-sel* yang muda yang aktif membelah, atau dari sel-sel tua yang muda kembali.

Apabila *eksplan* tidak steril, maka timbul berbagai permasalahan yang sering dijumpai dalam kultur *in-vitro* seperti pencoklatan, kontaminasi, dan vitivikasi. Permasalahan tersebut apabila berlanjut akan

menghambat pertumbuhan eksplan dan biasanya diakhiri dengan kematian. Sehingga diperlukan cara untuk mengatasinya. Dan sebagai makhluk hidup yang bertugas menjadi khalifah di bumi, manusia dituntut untuk memikirkan hal tersebut agar kelestarian alam tetap terjaga. Seperti yang disebutkan dalam Firman Allah SWT pada Surat Al-An'am ayat 95 :

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۚ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَيُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ ۚ فَإِنَّ اللَّهَ لَكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ۝۹۵﴾

﴿ مِنْ الْحَيِّ ۚ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ ۚ فَإِنَّ اللَّهَ لَكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ۝۹۵﴾

Artinya: “Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, Maka Mengapa kamu masih berpaling?”(Q.S. Al-An'am: 95)

## **BAB II**

### **LABORATORIUM KULTUR JARINGAN**

#### **A. PENDAHULUAN**

Syarat dari suatu Laboratorium Kultur Jaringan minimal setara dengan laboratorium Mikrobiologi. Syarat yang harus dipenuhi laboratorium ini harus mempunyai standart khusus adanya beberapa ruang-ruang, alat-alat dan bahan yang aseptik atau steril bebas kuman. Alat-alat yang terdiri dari mulai bahan gelas, bahan non gelas dan alat khusus misal alat sterilisasi dan alat-alat pendukung lainnya semuanya harus dalam keadaan steril. Harapannya agar tidak terjadi kontaminasi ke depan bisa diupayakan untuk bisa mempraktekan kultur jaringan dengan baik sehingga apa yang dipraktekan bisa maksimal. Laboratorium kultur jaringan merupakan fasilitas pendukung untuk menunjang pengembangan teknologi di bidang pertanian (Bioteknologi), terlebih khusus lagi membantu mahasiswa Biologi memperoleh ilmu pengetahuan lebih luas tentang bagaimana proses ataupun metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti sel, sekelompok sel, jaringan dan organ sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali. Selain itu, mahasiswa juga dapat langsung melihat dan mempelajari teknik kultur jaringan yang mana dengan teknik kultur jaringan ini, produksi tanaman dalam jumlah besar

dapat dilakukan dalam waktu yang singkat tentunya terutama misalnya; varietas-varietas unggul yang barudihasilkan. Sarana penunjang yang memberikan pelatihan berupa pemahaman materi dan praktek kultur jaringan sehingga diperoleh peningkatan ilmu dan wawasan bagi mahasiswa tentang teknologi mutakhir dalam perbanyakan tanaman. Laboratorium Kultur Jaringan juga diperuntukan bagi pihak luar yang berkepentingan dengan perbanyakan tanaman, seperti dalam hal pelatihan bagi kultur jaringan bagi mahasiswa dan guru biologi, serta jasa penyediaan explant bagi stakeholder. Kegiatan praktikum materi teoritik seperti: Pembuatan Media, Sub-Culture Explant, Sterilisasi Tanaman dan Inkubasi dan Aklimatisasi.

## **B. POKOK BAHASAN**

1. Pengorganisasian dalam laboratorium kultur jaringan.
2. Peralatan dan bahan dalam kultur jaringan.
3. Prosedur dasar laboratorium kultur jaringan.

## **C. PEMBAHASAN**

### **1. Pengorganisasian Laboratorium Kultur Jaringan**

Di setiap laboratorium dimana teknik kultur jaringan digunakan, harus mempunyai sejumlah fasilitas yang memadai. Fasilitas yang digunakan atau dipersiapkan ini juga mempunyai dampak pada hasil dalam pembuatan

dan pembudidayaan kultur jaringan itu sendiri. Adapun fasilitas yang ini diantaranya mencakup berbagai hal, diantaranya adalah:

- a. Ruang pencucian.
- b. Ruang persiapan, sterilisasi dan penyimpanan.
- c. Ruang transfer aseptik.
- d. Ruang kultur atau inkubator yang lingkungannya terkontrol.
- e. Ruang pengamatan.

Dari berbagai macam ruang yang ada diatas akan dijelaskan dibawah ini:

#### 1) Ruang Pencucian

Ruang pencucian harus mempunyai bak cuci, meja kerja yang terbuat dari bahan yang tahan terhadap asam dan basa, rak pengering dan mempunyai saluran untuk air demineralisasi atau destilasi, ruang untuk tempat oven pengering, alat atau mesin pencuci dan pengering, serta rak atau lemari penyimpanan alat.

#### 2) Ruang Persiapan

Dalam ruang persiapan ini harus tersedia tempat untuk penyimpanan bahan-bahan kimia, gelas kultur dan penutupnya, dan peralatan gelas yang diperlukan untuk pembuatannya. Meja yang kokoh atau "bench" untuk penyimpanan "hot plate magnetic stirrer", pH meter, timbangan, dan dispenser

harus tersedia. Peralatan lain yang biasanya ada di ruang persiapan dan pembuatan media antara lain alat vacuum, distilling unit, bunsen, refrigerator (kulkas) dan freezer untuk penyimpanan larutan stok dan bahan kimia, microwave, kompor gas, oven dan autoclave untuk sterilisasi media yang akan digunakan, peralatan gelas dan peralatan masih banyak lagi peralatan peralatan yang tersedia didalamnya. Dalam pembuatan media kultur, bahan-bahan kimia yang digunakan harus yang bertaraf analitik dan penimbangannya harus baik dan benar. Agar lebih akurat, dalam pembuatan media harus dilakukan tahap demi tahap dan di cek kembali bahan-bahan yang akan digunakan. Air yang digunakan dalam pembuatan media harus berkualitas tinggi yang mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi. Air ledeng atau sumur tidak digunakan untuk pembuatan media karena mengandung kation-kation (amonium, kalsium, besi, magnesium natrium, dll.), anion-anion (bikarbonat, klorida, flourida, fosfat, dll.), mikroorganisme (algae, jamur, bakteri), gas-gas (oksigen, CO<sub>2</sub>, nitrogen) dan bahan-bahan lain (minyak, bahan organik yang lain). Untuk pemurnian air dalam melakukan percobaan lebih baik dideionisasi atau. Dalam deionisasi ini akan menghilangkan

bahan-bahan yang bersifat ionik dan proses destilasi menghilangkan molekul-molekul organik, mikroorganisme dan pirogen.

3) Ruang Transfer

Teknik kultur jaringan dapat berlangsung dengan sukses apabila dilakukan dibawah kondisi laboratorium yang bersih dan steril. Oleh karena itu pemindahan atau transfer biakan dikerjakan dalam ruang transfer steril atau *laminar air flow*. Laminar air flow yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah tipe horizontal dan dirancang dengan mempunyai ruangan yang bebas dari partikel debu yang halus dan dilengkapi dengan sinar ultra violet (UV) serta unit penyaring udara. Penyaring udara harus mempunyai filter udara dengan efisiensi tinggi atau "*High-Efficiency Particulate Air*" (HEPA filter). HEPA filter harus mempunyai pori sekitar 0.3  $\mu\text{m}$  dengan efisiensi kerja berkisar 99.97 – 99.99%. Semua permukaan ruang kerja dalam laminar dirancang dan mempunyai konstruksi sedemikian rupa sehingga debu dan mikroorganisme tidak dapat berakumulasi dan permukaan tempat kerja dapat mudah dibersihkan dan didisinfeksi.

4) Ruang Kultur atau Inkubator

Semua jenis kultur harus disimpan dalam tempat yang terkontrol baik temperatur, sirkulasi udara, kelembaban maupun kualitas

dan lamanya cahaya. Faktor-faktor lingkungan tersebut akan mempengaruhi proses pertumbuhan dan diferensiasi biakan baik secara langsung maupun tidak langsung. Kultur protoplas, suspensi sel dan kultur anther adalah yang paling sensitif terhadap kondisi lingkungan. Suhu ruang kultur untuk pertumbuhan umumnya berkisar antara 15°–30° C, dengan fluktuasi kurang dari  $\pm 0.5^\circ$  C; akan tetapi kisaran suhu yang lebih besar mungkin diperlukan untuk tujuan percobaan. Ruang kultur harus mempunyai pencahayaan hingga 10.000 lux. Suhu dan cahaya harus dapat diprogram selama 24 jam. Ventilasi udara harus baik dengan kelembaban berkisar 20-98%.

#### 5) Ruang Pengamatan

## 2. Peralatan dan bahan dalam kultur jaringan

Untuk membuat media kultur jaringan, biasanya menimbang setiap komponen bahan kimia yang terdapat pada resep media dasar. Pembuatan media pada prinsipnya juga dilakukan dengan melarutkan semua komponen media dalam air, sesuai dengan konsentrasinya pada formulasi yang diinginkan. Namun, penimbangan satu per satu komponen media untuk setiap pembuatan media kultur adalah tidak praktis, dan hanya dapat dilakukan jika jumlah zatnya cukup besar untuk ditimbang. Selain itu akan memakan

banyak waktu dan mengurangi ketepatan. Kadang-kadang pula timbangan yang dibutuhkan untuk menimbang sejumlah kecil bahan tidak tersedia dalam laboratorium. Kendala ini dapat diatasi dengan membuat larutan stok terlebih dahulu.

Peralatan yang diperlukan dari suatu laboratorium umumnya adalah sebagai berikut :pH meter, Dispenser. Oven, Microwave, Mikroskop, Pipet ukur, Shaker, Laminar air flow, Disinfectant, Refrigerator, Hot plate, magnetic stirrer atau kompor, Peralatan gelas (seperti gelas ukur, erlenmeyer, Alat sterilisasi dengan tekanan uap (autoclave), Timbangan (analitical dan bench top loading), Gelas ukur gradual, Botol kultur dengan penutupnya, Alat diseksi (spatula, scalpel (pinset), forcep, gunting. Distiling unit atau water deionizer, Bahan kimia yang diperlukan untuk pembuatan media

Peralatan gelas yang digunakan di laboratorium kultur jaringan umumnya terbuat dari Pyrex. Erlenmeyer dari berbagai ukuran (50, 125, 250, 500, 1000 atau 2000 ml) digunakan untuk wadah kultur dan pembuatan media. Tabung gelas, cawan petri, botol jam atau bekas selai juga sering digunakan sebagai botol kultur. Peralatan gelas tersebut harus tahan panas selama proses sterilisasi dengan oven atau autoclave. Peralatan gelas lain yang biasanya digunakan

adalah gelas piala, gelas ukur, pipet dan labu ukur.

Berikut adalah contoh gambar alat-alat dan ruangan laboratorium kultur jaringan.

## **Alat-alat yang digunakan dalam kultur**

### **Jaringan spesikasi dan fungsinya**

Peralatan yang digunakan dalam kultur jaringan yaitu sebagai berikut Peralatan gelas, non gelas, pemanas, penimbang dan alat-alat utama lain mendukung sterilisasi yang digunakan dalam kultur jaringan.

#### **a. Peralatan Gelas**

**Tabel 1. Peralatan Gelas**

<b>NO</b>	<b>JENIS ALAT</b>	<b>SPESIFIKASI</b>	<b>FUNGSI</b>
1	Labu ukur	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 2000 ml.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Untuk mengencerkan larutan sampai pada volume tertentu</li></ul>
2	Botol kultur	Panjang Pendek	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sebuah wadah untuk sterilisasi</li><li>• Sebagai media kultur</li><li>• Sebagai media alkohol 90% dan wadah aquades</li></ul>
3	Gelas beker (beaker glass)	Ukuran 50 ml, 10 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Menampung bahan kimia berupa padatan dan larutan, pasta ataupun tepung</li><li>• Melarutkan bahan</li><li>• Memanaskan bahan</li><li>• Mengukur volume larutan secara kasar.</li></ul>

<b>NO</b>	<b>JENIS ALAT</b>	<b>SPEKIFIKASI</b>	<b>FUNGSI</b>
4	Pipet ukur	1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml,	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mengukur volume</li> <li>• Larutan pada berbagai skala/ukuran dengan ketelitian relative tinggi</li> </ul>
5	Pipet tetes (dropper disposable pipet)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mengambil larutan dalam bentuk larutan dalam bentuk larutan</li> <li>• Mengambil/memindahkan larutan tetes demi tetes</li> <li>• Digunakan untuk menambahkan cairan /larutan dalam proses pengenceran</li> </ul>
6	Corong buchner (buchner funnel)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memindahkan bahan dan menyaring larutan dengan pompa vakum</li> </ul>
7	Botol jass		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk menyimpan bahan kimia yang peka terhadap sinar matahari</li> </ul>
8	Botol reagen (reagen bottle)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menaruh larutan bahan kimia</li> </ul>
9	Buret (burette)	Ukuran mikroburet (0.01 ml) dan buret (0.1 ml)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menaruh larutan yang digunakan untuk proses titrasi</li> <li>• Mengukur volume larutan dengan ketelitian tinggi</li> </ul>
10	Tabung reaksi	.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempat mereaksikan dua larutan/bahan kimia atau</li> </ul>

NO	JENIS ALAT	SPESIFIKASI	FUNGSI
			<p>lebih</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempat pengembangan mikroba, misalnya dalam pengujian jumlah bakteri</li> </ul>
11	Gelas arloji (Watch glass)	Ukuran : kecil, sedang, besar.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menaruhbahan yang akan ditimbang terutama untuk bahan padat atau pasta</li> </ul>
12	Gelas ukur(plain chilynder graduate d cylinder)	100 ml, 500 ml, 1000 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• untuk menyimpan dan melarutkan bahan kimia</li> <li>• Mengukur volume larutan/ cairan tepung pada berbagai skala ukuran dengan ketelitian sedang</li> </ul>
13	Jarum oce		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pengambilan sample</li> </ul>
14	Corong gelas untuk tepung ( powder funnel )		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Membantu memindahkan tepung dari wadah yang satu ke wadah yang lain</li> </ul>
15	Cawan martil		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menghaluskan bahan</li> </ul>

### **b. Peralatan Bukan Gelas ( Non Glass Equipment ) Pendukung**

Peralatan bukan gelas diperlukan untuk mendukung penggunaan peralatan lain seperti

peralatan gelas, peralatan untuk Pemanas dan peralatan untuk menimbang misalnya penjepit digunakan untuk menjepit tabung reaksi.

**Table 2 . Berbagai Jenis Peralatan Bukan Gelass**

NO	JENIS ALAT	SPESEFIKASI	FUNGSI
1	Spatula		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mengambil media(sample)</li> <li>• Memindahkan bahan berupa padatan</li> <li>• Membantu memindahkan padatan padatan pada penimbangan</li> </ul>
2	Pinset		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk menjepit/ mengambil bahan</li> <li>• Untuk menahan eksplan</li> </ul>
3	Krus dan penutupnya		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempat sample dalam proses pengabuan</li> </ul>
4	Penjepit krus		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mernjepit botol timbang dan gelass arloji saat menimbang dalam neraca analitik</li> <li>• Menimbang botol timbang dan gelass arloji dari open kedesikator atau sebaliknya</li> </ul>
5	Rak tabung reaksi		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk menaruh tabung reaksi misalnya dalam proses analisis kualitatif</li> </ul>
6	Sikat pembersih tabung		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk membersihkan tabung reaksi, gelass ukur, labu volume dan lain - lain</li> </ul>
7	Penjepit tabung reaksi		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk menjepit tabung reaksi untuk melakukan</li> </ul>

<b>NO</b>	<b>JENIS ALAT</b>	<b>SPESE FIKASI</b>	<b>FUNGSI</b>
			pemanasan atau penggojokan dalam proses reaksi kimia
8	Masker		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Penutup mulut dan hidung agar tidak mengisap dan atau menelan bahan kimia</li> </ul>
9	Sarung tangan		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Melindungi tangan agar tidak terjadi iritasi oleh bahan kimia</li> </ul>
10	Kaca mata pengaman		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Melindungi mata dari bahan yang dapat menimbulkan iritasi</li> </ul>
11	Karet penutup tabung		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menutup botol / tabung secara rapat</li> <li>• Menutup botol/ tabung yang berhubungan dengan botol / tabung yang lainnya</li> </ul>
12	Gunting		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk memotong eksplan ( modifikasi )</li> </ul>
13	Timer		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mengatur waktu</li> </ul>
14	Magnetic stirer		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mengaduk bahansendin ( secara otomatis )</li> </ul>
15	Kertas lakmus		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mengatur Ph</li> </ul>
16	Kulkas		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk megkondisikan stok agar tetap stabil</li> </ul>
17	PH meter		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mengukur drajat keasaman</li> </ul>
18	Botol semprot		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk membilas/ menambah tetesan</li> </ul>

NO	JENIS ALAT	SPESEIFIKASI	FUNGSI
19	Teko plastic		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk tempat menuangkan bahan media kedalam botol kultur</li> </ul>
20	Karet piler		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untuk mengambil larutan</li> <li>• Untuk membuang gas</li> <li>• Untuk menghisap</li> <li>• Untuk mengurangi gas</li> </ul>

### c. Peralatan Pemanas ( Hetting Equipment )

Pemanas digunakan untuk kegiatan di dalam laboratorium seperti pemanas dan pendidihan solven membantu melarutkan bahan kimia

**Table 3. Jenis Alat Peralatan Pemanas**

NO	JENIS ALAT	SPESEIFIKASI	FUNGSI
1	Hoot plate		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memanaskan soplan dalam prose analisa air dan lemak</li> <li>• Memanaskan aquades atau pelarutan lainnya dalam pembuat</li> </ul>
2	Bun ssen bunner		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memanaskan aquades atau peralatan lainnya dalam pembuatan larutan, analisa air dan lemak</li> <li>• Membantu mengkondisikan steril pada proses inokualasi</li> </ul>
3	Oven		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mengeringkan peralatan sebelum digunakan</li> <li>• Sterilisasi alat</li> </ul>

NO	JENIS ALAT	SPESEFI KASI	FUNGSI
			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mengeringkan bahan pada proses penentuan kadar air</li> </ul>
4	Lampu spirtus		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memanaskan aquades atau pelarutan lainnya dalam pembuatan larutan dan lemak</li> <li>• Membantu mengkondisikan steril pada proses inokulasi</li> </ul>
5	Tanur pengabuan (muffle)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pemanasan dalam menggunakan suhu tinggi sampai dengan 1000 Oc untuk analisis kadar abu</li> <li>• Pengabuan sebagai dasr atau analisis mineral</li> </ul>

#### d. Neraca Untuk Menimbang

Secara garis besar timbang yang digunakan dibedakan menjadi timbang kasar, sedang dan halus. Timbang kasar dengan ketelitian kurang atau sama dengan 0,1 gr timbang sedang ketelitian antara 0,01 gr – 0,001 dan timbangan halus dengan ketelitian lebih besar atau sama dengan 0,0001 gr contoh peralatan untuk menimbang yang digunakan dilaboratorium.

**Table 4. Contoh peralatan untuk menimbang yang digunakan dilaboratorium**

NO	JENIS ALAT	SPESEFI IKASI	FUNGSI
1	Neraca kaca		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menimbang bahan dengan</li> </ul>

NO	JENIS ALAT	SPESIFIKASI	FUNGSI
	(travel beam)		ketelitian rendah ( 0,1 g ) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menimbang bahan kimia dalam proses pembuatan larutan untuk uji kualitatif</li> </ul>
2	Neraca sedang		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menimbang bahan dengan ketelitian rendah ( 0,01 – 0,001 g )</li> <li>• Menimbang bahan kimia dalam proses pembuatan larutan namun bukan yang digunakan untuk standarisasi</li> </ul>
3	Neraca analitik (sartorius)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menimbang bahan dengan ketelitian hingga 0,001 g</li> <li>• Menimbang bahan kimia dan proses pembuatan larutan untuk uji kuantitatif proses standarisasi</li> <li>• Menimbang sample / bahan dalam analisis kuantitatif</li> </ul>

### **Bahan – bahan yang diperlukan dalam kultur jaringan**

No	Bahan Sterilisasi	Fungsi
1	Deterjen	Membersihkan kotoran/debu dari eksplan
2	Fungisida	Membersihkan jamur/cendawan
3	Bakterisida	Membersihkan bakteri
4	Alkohol 70 % dan 95 %	Desinfektan
5	Sodium hipoklorit (Clorox/Bayclin)	Desinfektan

6	Mercury chlorit (sublimat 0,05 %)	Desinfektan
7	Tween-20	Agen pembasah
8	Antibiotik	Desinfektan
9	Iodine/betadine	Antiseptik

#### e. Neraca Untuk Menimbang

Secara garis besar timbang yang digunakan dibedakan menjadi timbang kasar, sedang dan halus. Timbang kasar dengan ketelitian kurang atau sama dengan 0,1 gr timbang sedang ketelitian antara 0,01 gr – 0,001 dan timbangan halus dengan ketelitian lebih besar atau sama dengan 0,0001 gr contoh peralatan untuk menimbang yang digunakan dilaboratorium. Adapun **alat-alat khusus yang digunakan dalam kultur Jaringan sebagai berikut:**

- (1) **Laminar Air Flow Cabinet(LAFC)** : Alat ini letaknya diruang penabur, yaitu ruang yang selalu harus dalam keadaan steril. alat ini digunakan sebagai tahap perlakuan penanaman.
- (2) Entkas : Merupakan bentuk lama dari alat penabur (LAFC), maka fungsinya pun sama seperti (LAFC)
- (3) **Shaker** (penggojok) : Merupakan alat penggojok yang putarannya dapat diatur menurut kemauan kita. Penggojok ini dapat digunakan untuk keperluan menumbuhkan

kalus pada eksplan anggrek atau untuk membentuk protokormusatau sering disebut *plb* (protocorm like bodies) dari kalus bermacam jaringan tanaman.

- (4) **Autoklaf** : Autoklaf adalah alat sterilisasi untuk alat dan medium kultur jaringan tanaman.
- (5) **Timbangan Analitik** : Jenis alat ini bermacam-macam, tetapi yang penting adalah timbangan yaang dapat dipergunakan untuk menimbang sampai satuan yang sangat keil. Alat ini berfungsi sebagai alat untuk menimbang bahan-bahan kimia yang digunakan untuk kultur jaringan.
- (6) **Stirer** : Alat ini berfungsi untuk menggojok dengan pemanas. Dengan menggunakan listrik, alat ini berfungsi sebagai kompor disamping sebagai penggojok.
- (7) **Erlenmeyer** : Alat ini digunakan dalama kultur jaringan tanaman sebagai sarana mmenuangkan air suling maupun untuk tempat media dan penanaman eksplan.
- (8) **Gelas Ukur** : Gelas ukur digunakan untuk menakar air suling dan bahan kimia yang akan digunakan.
- (9) **Gelas Piala** : Alat ini digunakan untuk menuangkan atau mempersiapkan bahan kimia dan air suling dalam pembuatan medium.

- (10) **Petridish** : Alat ini merupakan semacam jenis gelas piala yang mutlak dibutuhkan dalam kultur jaringan.
- (11) Pinset dan Scalpel : Pinset digunakan untuk memegang atau mengambil irisan eksplan atau untuk menanam eksplan.
- (12) **Lampu Spiritus**: Digunakan untuk sterilisasi *dissecting kit* (skalpel dan pinset) di dalam laminar air flow cabinet atau di dalam enkas pada kita mengerjakan penanaman atau *sub-culture*.
- (13) Tabung Reaksi : Alat ini digunakan pada saat mengerjakan isolasi protoplas dan isolasi khloroplas.<sup>1</sup>



Gambar 2.1 : Laboratorium kultur Jaringan

---

<sup>1</sup>Gunawan, L.W., 1990, *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Laboratorium Kultur Jaringan*, Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi. IPB, Bogor, 304



Gambar 2. 2: Ruang pencucian



Gambar 2. 3: Ruang Preparasi



Gambar 2.4: Ruang Timbang



Gambar 2.5 : Ruang alat-alat dari gelas



Gambar 2. 6 : Ruang inkubasi yang telah ditanami ekspl

### **3. Prosedur Dasar Laboratorium Kultur Jaringan**

Umumnya penggunaan operasional di laboratorium perbanyak tanaman dengan kultur jaringan dapat dipelajari dengan mudah. Hal yang paling perlu diperhatikan adalah akurasi, kebersihan dan keamanan saat bekerja dengan teknik kultur jaringan. Penimbangan pada saat pembuatan media, semua bahan yang ditimbang harus dilakukan dengan hati-hati meskipun untuk pembuatan media dalam skala komersial. Setiap penggunaan timbangan atau alat-alat lain harus memperhatikan instruksi dari pabrikannya.<sup>2</sup>

Jenis timbangan yang sering digunakan di lab antara lain *top-loading balance* dan *analytical*

---

<sup>2</sup><http://patauatau.blogspot.com>

*balance* yang memungkinkan akurasi penimbangan hingga skala milligram. Beberapa persyaratan yang harus diperhatikan agar diperoleh penimbangan yang akurat adalah:

- a. Timbangan harus ditempatkan pada tempat yang keras, stabil, permukaannya rata yang bebas getaran dan kebocoran,
- b. Daerah sekitar penimbangan harus terjaga kebersihannya,
- c. Yang terpenting lagi, penimbangan jangan sampai pernah overload,
- d. Penimbangan disarankan menggunakan wadah atau alas yang ringan atau kertas daripada menempatkan bahan yang ditimbang secara langsung di atas piring timbangan.

Pengukuran cairan atau larutan Peralatan gelas yang mempunyai ukuran seperti gelas piala, erlenmeyer dan pipet diperlukan untuk pembuatan media. Gelas ukur kapasitas 10, 25, 100 dan 1000 ml banyak digunakan untuk mengukur volume, tetapi pengukuran yang lebih akurat diperlukan labu ukur dan pipet. Pengukuran larutan dengan menggunakan pipet dan labu ukur hanya akan akurat apabila bagian dasar dari cekungan antara air dan udara berada tepat pada tanda pengukuran. Penggunaan pipet harus dibantu dengan alat penghisap larutan (pipetor). Jangan pernah menggunakan mulut untuk memipet.

Membersihkan peralatan gelas metode konvensional pencucian peralatan gelas dilakukan

dengan merendam gelas dalam larutan asam kromat yang diikuti pembilasan dengan air kran dan air destilasi. Karena asam kromat dapat menyebabkan korosif, maka cara ini banyak ditinggalkan kecuali untuk peralatan gelas yang terkontaminasi tinggi. Pencucian yang lebih aman adalah dengan air panas ( $>70^{\circ}\text{C}$ ) + sabun, diikuti dengan pembilasan dengan air panas dan air destilasi. Peralatan gelas yang telah dicuci, dikeringkan dalam oven pada suhu  $150^{\circ}\text{C}$  dibungkus dengan aluminium foil, kemudian disimpan dalam lemari tertutup.

Sterilisasi bagian yang sangat penting dalam teknik *in vitro* adalah sterilisasi bahan tanaman dan media dan menjaga kondisi aseptik yang telah dicapai. Bakteri dan jamur adalah dua kontaminan yang paling banyak dijumpai dalam kultur. Spora jamur sangat ringan dan ada disekeliling lingkungan. Apabila spora jamur kontak dengan media kultur dan kondisinya optimal untuk perkecambahan jamur, maka akan terjadi kontaminasi.

a. Sterilisasi Ruang Kultur dan Transfer

Sterilisasi ruang kultur yang paling baik adalah dilakukan dengan penggunaan sinar ultraviolet (UV). Waktu sterilisasi bervariasi tergantung dari ukuran ruang transfer itu sendiri dan harus dilakukan apabila tidak ada kegiatan dalam ruang tersebut. Radiasi UV sangat berbahaya bagi mata dan

kulit. Ruang transfer dapat juga disterilisasi dengan mencuci dan menggosok 1-2 kali setiap bulan dengan bahan anti jamur (fungisida) komersial. Ruang kerja dalam laminar flow biasanya sudah dilengkapi dengan lampu UV, sehingga sterilisasinya dilakukan dengan UV dan diikuti dengan membasuh permukaan tempat bekerja dalam laminar dengan alkohol 95% sebelum mulai bekerja. Ruang kultur harus dibersihkan dengan sabun kemudian dilap dengan Na-hypoklorit 2% (merek komersial seperti Sunclin, Bayclin atau pembersih lantai lain yang mengandung disinfektan) atau alkohol 95%. Lantai ruangan dan dinding harus dibersihkan seminggu sekali dengan bahan yang sama.

b. Sterilisasi Peralatan Gelas dan Peralatan Lain.

Peralatan yang terbuat dari metal, gelas, aluminium foil, dll., dapat disterilisasi dengan cara pengeringan dalam oven pada suhu 130°-170° C selama 2-4 jam. Semua peralatan tersebut harus dibungkus sebelum di oven, tetapi jangan menggunakan kertas karena akan terdekomposisi pada suhu 170° C. Sterilisasi dengan menggunakan autoclave tidak disarankan untuk bahan yang terbuat dari metal karena akan menyebabkan karat. Untuk peralatan diseksi yang akan digunakan pada ruang transfer atau laminar, setelah disterilisasi dalam oven harus

direndam dahulu dalam alkohol 96% kemudian dibakar di atas lampu bunsen. Teknik ini disebut sterilisasi pembakaran (flame sterilization). Teknik ini harus dilakukan dengan ekstra hati-hati karena alkohol sangat mudah terbakar. Autoclave adalah metoda sterilisasi dengan menggunakan tekanan uap air. Bahan-bahan atau alat yang dapat disterilisasi dengan cara autoclave ini antara lain kapas penutup tabung, saringan dari nylon, pakaian lab, tutup plastik, peralatan gelas, pipet, air, dan media kultur. Hampir semua mikroba dapat mati bila diautoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 15 psi selama 15-20 menit.

c. Sterilisasi Media

Ada dua metoda untuk sterilisasi media yang umum digunakan, yaitu dengan autoclave dan filter membran. Media kultur, air destilasi dan campuran yang stabil dapat disterilisasi dalam autoclave dengan menggunakan wadah yang ditutup dengan kapas, aluminium foil atau plastik. Akan tetapi, larutan dari bahan-bahan yang bersifat tidak stabil (heat-labile) harus menggunakan filter. Umumnya media diautoclave pada tekanan 15 psi dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$ . Untuk volume larutan per wadah yang sedikit ( $< 100$  ml), waktu yang dibutuhkan adalah 15-20 menit, tetapi untuk jumlah yang besar (2-4

liter) selama 30-40 menit. Tekanan jangan melebihi dari 20 psi karena dapat mengakibatkan dekomposisi karbohidrat dan bahan lain dalam media yang bersifat thermolabile.

Beberapa senyawa yang tergolong dalam kelompok protein, vitamin, asam amino, ekstrak tanama, hormon dan karbohidrat ada yang bersifat thermolabile yang mungkin akan mengakibatkan dekomposisi bila disterilisasi dengan autoclave, sehingga harus disterilisasi dengan filter. Filter Millipore yang mempunyai porositas  $\pm 0.2$  mikron ( $\mu\text{m}$ ) merupakan salah satu filter yang banyak digunakan untuk sterilisasi bahan yang bersifat thermolabile. Peralatan gelas yang akan menampung media yang disterilisasi dengan filter harus sudah disterilisasi dahulu dengan autoclave.

Media yang sebagian mengandung komponen thermolabile, dapat dibuat dengan cara:

- (1) Larutan yang mengandung komponen heat-stable disterilisasi dengan autoclave, kemudian didinginkan sampai suhu  $50^{\circ}$ - $60^{\circ}$  C pada kondisi steril (biasanya dalam laminar).
- (2) Pada bagian lain dalam kondisi yang steril, larutan yang mengandung komponen

besifat thermolabile disterilisasi dengan filter.

(3) kedua larutan yang sudah disterilisasi dengan metoda yang berbeda tersebut digabungkan dalam kondisi aseptik.

d. Sterilisasi Bahan Tanaman

Mendapatkan bahan tanaman yang steril merupakan hal yang sulit. Meskipun bermacam tindakan pencegahan sudah dilakukan, 95% kultur akan mengalami kontaminasi apabila eksplan tidak didisinfeksi. Organ atau jaringan tanaman harus disterilisasi dengan larutan disinfektan, karena sebagai bahan biologis tidak dapat dilakukan dengan cara pemanasan yang ekstrim.

Tidak ada metoda yang baku untuk sterilisasi eksplan, sehingga waktu perendaman dalam larutan disinfektan merupakan kisaran karena tergantung pada jenis bahan dan tanaman yang akan disterilisasi. Larutan yang digunakan harus yang aman bagi jaringanataueksplan tetapi bersifat dapat membunuh kontaminan baik bakteri maupun jamur. Untuk tanaman berkayu, umbi dll. biasanya sebelum disterilisasi dengan larutan disinfektan harus dibersihkan dahulu dengan sabun dan dibilas dengan air mengalir, tetapi tidak untuk tanaman jenis herbaceous. Semua permukaan eksplan yang disteriliasi harus terendam dalam

sterilan, dan setelahnya harus dibilas dengan akuades steril sekurang-kurangnya tiga kali.

Menentukan pH larutan pH larutan diukur berdasarkan konsentrasi ion hidrogen dalam larutan. Skala pH mulai dari 0 (sangat asam) hingga 14 (sangat basa) dan skala 7 adalah titik netral. pH dari media kultur umumnya diatur  $5.7 \pm 0.1$  sebelum diautoclave. pH dapat memengaruhi kelarutan ion-ion di dalam media, kemampuan agar untuk menjadi gel dan selanjutnya mempengaruhi pertumbuhan sel-sel. Oleh karena itu akurasi pH media menjadi faktor yang penting untk diperhatikan. Umumnya pengukuran pH media menggunakan pH meter.



Gambar 2.7: pH meter



Gambar 2.7 : Ruang timbang



Gambar 2.8: Macam-macam pelarut untuk melarutkan bahan kimiadalam pembuatan larutan stock media



Gambar 2.9 : Ruang Inkubasi Steril yang telah ditanami eksplan



Gambar 2.10 : Ruang Inkubasi Steril yang telah ditanami eksplan



Gambar 2.11 : Ruang Pengamatan data



Gambar 2.12 :  
Shaker untuk menggojok eksplan di medium cair  
untuk bisa mendapatkan suspensi



Gambar 2.13 : Green house yang melengkapi laboratorium kultur jaringan tumbuhan



Gambar 2.14



Gambar 2.15



Gambar 2. 16: Laminar Flow



Gambar 2. 17 : Ruang Tabur



Gambar 2. 18: Macam –macam Oven untuk sterilisasi kering



Gambar 2. 19 :  
Lemari enkast



Gambar 2.20: Autoclave untuk  
sterisasi basah



Gambar 2. 21 : Lemari  
pendingin untuk menyimpan  
stock media

## D. RANGKUMAN

Pengorganisasian disetiap laboratorium dimana teknik kultur jaringan digunakan, harus mempunyai sejumlah fasilitas yang memadai. Fasilitas yang digunakan atau dipersiapkan ini juga mempunyai dampak pada hasil dalam pembuatan dan pembudidayaan kultur jaringan itu sendiri. Adapun fasilitas yang ini diantaranya mencakup berbagai hal, diantaranya adalah: Ruang pencucian., Ruang persiapan, sterilisasi dan penyimpanan. Ruang transfer aseptik. Ruang kultur atau inkubator yang lingkungannya terkontrol. Alat- alat yang digunakan dalam praktek kultur jaringan: **Laminar Air Flow Cabinet(LAFC)** : Alat ini letaknya diruang penabur, yaitu ruang yang selalu harus dalam keadaan steril. alat ini digunakan sebagai tahap perlakuan penanaman. Entkas : Merupakan bentuk lama dari alat penabur (LAFC), maka fungsinya pun sama seperti (LAFC) **Shaker** (penggojok) : Merupakan alat penggojok yang putarannya dapat diatur menurut kemauan kita. Penggojok ini dapat digunakan untuk keperluan menumbuhkan kalus pada eksplan anggrek atau untuk membentuk protokormusatau sering disebut *plb* (protocorm like bodies) dari kalus bermacam jaringan tanaman. **Autoklaf** : Autoklaf adalah alat sterilisasi untuk alat dan medium kultur jaringan tanaman. **Timbangan Analitik** : Jenis alat ini bermacam-macam, tetapi yang penting adalah timbangan yaang dapat dipergunakan untuk menimbang sampai satuan yang sangat keil. Alat ini

berfungsi sebagai alat untuk menimbang bahan-bahan kimia yang digunakan untuk kultur jaringan.

**Stirer** : Alat ini berfungsi untuk menggojok dengan pemanas. Dengan menggunakan listrik, alat ini berfungsi sebagai kompor disamping sebagai penggojok.

**Erlenmeyer** : Alat ini digunakan dalam kultur jaringan tanaman sebagai sarana menuangkan air suling maupun untuk tempat media dan penanaman eksplan

**Gelas Ukur** : Gelas ukur digunakan untuk menakar air suling dan bahan kimia yang akan digunakan.

**Gelas Piala** : Alat ini digunakan untuk menuangkan atau mempersiapkan bahan kimia dan air suling dalam pembuatan medium.

**Petridish** : Alat ini merupakan semacam jenis gelas piala yang mutlak dibutuhkan dalam kultur jaringan.

**Pinset dan Scalpel** : Pinset digunakan untuk memegang atau mengambil irisan eksplan atau untuk menanam eksplan.

**Lampu Spiritus**: Digunakan untuk sterilisasi *dissecting kit* (skalpel dan pinset) di dalam laminar air flow cabinet atau di dalam enkas pada kita mengerjakan penanaman atau *sub-culture*.

**Tabung Reaksi** : Alat ini digunakan pada saat mengerjakan isolasi protoplas dan isolasi kloroplas.

Prosedur Dasar Laboratorium Kultur Jaringan yang memenuhi standart baku. Umumnya penggunaan operasional di laboratorium perbanyak tanaman dengan kultur jaringan dapat dipelajari dengan mudah. Hal yang paling perlu diperhatikan adalah akurasi, kebersihan dan keamanan saat bekerja dengan teknik kultur jaringan.

Penimbangan pada saat pembuatan media, semua bahan yang ditimbang harus dilakukan dengan hati-hati meskipun untuk pembuatan media dalam skala komersial. Setiap penggunaan timbangan atau alat-alat lain harus memperhatikan instruksi dari pabrikannya

#### **E. SOAL DAN JAWABAN**

Pertanyaan – pertanyaan.

Jawablah pertanyaan pertanyaan di bawah ini dengan jelas.!

1. Jelaskan bagaimana Pengorganisasian Laboratorium Kultur Jaringan!
2. Sebutkan ada berapa fasilitas ruang untuk laboratorium kultur jaringan.
3. Sebutkan alat- alat yang digunakan dalam praktek kultur jaringan?
4. Bagaimana Prosedur Dasar Laboratoirum Kultur Jaringan yang memenuhi standart baku.

#### **JAWABAN :**

1. Pengorganisasian disetiap laboratorium dimana teknik kultur jaringan digunakan, harus mempunyai sejumlah fasilitas yang memadai. Fasilitas yang digunakan atau dipersiapkan ini juga mempunyai dampak pada hasil dalam pembuatan dan pembudidayaan kultur jaringan itu sendiri.
2. Adapun fasilitas yang ini diantaranya mencakup berbagai hal, diantaranya adalah:Ruang pencucian.,Ruang persiapan, sterilisasi dan penyimpanan.Ruang transfer aseptik.Ruang

kultur atau inkubator yang lingkungannya terkontrol.

3. Alat- alat yang digunakan dalam praktek kultur jaringan
  - (1) **Laminar Air Flow Cabinet(LAFC)** : Alat ini letaknya diruang penabur, yaitu ruang yang selalu harus dalam keadaan steril. alat ini digunakan sebagai tahap perlakuan penanaman.
  - (2) Entkas : Merupakan bentuk lama dari alat penabur (LAFC), maka fungsinya pun sama seperti (LAFC)
  - (3) **Shaker** (penggojok) : Merupakan alat penggojok yang putarannya dapat diatur menurut kemauan kita. Penggojok ini dapat digunakan untuk keperluan menumbuhkan kalus pada eksplan anggrek atau untuk membentuk protokormusatau sering disebut *plb* (protocorm like bodies) dari kalus bermacam jaringan tanaman.
  - (4) **Autoklaf** : Autoklaf adalah alat sterilisasi untuk alat dan medium kultur jarinang tanaman.
  - (5) **Timbangan Analitik** : Jenis alat ini bermacam-macam, tetapi yang penting adalah timbanagn yaang dapat dipergunakan untuk menimbang sampai satuan yang sangat keil. Alat ini berfungsi sebagai alat untuk menimbang bahan-bahan kimia yang digunakan untuk kultur jaringan.

- (6) **Stirer** : Alat ini berfungsi untuk menggojok dengan pemanas. Dengan menggunakan listrik, alat ini berfungsi sebagai kompor disamping sebagai penggojok.
- (7) Erlenmeyer : Alat ini digunakan dalam kultur jaringan tanaman sebagai sarana menuangkan air suling maupun untuk tempat media dan penanaman eksplan.
- (8) **Gelas Ukur** : Gelas ukur digunakan untuk menakar air suling dan bahan kimia yang akan digunakan.
- (9) **Gelas Piala** : Alat ini digunakan untuk menuangkan atau mempersiapkan bahan kimia dan air suling dalam pembuatan medium.
- (10) **Petridish** : Alat ini merupakan semacam jenis gelas piala yang mutlak dibutuhkan dalam kultur jaringan.
- (11) Pinset dan Scalpel : Pinset digunakan untuk memegang atau mengambil irisan eksplan atau untuk menanam eksplan.
- (12) **Lampu Spiritus**: Digunakan untuk sterilisasi *dissecting kit* (skalpel dan pinset) di dalam laminar air flow cabinet atau di dalam enkas pada kita mengerjakan penanaman atau *sub-culture*.
- (13) Tabung Reaksi : Alat ini digunakan pada saat mengerjakan isolasi protoplas dan isolasi khloroplas.

4. **Prosedur Dasar Laboratoirum Kultur Jaringan**  
Prosedur Dasar Laboratoirum Kultur Jaringan yang memenuhi standart baku. Umumnya penggunaan operasional di laboratorium perbanyak tanaman dengan kultur jaringan dapat dipelajari dengan mudah. Hal yang paling perlu diperhatikan adalah akurasi, kebersihan dan keamanan saat bekerja dengan teknik kultur jaringan. Penimbangan pada saat pembuatan media, semua bahan yang ditimbang harus dilakukan dengan hati-hati meskipun untuk pembuatan media dalam skala komersial. Setiap penggunaan timbangan atau alat-alat lain harus memperhatikan instruksi dari pabrikannya.

## **BAB III**

### **TAHAP PERSIAPAN DALAM KULTUR JARINGAN**

#### **A. PENDAHULUAN**

Pembudidayaan tanaman merupakan kegiatan yang banyak digemari orang, baik itu tanaman hias, tanaman pangan, tanaman untuk bahan bangunan dan jenis tanaman yang lain. Biasanya pembudidayaan ini memerlukan waktu yang lama karena kebanyakan juga harus menunggu induknya untuk dapat menghasilkan bibit atau tunasnya yang dapat dipergunakan untuk proses pembudidayaan.

Pada zaman sekarang, dengan kemajuan teknologi, para Ilmuwan melakukan eksperimen untuk mengatasi waktu pembudidayaan yang relative lama, akhirnya dewasa ini ditemukan adanya proses kultur jaringan. Kultur jaringan ini mempunyai waktu yang relative singkat dan dapat menggunakan semua bagian tanaman untuk pembudidayaan, tapi kultur jaringan memerlukan biaya yang cukup mahal sehingga belum banyak yang menggunakan cara ini.

#### **B. POKOK BAHASAN**

1. Pengertian Kultur Jaringan.
2. Tahap-Tahap Persiapan Dalam Kultur Jaringan.
3. Manfaat kultur jaringan.

## **C. PEMBAHASAN**

### **1. Pengertian Kultur Jaringan**

Kultur jaringan merupakan salah satu cara memperbanyak tanaman secara vegetatif. Kultur jaringan merupakan teknik memperbanyak tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah memperbanyak tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril.

Metode kultur jaringan dikembangkan untuk membantu memperbanyak tanaman, khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangbiakkan secara generatif. Bibit yang dihasilkan dari kultur jaringan mempunyai beberapa keunggulan, antara lain: mempunyai sifat yang identik dengan induknya, dapat diperbanyak dalam jumlah yang besar sehingga tidak terlalu membutuhkan tempat yang luas, mampu menghasilkan bibit dengan jumlah besar dalam waktu yang singkat, kesehatan dan mutu bibit lebih terjamin, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibandingkan

dengan perbanyakan konvensional. Berikut adalah contoh gambar 1 kultur jaringan dalam media di dalam botol.



Gambar 3.1: kultur jaringan dalam media dalam botol  
<http://beemaardany.files.wordpress.com/2010/05/hasil-kultur2.jpg>

## 2. Tahap Persiapan Dalam Kultur Jaringan

Tahapan ini dilakukan sebelum eksplan diambil untuk perbanyakan. Pohon induk yang akan digunakan sebagai sumber eksplan harus dipilih secara hati-hati. Pohon ini adalah pohon dari spesies atau varietas yang akan diperbanyak, mempunyai vigor yang sehat dan bebas dari gejala serangan hama atau penyakit. Kadang-kadang pohon induk atau bagian tanaman yang akan diambil sebagai eksplan perlu diperlakukan khusus agar mikropropagasi berhasil. Perlakuan-perlakuan tersebut antara lain :

- a. Penanaman di green house atau pot (gambar 2) untuk mengurangi sumber kontaminan,



Gambar 3.2 : Greenhouse  
<http://blogs.unpad.ac.id/nurajengfitrihandayani/files/2010/06/images/GH3.jpg>

- b. Pemberian lingkungan yang sesuai atau perlakuan kimia untuk meningkatkan kecepatan multiplikasi dalam kondisi in-vitro (gambar 3),
- c. Indexing atau prosedur lain untuk mengetahui adanya penyakit sistemik oleh virus atau bakteri,
- d. Perangsangan pertumbuhan tunas-tunas dorman, dll.<sup>3</sup>

Pada permulaan pengerjaan kultur jaringan problem terbesar yang dihadapi adalah mengatasi kontaminasi. Tempat pengambilan eksplan sangat berpengaruh besarnya resiko kontaminasi oleh infeksi jamur. Eksplan yang diambil dari rumah kaca yang terjamin kondisi kehegienisannya akan jauh dapat mengurangi resiko terkontaminasi oleh infeksi jamur dibanding bila eksplan diambil dari lapangan. Namun ada yang lebih sulit untuk menghindari kontaminasi terhadap bakteri, karena sering sulit untuk membedakan apakah kontaminasi tersebut berasal dari bakteri endogin atau eksogin.

Idialnya tanaman induk yang akan dijadikan sebagai eksplan sebaiknya ditanam di dalam rumah kaca yang terjaga kehegienisannya. Ini tidak hanya dapat mereduksi populasi jumlah mikroorganisme yang hidup di permukaan

---

<sup>3</sup>*Ibid*, hlm. 309

tanaman, tetapi juga membantu untuk memproduksi tanaman berkualitas.

Pada tahap ini termasuk juga beberapa intervensi yang dapat membuat eksplan lebih sesuai atau lebih siap sebagai material awal. Faktor-faktor yang berpengaruh dalam tanaman induk kultur jaringan adalah cahaya, temperatur dan zat pengatur tumbuh.

Cahaya. Pada tanaman petunia yang diberi perlakuan cahaya sinar merah dengan panjang gelombang 640-700 nm pada sore hari dapat memacu pertumbuhan percabangan sedangkan pada tanaman yang disinari dengan panjang gelombang 700-795 nm menyebabkan pertumbuhan tumbuhan tunas terminal yang tegak dan tidak menghasilkan tunas horizontal. Lebih jauh, jika helaian daunnya digunakan sebagai eksplan pada perlakuan panjang gelombang 640-700 nm akan dapat memproduksi lebih banyak tunas per eksplan dibandingkan pada eksplan yang berasal dari tanaman yang diberi perlakuan dengan panjang gelombang 700-795 nm.<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup>Katuuk, J. R. P., 1989, *Teknik Kultur Jaringan Dalam Mikropropagasi Tanaman*, **Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Perguruan Tinggi, Proyek Pengembangan** Lembaga Pendidikan Tenaga Kependidikan, Jakarta, 3 - 6.

Temperatur. Umbi lapis (bulbus) tanaman kebanyakan mengalami dormansi, untuk memecahkan dormansi dan memacu pertumbuhan perlu adanya perlakuan penyimpanan di dalam ruang dingin dengan temperatur 4o C untuk umbi bunga lili. Perlakuan temperatur dingin juga dapat memacu pertumbuhan anak umbi (bulblet) yang lebih berat pada tanaman hyacin setelah disimpan selama 70 hari pada suhu 15o C.

Zat pengatur tumbuh. Adanya BA pada perkecambahan biji *Brassica campestris*, dapat menyebabkan kotiledon yang diambil dari perkecambahan tersebut akan lebih mudah melakukan regenerasi lebih efisien. Untuk menambah respon eksplan tanaman kayu, tanaman induk dapat diperlakukan dengan larutan sucrose, 8-hydroxyquinoline citrate, BA dan GA3.<sup>5</sup>

### **3. Manfaat Kultur Jaringan**

Kegunaan utama dari kultur jaringan adalah untuk mendapatkan tanaman baru dalam jumlah banyak dalam waktu yang relatif singkat, yang mempunyai sifat fisiologi dan morfologi sama persis dengan induknya. Dari teknik kultur jaringan tanaman ini diharapkan juga

---

<sup>5</sup>Sriyanti, D.P. dan A.Wijayani, 1994, *Teknik Kultur Jaringan*, Yayasan Kansius. Yogyakarta, 18, 54, 57, 63, 67, 69, 82-83.

memperoleh tanaman baru yang bersifat unggul. Secara lebih rinci dan jelas berikut ini akan dibahas secara khusus kegunaan dari kultur jaringan terhadap berbagai ilmu pengetahuan.<sup>6</sup>

Perbanyak tanaman secara besar-besaran telah dibuktikan keberhasilannya pada perkebunan kelapa sawit dan tebu. Dengan cara kultur jaringan dapat *klon* suatu komoditas tanaman dalam relatif cepat. Manfaat yang dapat diperoleh dari kloning ini cukup banyak, misalnya: di luar pulau Jawa akan didirikan suatu perkebunan yang membutuhkan bibit tanaman dalam jumlah ribuan, maka sudah dapat dibayangkan betapa mahal biaya hanya untuk transportasi saja. Hal ini dapat diatasi dengan usaha kloning melalui budaya jaringan, karena hanya perlu membawa beberapa puluh botol *planlet* yang berisi ribuan bibit. Dengan cara ini dapat menghemat waktu dan biaya yang cukup banyak dalam persiapan pemberangkatan ataupun transportasinya. Pada ekspor anggrek, misalnya, orang luar negeri menghendaki bunga anggrek yang seragam baik bentuk maupun warnanya. Dalam hal ini dapat dipenuhi juga dengan usaha kloning. Bibit-bibit tanaman dari usaha *mericlono* (tanaman hasil budidaya meristem) akan berharga lebih mahal, karena

---

<sup>6</sup>*Op. Cit.*, Katuuk, R. J. P, hlm: 15

induknya dipilih dari tanaman yang mempunyai sifat paling bagus (unggul).

Kultur jaringan tanaman telah dikenal banyak orang sebagai usaha mendapatkan varietas baru (unggul) dari suatu jenis tanaman dalam waktu yang relatif lebih singkat dari pada dengan cara pemuliaan tanaman yang harus dilakukan penanaman secara berulang-ulang sampai beberapa generasi. Untuk mendapatkan varietas baru melalui kultur jaringan dapat dilakukan dengan cara isolasi protoplas dari 2 macam varietas yang difusikan. Atau dengan cara isolasi khloroplas suatu jenis tanaman yang dimasukkan kedalam protoplas jenis tanaman yang lain, sehingga terjadi penggabungan sifat-sifat yang baik dari kedua jenis tanaman tersebut hingga terjadi hibrid somatik. Cara yang lain adalah dengan menyuntikkan protoplas dari suatu tanaman ketanaman lain. Contohnya transfer khloroplas dari tanaman tembakau berwarna hijau ke dalam protoplas tanaman tembakau yang albino, hasilnya sangat memuaskan karena tanaman tembakau menjadi hijau pula. Contoh lain adalah keberhasilan mentransfer khloroplas dari tanaman jagung ke dalam protoplas tanaman tebu hasilnya memuaskan.<sup>7</sup>

---

<sup>7</sup><http://hamdan-motor.blogspot.com/2008/07/kultur-jaringan.html>

Kelebihannya tidak memerlukan tempat yang luas. Untuk memperbanyak tanaman tertentu yang sulit atau lambat diperbanyak secara konvensional. Dapat dilakukan sepanjang tahun tidak mengenal musim. Bibit yang dihasilkan lebih sehat dan seragam. Memungkinkan dilakukannya manipulasi genetik. Stok tanaman dapat disimpan dalam waktu lama. Kelemahan dibutuhkan keahlian khusus untuk melaksanakannya. Dibutuhkan biaya awal yang relatif tinggi untuk laboratorium dan bahan kimia. Tanaman yang dihasilkan berukuran kecil, aseptik, dan biasa hidup di tempat yang berkelmbaban tinggi sehingga memerlukan aklimatisasi ke lingkungan eksternal. Metode setiap spesies tidak sama. Manfaat produksi tanaman bebas pathogen produksi bahan-bahan farmasi pelestarian plasma nutfah pemuliaan tanaman dan rekayasa genetika memperbanyak tanaman klonal dengan cepat.

#### **D. RANGKUMAN**

Kultur jaringan merupakan salah satu cara memperbanyak tanaman secara vegetatif. Kultur jaringan merupakan teknik memperbanyak tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap. Kelebihannya tidak

memerlukan tempat yang luas. Untuk memperbanyak tanaman tertentu yang sulit atau lambat diperbanyak secara konvensional. Dapat dilakukan sepanjang tahun tidak mengenal musim. Bibit yang dihasilkan lebih sehat dan seragam. Memungkinkan dilakukannya manipulasi genetik. Stok tanaman dapat disimpan dalam waktu lama. Kelemahan dibutuhkan keahlian khusus untuk melaksanakannya. Dibutuhkan biaya awal yang relatif tinggi untuk laboratorium dan bahan kimia. Tanaman yang dihasilkan berukuran kecil, aseptik, dan biasa hidup di tempat yang berkelembaban tinggi sehingga memerlukan aklimatisasi ke lingkungan eksternal. Metode setiap spesies tidak sama. Manfaat produksi tanaman bebas patogen produksi bahan-bahan farmasi pelestarian plasma nuftah pemuliaan tanaman dan rekayasa genetika perbanyak tanaman klonal dengan cepat.

1. Perlakuan-perlakuan tersebut antara lain :
  - a. Penanaman di green house atau pot untuk mengurangi sumber kontaminan,
  - b. Pemberian lingkungan yang sesuai atau perlakuan kimia untuk meningkatkan kecepatan multiplikasi dalam kondisi in-vitro,
  - c. Indexing atau prosedur lain untuk mengetahui adanya penyakit sistemik oleh virus atau bakteri,
  - d. Perangsangan pertumbuhan tunas-tunas dorman, dll.

2. Kegunaan utama dari kultur jaringan adalah untuk mendapatkan tanaman baru dalam jumlah banyak dalam waktu yang relatif singkat, yang mempunyai sifat fisiologi dan morfologi sama persis dengan induknya. Dari teknik kultur jaringan tanaman ini diharapkan juga memperoleh tanaman baru yang bersifat unggul.

## **E. LATIHAN SOAL DAN JAWABAN**

### **Pertanyaan- pertanyaan**

**Jawablah pertanyaan dibawah ini dengan jelas.**

1. Jelaskan apa yang dimaksud dengan kultur jaringan ?
2. Sebutkan keuntungan dan kerugian bertanam dengan kultur jaringan!
3. Jelaskan bagaimana Tahap-tahap persiapan dari kultur jaringan!
4. Jelaskan fungsi dari zat pengatur tumbuh yang termasuk auksin.
5. Sebutkan macam-macam zat pengatur tumbuh dna fungsinya masing-masing.

### **Soal dan Jawaban:**

1. **Kultur jaringan yaitu *Kultur jaringan*** berasal dari kata *Kultur* adalah budidaya dan *jaringan* adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Jadi, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya. Kultur jaringan merupakan salah satu cara vegetatif

dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun , mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik pula yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya, sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap.

- 2. Keuntungan dan kekurangannya.** Manfaat dari teknik kultur jaringan tanaman ini diharapkan juga memperoleh tanaman baru yang bersifat unggul. Adapun keuntungannya yaitu : Pengadaan bibit tidak tergantung pada musim. Bibit dapat diproduksi dalam jumlah banyak dengan waktu yang relatif cepat. Bibit yang dihasilkan seragam dan bebas penyakit. Pengangkutan bibit lebih murah dan mudah. Perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan dilaksanakan dalam suatu laboratorium yang aseptik dengan peralatan seperti pada laboratorium Mikrobiologi dilengkapi dengan alat- alat khusus contoh *Laminar Air Flow Cabinet(LAFC)*. Kerugiannya biaya pembuatan bibitnya sangat mahal. Kelebihannya tidak memerlukan tempat yang luas. Kelemahan dibutuhkan keahlian khusus untuk melaksanakannya. Dibutuhkan biaya awal yang relatif tinggi untuk laboratorium dan bahan kimia. Tanaman yang dihasilkan berukuran kecil, aseptik, dan biasa hidup di tempat yang berkelmbaban tinggi sehingga memerlukan

aklimatisasi ke lingkungan eksternal. Metode setiap spesies tidak sama. Manfaat produksi tanaman bebas pathogen produksi bahan-bahan farmasi pelestarian plasma nuftah pemuliaan tanaman dan rekayasa genetika perbanyak tanaman klonal dengan cepat.

**3. Tahap-tahap persiapan dari kultur jaringan**

Tahapan ini dilakukan sebelum eksplan diambil untuk perbanyak. Pohon induk yang akan digunakan sebagai sumber eksplan harus dipilih secara hati-hati. Pohon ini adalah pohon dari spesies atau varietas yang akan diperbanyak, mempunyai vigor yang sehat dan bebas dari gejala serangan hama atau penyakit. Kadang-kadang pohon induk atau bagian tanaman yang akan diambil sebagai eksplan perlu diperlakukan khusus agar mikropropagasi berhasil. Perlakuan-perlakuan tersebut antara lain

- a. Penanaman di green house atau potuntuk mengurangi sumber kontaminan,
  - b. Pemberian lingkungan yang sesuai atau perlakuan kimia untuk meningkatkan kecepatan multiplikasi dalam kondisi in-vitro.
  - c. Indexing atau prosedur lain untuk mengetahui adanya penyakit sistemik oleh virus atau bakteri,
  - d. Perangsangan pertumbuhan tunas-tunas dorman
- 4. Fungsi bormon auksin** Hormon auksin didalam tubuh tanaman dihasilkan oleh pucuk-pucuk

batang, cabang, ranting-ranting yang menyebar keseluruh tubuh tanaman. Penyebaran auksin ini arahnya dari atas ke bawah sampai titik tumbuh akar, melalui jaringan ploidem atau jaringan parenkim. Oleh karena itu pada teknik kultur jaringan digunakan jaringan meristem, sebab pada jaringan ini terdapat hormon pengatur pembelahan sel sehingga keadaannya selalu membelah. Penambahan auksin dimaksud membantu pembelahan sel. Plantlet akan tumbuh dari kalus setelah dipindah dari medium diferensiasi. Apabila mediumnya cocok maka akan terjadi organogenesis terbentuk akar atau tunas yang selanjutnya akan terjadi embriogenesis dengan mengadakan perubahan kandungan hormon pengatur tumbuh.

5. **Macam- macam zat pengatur tumbuh yaitu :** Hormon pengatur tumbuh dapat dibedakan menjadi beberapa golongan yaitu: Auksin, Sitokinin, dan golongan geberelin dan inhibitor. Golongan auksin yaitu Indol Asam Asetat (IAA), Indol Asam Butirat (IBA), Naftalin Asam Asetat (NAA), dan 2,4 D Dikloro Fenol Asetat (2,4-D). Zat tumbuh yang tergolong Sitokinin adalah Kinetin Zeatin, Ribosil dan Bensil Aminopurin (BAP). Zat Pengatur yang termasuk Geberelin antara lain adalah GA1, GA2, GA3, GA4. Sedangkan zat pengatur tumbuh inhibitor antara lain adalah fenolik dan asam abisik.

## **BAB IV**

### **PEMILIHAN DAN STERILISASI EKSPLAN**

#### **A. PENDAHULUAN**

Dari semua sumber kontaminasi, kontaminasi dari bahan tanam/eksplan merupakan yang paling sulit diatasi. Untuk itu diperlukan bahan sterilan yang tepat untuk menghilangkan kontaminan dari eksplan. Kontaminan hidup dapat berupa cendawan, bakteri, serangga dan telurnya, tungau serta spora. Bila kontaminan ini tidak dihilangkan, maka pada media yang mengandung gula, vitamin dan mineral, dalam waktu singkat seluruh botol terpenuhi oleh kontaminan yang akhirnya mengakibatkan eksplan menjadi mati. Hal itu juga sesuai dengan ajaran islam yang menyuruh untuk membersihkan diri.

﴿المُطَهَّرِينَ تَحِبُّوَاللَّهُ...﴾

... dan Sesungguhnya Allah menyukai orang-orang yang bersih....(QS. At-Taubah: 108) <sup>8</sup>

#### **B. POKOK BAHASAN**

1. Pengertian pemilihan, sterilisasi dan eksplan.
2. Macam-macam sterilisasi.
3. Cara pemilihan eksplan.
4. Proses sterilisasi eksplan.

---

<sup>8</sup> Departemen Agama RI, *Al Quran dan Terjemahannya*, (Jakarta : Darus Sunnah, 2002), hlm.205.

## C. PEMBAHASAN

### 1. Pengertian Pemilihan, Sterilisasi dan Eksplan

Sterilisasi yaitu membebaskan tiap benda atau substansi dari semua kehidupan dalam bentuk apapun.<sup>9</sup>

Eksplan adalah bagian tanaman yang dipergunakan sebagai bahan awal untuk memperbanyak tanaman.<sup>10</sup>

### 2. Macam-Macam Sterilisasi

Pada prinsipnya sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu secara mekanik, fisik dan kimiawi.

- a. Sterilisasi secara mekanik (filtrasi) menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil (0.22 mikron atau 0.45 mikron) sehingga mikroba tertahan pada saringan tersebut. Proses ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik.
- b. Sterilisasi secara fisik dapat dilakukan dengan pemanasan & penyinaran.
  - Pemanasan
    - 1) Pemijaran (dengan api langsung): membakar alat pada api secara langsung, contoh alat : jarum inokulum, pinset, dll.

---

<sup>9</sup>Koes Iryanto, *Mikrobiologi: Menguk Dunia Mikroorganisme*, (Bandung : Yrama Widya, 2006), hlm.75.

<sup>10</sup>[http://www.situshijau.co.id/tulisan.php?act=detail&id=113&id\\_kolom=13](http://www.situshijau.co.id/tulisan.php?act=detail&id=113&id_kolom=13)



- 2) Panas kering: sterilisasi dengan oven kira-kira  $60-180^{\circ}\text{C}$ . Sterilisasi panas kering cocok untuk alat yang terbuat dari kaca misalnya erlenmeyer, tabung reaksi dll.



- 3) Uap air panas: konsep ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air lebih tepat menggunakan metode ini supaya tidak terjadi dehidrasi.
- 4) Uap air panas bertekanan : menggunakan autoklaf



- Penyinaran dengan UV  
Sinar Ultra Violet juga dapat digunakan untuk proses sterilisasi, misalnya untuk membunuh mikroba yang menempel pada permukaan interior Safety Cabinet dengan disinari lampu UV
- c. Sterilisasi secara kimiawi.<sup>11</sup>
- Banyak bahan kimia yang bersifat menghambat metabolisme sel mikrobia atau

---

<sup>11</sup><http://ekmon-saurus.blogspot.com/2008/11/bab-3-sterilisasi.html>

merusak komponen sel sehingga dapat menghambat atau mematikan mikrobia. Berdasarkan kekuatan dalam memusnahkan mikrobia agensi kimia digolongkan sebagai berikut:

- (1) Agensi kimia berkhasiat tinggi ialah mampu mematikan semua jenis mikrobia termasuk endospora.
- (2) Agensi kimia berkhasiat menengah ialah agensi kimia yang mampu mematikan *Mycobacterium tuberculosis*. Agensi ini juga mampu memusnahkan virus yang resisten seperti virus hepatitis, tetapi tidak efektif terhadap endospora.
- (3) Agensi kimia berkhasiat rendah ialah agensi kimiawi yang efektif terhadap kebanyakan sel vegetative bakteri dan fungi, tetapi tidak efektif terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, endospora, spora fungi dan virus.<sup>12</sup>

Contoh bahan kimia yang digunakan untuk sterilisasi :

1. Deterjen untuk membersihkan kotoran/debu dari eksplan
2. Fungisida untuk membersihkan jamur/cendawan
3. Bakterisida untuk membersihkan bakteri

---

<sup>12</sup> Teresia Tri Suharni, dkk. *Mikrobiologi Umum*, (Yogyakarta : Universitas Atma Jaya, 2007), hlm.105.

4. Alkohol 70 % dan 95 % untuk desinfektan
5. Sodium hipoklorik dengan nama dagang clorox atau bayclin untuk desinfektan
6. Mercury chlorit dengan nama dagang sublimat 0,05 % untuk desinfektan
7. Tween-20 untuk agen pembasah
8. Antibiotik desinfektan
9. Iodine/betadine untuk antiseptik <sup>13</sup>

### 3. Cara Pemilihan Eksplan

Faktor eksplan yang penting adalah genotipe/varietas, umur eksplan, letak pada cabang, dan seks (jantan/betina). Bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan adalah pucuk muda, batang muda, daun muda, kotiledon, hipokotil, endosperm, ovari muda, anther, embrio, dll. <sup>14</sup>

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan ketika kita memilih bahan tanaman yang akan di kultur-kan. Dengan menggunakan bahan tanaman yang masih muda dan memiliki kisaran genetik berbeda, eksplan yang sehat, maka kemungkinan besar dapat dihasilkan kultur yang baik. bagian tunas sering digunakan dalam kultur jaringan tanaman

Pemotongan eksplan pada saat penanaman perlu di perhatikan, semakin kecil

---

<sup>13</sup><http://infokuljar.blogspot.com/2010/08/sterilisasi-eksplan-bahan-tanam-kultur.ht>

<sup>14</sup>[http://www.situshijau.co.id/tulisan.php?act=detail&id=113&id\\_kolom=13](http://www.situshijau.co.id/tulisan.php?act=detail&id=113&id_kolom=13)

eksplan yang kita ambil maka akan semakin kecil pula kemungkinan terjadinya kontaminasi, namun demikian juga harus di ingat bahwa eksplan yang kecil lebih mudah rusak pada saat penanganan dan lebih rentan untuk gagal pada tahapan awal, untuk itu hindari penggunaan bahan tanaman yang akan dijadikan eksplan yang kontak langsung dengan tanah, dimana kemungkinan besar investasi penyakit atau penyebab terjadinya kontaminasi semakin besar.<sup>15</sup>

#### **4. Proses Sterilisasi Eksplan**

Pelaksanaan :

(1) Sterilisasi dengan cara rebus

Mensterilkan peralatan dengan cara merebus didalam air sampai mendidih (100C) dan ditunggu antara 15 sampai 20 menit. Misalnya peralatan dari logam, kaca dan karet.

(2) Sterilisasi dengan cara stoom

Mensterikan peralatan dengan uap panas didalam autoclave dengan waktu, suhu dan tekanan tertentu. Misalnya alat tenun, obat-obatan dan lain-lain.

(3) Sterilisasi dengan cara panas kering

Mensterikan peralatan dengan oven dengan uap panas tinggi. Misalnya peralatan logam

---

<sup>15</sup><http://kultur-jaringan.co.cc/kultur-jaringan-tanaman-dan-cara-pemilihan-eksplan/>

yang tajam, peralatan dari kaca dan obat tertentu.

- (4) Sterilisasi dengan cara menggunakan bahan kimia Mensterikan peralatan dengan menggunakan bahan kimia seperti alkohol, sublimat, uap formalin, khususnya untuk peralatan yang cepat rusak bila kena panas. Misalnya sarung tangan, kateter, dan lain-lain.

Perhatian :

- (1) Sterilisator harus dalam keadaan siap pakai.
- (2) Peralatan harus bersih dan masih berfungsi.
- (3) Peralatan yang dibungkus harus diberi label yang dengan jelas mencantumkan : nama, jenis peralatan, tanggal dan jam disterilkan.
- (4) Menyusun peralatan di dalam sterilisator harus sedemikian rupa, sehingga seluruh bagian dapat disterilkan.
- (5) Waktu yang diperlukan untuk mensterilkan setiap jenis peralatan harus tepat (dihitung sejak peralatan disterilkan).
- (6) Dilarang memasukkan atau menambahkan peralatan lain kedalam sterilisator, sebelum waktu untuk mensterilkan selesai.
- (7) Memindahkan peralatan yang sudah steril ketempatnya harus dengan korentang steril.
- (8) Untuk mendinginkan peralatan steril dilarang membuka bungkus maupun tutupnya.
- (9) Bila peralatan yang baru disterilkan terbuka, peralatan tersebut harus disterilkan

kembali.<sup>16</sup>

Agar lebih mudah difahami marilah kita lihat contoh sterilisasi tanaman pisang di bawah ini :



Gambar 4.1: *Contoh eksplan pisang*

Tunas hidup di atas tanah sering banyak tanah yang melekat perlu dibersihkan hal ini karena pada eksplan tunas pisang mengandung bakteri internal seperti *Pseudomonas* dan *Erwinia*.

### **Tahapan sterilisasi eksplan :**

Tunas dibersihkan dari sisik dan kulit luar satu lapis. Tunas dicuci dan disikat dengan sabun sampai bersih kemudian ditiriskan. Tunas diperkecil dengan dikupas seludangnya sampai berbentuk seperti kerucut di atas kubus ukuran 2 x 2 cm persegi. Tunas dimasukkan ke dalam gelas piala bersih dan disterilisasi dengan kloroks 0,5 % selama 5 menit.

---

<sup>16</sup><http://harnawatiaj.wordpress.com/2008/03/18/sterilisasi/>

Setelah itu pelepah paling luar dibuang lagi satu lapis lalu tunas direndam lagi dalam larutan agrimycin 5 gram/ liter selama 12 jam. Setelah 12 jam perendaman, tunas dicuci untuk menghilangkan sisa-sisa bakterisida. Setelah itu lalu dimasukkan dalam larutan kloroks / bayclin 50 % dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian setelah itu dimasukkan ke dalam laminar air flow cabinet, pelepah tunas dibuka lagi sebanyak 1 – 2 lapis dan kemudian direndam ke dalam larutan kloroks 20 % selama 10 menit. Setelah dibilas dengan air steril, tunas direndam ke dalam larutan betadine 20 % selama 10 menit. Ukuran terakhir tunas +/- 1 – 2 cm.



*Gambar 4.2: Sterilisasi eksplan di dalam laminar air flow*



*Gambar 4.3: Eksplan dikupas lapisan bagian luarnya*



Gambar 4.4 : *Eksplan yang siap ditanam*



**Gambar 4.5: Pemotongan Eksplan siap ditanam di media**

#### **D. RANGKUMAN**

Sterilisasi yaitu membebaskan tiap benda atau substansi dari semua kehidupan dalam bentuk apapun.

Eksplan adalah bagian tanaman yang dipergunakan sebagai bahan awal untuk perbanyakan

tanaman.

Pada prinsipnya macam-macam sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu secara mekanik, fisik dan kimiawi.

Cara pemilihan eksplan yang penting adalah genotipe/varietas, umur eksplan, letak pada cabang, dan seks (jantan/betina).

#### **E. LATIHAN SOAL DAN dan JAWABAN :**

1. Sebutkan ada berapa macam sterilisasi ?
2. Sebutkan contoh bahan kimia yang digunakan untuk sterilisasi :
3. Bagaimana cara memilih eksplan yang baik?
4. Jelaskan perbedaan kallus dengan eksplan?

#### **Jawab :**

1. Pada prinsipnya macam-macam sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu secara mekanik, fisik dan kimiawi
2. Contoh bahan kimia untuk sterilisasi: Deterjen untuk membersihkan kotoran/debu dari eksplan, Fungisida untuk membersihkan jamur/cendawan, Bakterisida untuk membersihkan bakteri, Alkohol 70 % dan 95 % untuk desinfektan, Sodium hipoklorik dengan nama dagang clorox atau bayclin untuk desinfektan, Mercury chlorit dengan nama dagang sublimat 0,05 % untuk desinfektan, Tween-20 untuk agen pembasah,

Antibiotik desinfektan, Iodine/betadine untuk antiseptik <sup>17</sup>

3. .Untuk mendapatkan eksplan yang baik maka harus dipilih tanaman induk yang baik, sehat, dan terbebas dari penyakit.
4. Eksplan adalah bagian tanaman yang dipergunakan sebagai bahan awal untuk memperbanyak tanaman

---

<sup>17</sup><http://infokuljar.blogspot.com/2010/08/sterilisasi-eksplan-bahan-tanam-kultur.ht>

## **BAB V**

### **PEMBUATAN MEDIA KULTUR JARINGAN**

#### **A. PENDAHULUAN**

Teknik budaya tanaman dengan menggunakan metode konvensional yaitu medium tanah atau pasir seringkali menghadapi kendala teknis, lingkungan maupun waktu. Kebutuhan akan bibit tanaman dalam jumlah besar, berkualitas dan bebas hama penyakit harus tersedia dalam waktu singkat seringkali tidak dapat dipenuhi dengan metode konvensional. Oleh karena itu, sejak tahun 1902 *Gottlieb Haberlandt* telah mengajukan gagasan mengenai kemungkinan pengembangan teknik kultivasi tanaman dari sel yang ditumbuhkan dalam larutan nutrisi. Beberapa puluh tahun kemudian, sekitar tahun 1939 *Robert G. Hartley* seorang ahli penyakit tanaman dari Perancis berhasil melakukan kultivasi tanaman yang berasal dari jaringan.

Penelitian-penelitian selanjutnya membuka kemungkinan penerapan teknik kultur sel atau jaringan yang mengacu pada teknik untuk menumbuhkan jasad multiseluler dalam medium padat maupun cair. Sebagai alternatif adalah perbanyak tanaman bukan menggunakan media tanah, melainkan dalam medium buatan di dalam tabung. Dalam makalah ini hanya akan dibahas mengenai pembuatan media untuk kultur jaringan, secara umum media kultur jaringan dapat diartikan sebagai tempat dimana suatu jaringan yang

dimaksudkan untuk dibiakkan di kulturkan atau dibudidayakan. Pada jaman sekarang ini, di era serba praktis penggunaan teknologi sudah mencapai kemajuan yang pesat. Juga dalam bidang biologi. Teknologi sering digunakan untuk membuat alternatif dalam proses alami yang dianggap memakan waktu yang lebih lama. Salah satu penggunaan teknologi dalam bidang teknologi adalah pembuatan atau pembiakan tanaman dengan kultur jaringan. Seperti yang telah diketahui kultur jaringan adalah membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya.<sup>18</sup> Kultur jaringan juga dapat diartikan sebagai teknik pemeliharaan jaringan atau bagian dari individu secara buatan (artifisial). Yang dimaksud secara buatan adalah dilakukan di luar individu yang bersangkutan.<sup>19</sup>

Kultur jaringan sering digunakan sebagai alternatif pembiakan tanaman tidak melalui bibit secara alamiah, kultur jaringan dianggap efisien dan praktis dari pada harus menunggu tumbuhnya bibit yang lama.

Dalam makalah ini hanya akan dibahas mengenai pembuatan media untuk kultur jaringan, secara umum media kultur jaringan dapat diartikan sebagai tempat dimana suatu jaringan yang dimaksudkan untuk dibiakkan di kulturkan atau

---

<sup>18</sup> Daisy P, *Teknik Kultur Jaringan*. Kansius, Yogyakarta, 1994, hlm. 26

<sup>19</sup>[http://id.wikipedia.org/wiki/Kultur\\_jaringan](http://id.wikipedia.org/wiki/Kultur_jaringan)

dibudidayakan. Di dalam makalah ini akan diterangkan mengenai pengertian dan pentingnya media, kemudian apa saja yang harus diperhatikan dalam pembuatan media. Makalah ini merupakan lanjutan dari makalah sebelumnya yang membahas persiapan dan laboratorium untuk kultur jaringan, jadi di dalam makalah ini tidak akan dibahas rinci mengenai hal-hal tersebut. Untuk lebih jelasnya akan di bahas dalam bab-bab selanjutnya.

## **B. POKOK BAHASAN**

Hal-hal yang akan dibahas lebih lanjut dalam makalah ini diantaranya adalah :

1. Pengertian media kultur jaringan
2. Komposisi yang harus ada dalam media
3. Langkah-langkah pembuatan media kultur jaringan

## **C. PEMBAHASAN**

### **1. Pengertian Media Kultur Jaringan dan Pentingnya Media tersebut**

Media secara khusus dapat dipahami sebagai sesuatu yang dapat membantu tercapainya sesuatu, dalam hal lain juga dapat diartikan dan diposisikan sebagai tempat sesuatu diletakkan untuk melakukan proses yang berkaitan dengan media tersebut. Sedangkan kultur jaringan seperti telah diketahui sebelumnya adalah pembudidayaan tanaman melalui jaringan yang diambil dari tanaman

tersebut. Bila digabungkan, media kultur jaringan adalah tempat ditnamkannya jaringan yang diambil dari tanaman tertentu untuk dibiakkan, yang kemudian proses selanjutnya akan berhubungan dengan media tersebut.

Media merupakan faktor utama dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Keberhasilan perbanyakan dan perkembangbiakan tanaman dengan metode kultur jaringan secara umum sangat tergantung pada jenis media. Media tumbuh pada kultur jaringan sangat besar pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan serta bibit yang dihasilkannya. Media adalah tempat bagi jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mendukung kehidupan jaringan.<sup>20</sup>

Media kultur jaringan biasanya berupa komposisi dari berbagai macam unsur makro, mikro, karbohidrat, vitamin, asam amino, zat pengatur tumbuh, dan agar.<sup>21</sup> Media sangat penting dalam pembuatan kultur jaringan, karena nutrisi yang dibutuhkan akan dipasok melalui media tersebut, oleh karena itu pembuatan media dalam pembuatan kultur jaringan harus diperhatikan secara intensif. Dalam pembuatan media yang akan dibahas selanjutnya adalah :

---

<sup>20</sup> <http://kultur-jaringan.blogspot.com/>

<sup>21</sup> Hari harjanto, *Memperbanyak Tanaman Hias Favorit*, Penebar Swadaya, hlm 25.

## 2. Komposisi yang harus ada dalam media

Pada umumnya komposisi utama media tanam kultur jaringan, terdiri dari hormon (zat pengatur tumbuh) dan sejumlah unsur yang biasanya terdapat di dalam tanah yang dikelompokkan ke dalam unsur makro, unsur mikro. Hasil yang lebih baik akan dapat kita peroleh bila, kedalam media tersebut, ditambahkan vitamin, asam amino, dan hormon, bahan pematid media (agar), glukosa dalam bentuk gula maupun sukrosa, air destilata (akuades), dan bahan organik tambahan (Gunawan, 1992)<sup>22</sup>. Secara terperinci akan dibahas satu per satu.

### a. Unsur hara makro

Sudah lama dibahas bahwa layaknya makhluk hidup dan tumbuhan lainnya, pembiakan tanaman melalui metode kultur jaringan pun membutuhkan unsur-unsur untuk menjalankan proses kehidupannya. Unsur hara makro adalah nutrisi yang dibutuhkan tanaman dalam prosentase jumlah yang besar diantaranya adalah, Nitrogen (N), Fosfor (P), Kalium (K), Kalsium (Ca), Sulfur (S), Magnesium (Mg), dan Besi (Fe).

### b. Unsur hara mikro

Sedangkan unsur hara mikro adalah nutrisi yang dibutuhkan dalam prosentase

---

<sup>22</sup> <http://kultur-jaringan.blogspot.com>.

jumlah yang lebih sedikit, Unsur hara mikro ini merupakan komponen sel tanaman yang penting dalam proses metabolisme dan proses fisiologi lainnya.

c. Zat pengatur tumbuh

Zat pengatur tumbuh biasanya berupa hormon yang berfungsi merangsang pertumbuhan. Tetapi dalam kultur jaringan tidak dibuat secara alami sehingga dinamakan ZPT zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan untuk merangsang pertumbuhan selama proses kultur jaringan. Zat pengatur tumbuh bisa berupa auksin, sitokinin atau gibberelin.<sup>23</sup>

d. Vitamin dan asam amino

Vitamin yang paling sering digunakan dalam media kultur jaringan tanaman adalah thiamine (vitamin B1), nicotinic acid (niacin), pyridoxine (vitamin B6). Thiamine merupakan vitamin yang esensial dalam kultur jaringan tanaman karena thiamine mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan sel. Vitamin C, seperti asam sitrat dan asam askorbat, kadang-kadang digunakan sebagai antioksidan untuk mencegah atau mengurangi pencoklatan atau penghitaman eksplan.<sup>24</sup>

---

<sup>23</sup> Agus GRK., *Anggrek (Bunga Dengan Aneka Pesona Bentuk Warna)*, Agromedia Pustaka, Jakarta, 2001, hlm. 39.

<sup>24</sup> <http://kultur-jaringan.blogspot.com>.

Dalam media kultur jaringan, asam amino merupakan sumber nitrogen organik. Namun sumber N organik ini jarang ditambahkan dalam media kultur jaringan, karena sumber sumber nitrogen utamanya sudah tersedia dari  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{NH}_4^+$ . Asam amino yang sering digunakan adalah glisin, lysin dan threonine. Penambahan glisin dalam media dengan konsentrasi tertentu dapat melengkapi vitamin sebagai sumber bahan organik (Yusnita, 2004).<sup>25</sup>

e. Sumber energi

Gula digunakan sebagai sumber energi dalam media kultur, karena umumnya bagian tanaman atau eksplan yang dikulturkan tidak autotrof dan mempunyai laju fotosintesis yang rendah. Oleh sebab itu tanaman kultur jaringan membutuhkan karbohidrat yang cukup sebagai sumber energi. Menurut Gautheret dalam Gunawan (1992), sukrosa adalah sumber karbohidrat penghasil energi yang terbaik melebihi glukosa, maltosa, rafinosa. Namun jika tidak terdapat sukrosa, sumber karbohidrat tersebut dapat digantikan dengan gula pasir. Gula pasir cukup memenuhi syarat untuk mendukung pertumbuhan kultur. Selain

---

<sup>25</sup> Ibid.,

sebagai sumber energi, gula juga berfungsi sebagai tekanan osmotik media.<sup>26</sup>

f. Air

Air disini dapat berfungsi sebagai pelarut dalam pembuatan media ataupun stok yang larut dalam air. Air distilata biasanya digunakan dalam kultur jaringan, dan banyak lab menggunakan aquabides (air destilata ganda). Beberapa lab, dengan alasan ekonomi, menggunakan air hujan, tapi ini menyebabkan sulit mengontrol kandungan bahan organik dan non-organik pada media.<sup>27</sup>

g. Agar

Umumnya jaringan dikulturkan pada media padat yang dibuat seperti gel dengan menggunakan agar atau pengganti agar seperti Gelrite atau Phytigel. Konsentrasi agar yang digunakan berkisar antara 0.7 – 1.0%. Pada konsentrasi tinggi agar menjadi sangat keras, sedikit sekali air yang tersedia, sehingga difusi hara ke tanaman sangat buruk.<sup>28</sup>

Agar-agar adalah campuran polisakarida yang diperoleh dari beberapa spesies algae. Dalam analisa unsur, diperoleh data bahwa agar-agar mengandung sedikit unsur Ca, Mg, K, dan Na (Debergh, 1982

---

<sup>26</sup> Ibid.,

<sup>27</sup> <http://www.smallcrab.com/others/474-mengenal-kultur-jaringan>

<sup>28</sup> Ibid.,

dalam Gunawan, 1992). Keuntungan dari pemakaian agar-agar adalah :

- 1) Agar-agar membeku pada suhu 45° C dan mencair pada suhu 100° sehingga dalam kisaran suhu kultur, agar-agar akan berada dalam keadaan beku yang stabil.
- 2) Tidak dicerna oleh enzim tanaman.
- 3) Tidak bereaksi dengan persenyawaan-persenyawaa penyusun media.<sup>29</sup>

h. Keadaan pH

Keasaman (pH) adalah nilai yang menyatakan derajat keasaman atau kebasaaan larutan dalam air. Sel-sel tanaman yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan mempunyai toleransi pH yang relatif sempit dengan titik optimal antara pH 5,0 – 6,0 (Daisy, 1994). Faktor pH dalam media juga perlu mendapat perhatian khusus. pH tesebut harus diatur sedemikian rupa sehingga tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH dari sitoplasma.<sup>30</sup>

i. Pemilihan media

Media Tumbuh, Di dalam media tumbuh mengandung komposisi garam anorganik, zat pengatur tumbuh, dan bentuk fisik media. Terdapat 13 komposisi media dalam kultur jaringan, antara lain: Murashige

---

<sup>29</sup><http://kultur-jaringan.blogspot.com>.

<sup>30</sup>[http://www.smallcrab.com/others/474-mengenal-kultur-](http://www.smallcrab.com/others/474-mengenal-kultur-jaringan)

dan Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM), Knop, Knudson-C, Anderson dll. Media yang sering digunakan secara luas adalah MS.

Karena sebagian besar bahan-bahan kimia yang digunakan harus tersedia dalam jumlah kecil yang sulit ditimbang, bahan-bahan itu perlu disiapkan dalam bentuk larutan stok. Larutan stok adalah larutan dengan tingkat kepekatan tinggi, yang disiapkan sebagai media nutrisi sesuai dengan komposisi.<sup>31</sup>

Berikut adalah komposisi media menurut Murashige dan Skoog yang sering digunakan dalam pembuatan media untuk kultur jaringan<sup>32</sup>

Komponen	Komposisi (mg/l)
Unsur makro	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650
KNO <sub>3</sub>	1.900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
Unsur mikro	
KI	0,830
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,600
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,250
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA	37,300
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,800
Vitamin dan asam amino	
Thiamin	1,000
Asam nikotinat	0,500
Pyridoxin HCl	0,500
Glycine	2,000
Asam sistein	50,000
Asam pantotenat	3,000
Myo-inositol	100,000
Sukrosa	30,000
Agar	7.000

(Sumber George dan Sherington, 1984)

<sup>31</sup> Sarwono, *Mengenal Dan Membuat Anggrek Hibrida*, Agromedia Pustaka, Jakarta, 2002, hlm. 47.

<sup>32</sup><http://www.pustaka-deptan.go.id/publikasi/bt091042.pdf>

### 3. Langkah-langkah pembuatan media

Agar lebih jelas langkah-langkah dalam pembuatan media kultur jaringan adalah sebagai berikut :

- a. Cuci alat gelas dengan air destilata sebelum mulai menyiapkan media.
- b. Ukur kira – kira 90% dari volume akhir air destilata, misalnya 900 ml untuk volume akhir 1 liter, lalu masukkan ke dalam beaker.
- c. Jika anda akan memanaskan larutan, pastikan anda menggunakan alat tahan panas.
- d. Sambil mengaduk air, perlahan masukkan bubuk MS dan aduk hingga benar – benar larut. Cuci bagian dalam paket MS dengan air destilata untuk mengambil sisa – sisa bubuk dan masukkan ke larutan media.
- e. Masukkan bahan tahan panas lainnya – stok GM,myo-inositol, sukrosa, BA, aduk rata.
- f. Atur pH media menggunakan NaOH, HCl, atau KOH.
- g. Buat volume akhir media dengan menggunakan labu takar
- h. Jika menggunakan agar, masukkan ke dalam campuran media sebelum diautoklaf.
- i. Media harus selalu diautoklaf dalam wadah dengan ukuran 1 1/2 x atau 2x lebih besar dari volume media agar media tidak tumpah.
- j. Tuangkan media sesuai kebutuhan sebelum diautoklaf atau sesudah diautoklaf, tergantung kebutuhan.

- k. Tutup wadah pada saat diautoklaf, tapi jangan terlalu erat, agar ada pertukaran udara.
- l. Media disterilisasi dengan mengautoklaf pada 1 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi), 121° C selama kurang lebih 30 menit. Volume yang lebih besar (200 ml atau lebih) mungkin memerlukan waktu yang lebih lama. Gunakan exhaust yang lambat.
- m. Biarkan media mendingin hingga 55° C sebelum menambahkan bahan – bahan yang tidak tahan panas (acetosyringone, claforan, kanamycin).
- n. Media dituangkan ke petri dish biasanya dengan volume 25 ml per petri. Ini akan menghasilkan sekitar 40 petri per liter media.
- o. Dinginkan media di dalam laminar. Jangan pindahkan petri yang telah diisi media sampai petri tersebut dingin.
- p. Simpan media yang sudah dingin di refrigerator.<sup>33</sup>
- q. Menyimpan media yang sudah disterilisasi di dalam ruang penyimpanan media ber-AC (suhu 24 - 26°C) selama 3 hari sebelum digunakan untuk memastikan bahwa media tersebut tidak terkontaminasi  
Atau dapat juga dengan:

---

<sup>33</sup><http://www.smallcrab.com/others/474-mengenal-kultur-jaringan>

Gula dilarutkan dengan aquades

Memasukan ke dalam labu takar

Menambahkan masing-masing larutan stok

Memasukkan media yang dibuat ke dalam panci dan menambakkannya dengan agar-agar

❖ Mamanaskan agar-agar sampai masak dengan diaduk-aduk

Menuangkan media ke dalam botol kultur yang steril

Memasukkannya ke dalam autoclave selama 15-20 menit pada suhu 121°C tekanan 17.5 psi

Contoh Media Kultur yang Dipakai

1. Media dasar Murhasige dan skoog (1962) yang dapat digunakan untuk hampir semua jenis kultur, terutama pada tanaman herbaceous.
2. Media dasar Gamborg (B5) untuk kultur sel kedelai dan legume lainnya.
3. Media dasar White (1934) yang sangat cocok untuk kultur akar tanaman tomat.
4. Media dasar Knudson, Vacin dan Went yang biasa digunakan untuk kultur jaringan anggrek.





Gambar 3 : Nutrient agar dalam cawn petri

Larutan stok dalam media kultur jaringan dikelompokkan dalam: stok makro, stok mikro, stok Fe, stok vitamin dan stok hormon. Larutan stok bisa dibuat dengan konsentrasi 10, 100, atau bahkan 1000 kali lebih pekat. Larutan stok sebaiknya disimpan dalam ruang gelap dan bersuhu rendah, karena ada beberapa bahan yang tidak tahan suhu tinggi dan cahaya. Stok vitamin tidak dapat disimpan terlalu lama, bisa dibuat untuk digunakan dalam 1 – 2 minggu. Stok hormon dapat disimpan antara 2 – 4 minggu, sedangkan stok hara dapat disimpan 4 – 3 minggu. Larutan stok yang sudah tersimpan lama biasanya mengendap dan ditumbuhi mikroorganismenya. Larutan yang sudah terkontaminasi mikroorganismenya ini sudah tidak dapat digunakan lagi. Oleh sebab itu kondisi tempat simpan dan wadah larutan harus

diusahakan sesteril mungkin. Dengan adanya larutan stok, pembuatan media selanjutnya dilakukan hanya dengan teknik pengenceran dan pencampuran saja. Jika seluruh larutan stok yang dibutuhkan sudah dibuat, gula dan pematat medianya ditimbang sesuai kebutuhan, setelah itu kita dapat meracik dan membuat media. Media Tumbuh, Di dalam media tumbuh mengandung komposisi garam anorganik, zat pengatur tumbuh, dan bentuk fisik media. Terdapat 13 komposisi media dalam kultur jaringan, antara lain: Murashige dan Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM), Knop, Knudson-C, Anderson dll. Media yang sering digunakan secara luas adalah MS. Karena sebagian besar bahan-bahan kimia yang digunakan harus tersedia dalam jumlah kecil yang sulit ditimbang, bahan-bahan itu perlu disiapkan dalam bentuk larutan stok. Larutan stok adalah larutan dengan tingkat kepekatan tinggi, yang disiapkan sebagai media nutrisi sesuai dengan komposisi.<sup>34</sup>

#### **D. RANGKUMAN**

Media kultur jaringan adalah tempat ditnamkannya jaringan yang diambil dari tanaman tertentu untuk dibiakkan, yang kemudian proses selanjutnya akan berhubungan dengan media

---

<sup>34</sup> Sarwono, *Mengenal Dan Membuat Anggrek Hibrida*, Agromedia Pustaka, Jakarta, 2002, hlm. 47.





kemudian proses selanjutnya akan berhubungan dengan media tersebut.

3. Keasaman (pH) adalah nilai yang menyatakan derajat keasaman atau kebasaan larutan dalam air. Sel-sel tanaman yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan mempunyai toleransi pH yang relatif sempit dengan titik optimal antara pH 5,0 – 6,0
4. Media kultur jaringan adalah tempat ditnamkannya jaringan yang diambil dari tanaman tertentu untuk dibiakkan, yang kemudian proses selanjutnya akan berhubungan dengan media tersebut.
5. Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan untuk merangsang pertumbuhan selama proses kultur jaringan.
6. Cara membuat media kultur jaringan: Cuci alat gelas dengan air destilata sebelum mulai menyiapkan media, Ukur kira – kira 90% dari volume akhir air destilata, misalnya 900 ml untuk volume akhir 1 liter, lalu masukkan ke dalam beaker. Jika anda akan memanaskan larutan, pastikan anda menggunakan alat tahan panas. Sambil mengaduk air, perlahan masukkan bubuk MS dan aduk hingga benar – benar larut. Cuci bagian dalam paket MS dengan air destilata untuk mengambil sisa – sisa bubuk dan masukkan ke larutan media. Masukkan bahan tahan panas lainnya – stok GM, myo-inositol, sukrosa, BA, aduk rata. Atur pH media

menggunakan NaOH, HCl, atau KOH. Buat volume akhir media dengan menggunakan labu takar. Jika menggunakan agar, masukkan ke dalam campuran media sebelum diautoklaf. Media harus selalu diautoklaf dalam wadah dengan ukuran 1 1/2 x atau 2x lebih besar dari volume media agar media tidak tumpah. Tuangkan media sesuai kebutuhan sebelum diautoklaf atau sesudah diautoklaf, tergantung kebutuhan. Tutup wadah pada saat diautoklaf, tapi jangan terlalu erat, agar ada pertukaran udara. Media disterilisasi dengan mengautoklaf pada 1 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi), 121°C selama kurang lebih 30 menit. Volume yang lebih besar (200 ml atau lebih) mungkin memerlukan waktu yang lebih lama. Gunakan exhaust yang lambat. Biarkan media mendingin hingga 55° C sebelum menambahkan bahan – bahan yang tidak tahan panas (acetosyringone, claforan, kanamycin). Media dituangkan ke petri dish biasanya dengan volume 25 ml per petri. Ini akan menghasilkan sekitar 40 petri per liter media. Dinginkan media di dalam laminar. Jangan pindahkan petri yang telah diisi media sampai petri tersebut dingin. Simpan media yang sudah dingin di refrigerator. sampai petri tersebut dingin. Simpan media yang sudah dingin di refrAGERATOR

## **BAB VI**

### **KULTUR PROTOPLAS**

#### **A. PENDAHULUAN**

Protoplas tumbuhan pada dasarnya adalah sel hidup yang dihilangkan dinding selnya, baik secara mekanis maupun enzimatis. Protoplas tersebut masih mengandung organel-organel sel, termasuk inti sel. Prosedur isolasi protoplas sangat bervariasi dari satu spesies ke spesies yang lain, juga tergantung pada eksplan dan donor protoplas yang dipakai.

Meskipun sejumlah besar tanaman telah dapat diisolasi protoplasnya, akan tetapi kondisi yang paling baik agar protoplas yang terisolasi mampu melakukan regenerasi dinding sel dan pembelahan secara kontinyu, masih belum dapat diformulasikan secara umum. Selain untuk dikulturkan, protoplas juga dapat difusikan dengan cara kimiawi maupun fisika. Teknologi kultur *in vitro*, khususnya fusi protoplas telah memberi alternatif baru untuk memperoleh hibrid baru, yang tidak mungkin diperoleh secara alami.

#### **B. POKOK BAHASAN**

1. Pengertian protoplas.
2. Pengertian fusi protoplas.
3. Prosedur pembuatan kultur protoplas?

#### **C. PEMBAHASAN**

##### **1. Pengertian Protoplas**

Protoplas merupakan sel hidup yang dihilangkan dinding selnya, baik secara mekanis maupun enzimatik. Protoplas akan mampu mengekspresikan kapasitas fotipotensi sel dengan cara meregenerasi kembali protoplas menjadi tanaman seperti induknya, dengan menggunakan teknologi kultur *in vitro*.

Apabila dikulturkan pada medium dan lingkungan yang sesuai, maka dalam waktu singkat protoplas akan melakukan regenerasi dinding sel kembali dan selanjutnya mengalami proses pembelahan sel. Apabila pembelahan sel terjadi secara kontinyu, maka pada suatu periode akan terbentuk mikrokalus. Mikrokalus yang dapat dilihat secara visual dapat dipindahkan ke medium padat untuk proliferasi kalus selanjutnya. Kalus yang dapat dipindah lagi ke medium diferensiasi agar terbentuk plantlet.<sup>35</sup>

Pada umumnya, protoplas diisolasi dengan cara mendegradasi komponen dinding sel dengan menggunakan larutan enzim. Larutan enzim terdiri dari kombinasi enzim pektinase, selulase, dan hemiselulase, yang dilarutkan ke dalam aquades yang telah diberi *osmotikum*.<sup>36</sup>

## **2. Pengertian Fusi Protoplas**

Fusi protoplas adalah salah satu metode persilangan atau hibridisasi tanaman dengan

---

<sup>35</sup> Lianah, *Pengantar Bioteknologi*, (Semarang: Fakultas Tarbiyah, 2008), hlm: 20

<sup>36</sup>*Ibid*, hlm: 20

memanfaatkan rekayasa genetik konvensional. Teknik fusi protoplas dapat digunakan untuk mencampur sifat genetik dari spesies tanaman yang sama ataupun dari spesies yang berbeda. Selain itu, teknik ini menguntungkan untuk diterapkan dalam persilangan tanamansteril ataupun tanaman dengan siklus hidup yang panjang. Untuk menginduksi atau mendukung terjadinya fusi protoplas dapat dilakukan dengan pemakaian senyawa kimia seperti polietilen glikol (PEG) ataupun penggunaan arus listrik untuk membantu fusi.

Ketika dua protoplas bersatu, dapat terjadi pemisahana atau penggabungan dua inti sel (nukleus) sehingga menghasilkan tanaman dengan sifat baru hasil pencampuran kedua tetua. Apabila salah satu inti sel hilang selama terjadinya fusi maka akan dihasilkan sel baru yang disebut sitoplasmik hibrid (*cybrid*).<sup>37</sup>

Untuk mendapatkan protoplas dari sel, harus melarutkan dinding primitif dengan pelarut. Zat pektin dapat dilarutkan dengan pektiolas dan maserozim, sedangkan selulosa dapat dilarutkan dengan selulase. Enzim-enzim ini sebelum digunakan harus disterilkan, namun dengan pemanasan dapat menjadi inaktif. Oleh karena itu sterilisasi terhadap enzim harus menggunakan saringan milipore.

---

<sup>37</sup>[HTTP://ID.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/FUSI\\_PROTOPLAS](http://id.wikipedia.org/wiki/Fusi_Protoplas)

Penggabungan dua protoplas dapat dilakukan dengan tiga cara:

- a. Stimulasi medan listrik.
- b. Zat kimia PEG MW 6000, NaNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, dekstran sulfat+gelatin, dan Polyvinylalkohol.
- c. Kombinasi perlakuan medan listrik dan cara kimia.

Keberhasilan kultur dan fusi protoplas ditentukan dalam penentuan pH dan osmolaritas.

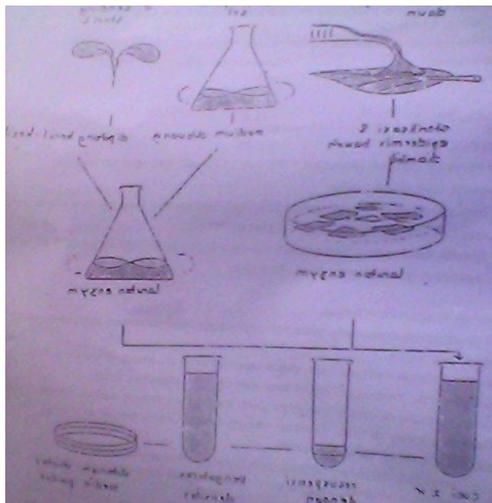
pH : 5,5-5,8  
osmolaritas : 0,35-0,70 M  
temperatur : 22-28<sup>0</sup>C  
intensitas cahaya : 2000 lux  
kerapatan : 104-106/ml

Teknologi fusi protoplas juga dapat dilakukan untuk mendapatkan sifat-sifat tertentu seperti sifat ketahanan terhadap hama dan penyakit serta cekaman abiotik. Jenis-jenis fusi protoplas yang dapat dilakukan adalah:

- a. Fusi protoplas intragenera  
yaitu fusi protoplas antara mikrobia satu genera. Fusi ini dibagi menjadi dua, yaitu:
  - (1) Fusi protoplas intraspecies, yang dapat terjadi antara mikrobia satu spesies, misalnya pada jamur *Geotrichum candidum*.
  - (2) Fusi protoplas interspecies, yang dapat terjadi antar spesies yang berbeda tetapi dalam genera yang sama, misalnya antara

*Penicillium chrysogenum* dan  
*Penicillium requeforti*.

- b. Fusi Protoplas intergenera  
yaitu fusi protoplas antara mikrobia yang  
berbeda genera, misalnya antara  
*Brevibacterium flavum* dengan  
*Corynebacterium glutamicum*.<sup>38</sup>



Skema isolasi dan kultur protoplas<sup>39</sup>

### 3. Prosedur pembuatan kultur protoplas antara lain :

- a. Mengambil daun tembakau yang telah terbuka penuh dari tanaman tembakau yang berumur dua bulan.

<sup>38</sup><http://noviarahma.blogspot.com/2010/11/apa-itu-fusi-protoplas.html>

<sup>39</sup>Op. Cit, hlm: 21

- b. Mensterilisasi daun dengan cara merendam selama 20 menit di dalam larutan bayclean 10%, kemudian mencuci lima kali dengan akuades steril.
- c. Meletakkan daun di dalam pretidish yang diberi alas kertas saring, dengan posisi epidermis bawah di atas. Mengambil epidermis bawah dengan menggunakan pinset.
- d. Kemudian daun dipotong-potong tanpa menyertakan ibu tulang daun dan kemudian diplasmolisis dengan cara merendam di dalam larutan CPW13M, selama kurang lebih 30 menit.
- e. Dengan menggunakan pipet steril, CPW13M dibuang dan diganti dengan 20 ml larutan enzim. Diinkubasikan dalam ruangan gelap selama 16-18 jam, pada temperatur 25<sup>0</sup>C.
- f. Melepaskan protoplas dengan cara mengaduk perlahan-lahan potongan-potongan daun dengan pinset steril. Setelah itu disaring dengan *nylon litter* steril 60 mikrometer, dan ditampung ke tabung sentrifugasi. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 400 rpm selama 5 menit.
- g. Dengan menggunakan pipet supernatan dibuang, diganti dengan CPW 13M dan disentrifugasi kembali.
- h. Protoplas dicuci dua kali dengan cara yang sama.

- i. Pada pencucian terakhir, setelah supernatan dibuang, ditambahkan 5 ml MSP1 9M, dan dihitung protoplas yang viabel dengan menggunakan *hamocytometer*.
- j. Mengambil  $1,5 \times 10^6$ /ml protoplas viabel dan dicampur dengan 2,5 ml media cair MSP1 9M, kemudian tanam di atas 5 ml media padat MSP1 9M dengan 0,8% agar di dalam petridish 5 cm.
- k. Kultur diinkubasi dalam gelap dan dilakukan pengamatan tiap hari.<sup>40</sup>

#### **D. RANGKUMAN**

Dari hasil pembahasan dapat disimpulkan bahwa:

Protoplas merupakan sel hidup yang dihilangkan dinding selnya, baik secara mekanis maupun enzimatis.

Fusi protoplas adalah salah satu metode persilangan atau hibridisasi tanaman dengan memanfaatkan rekayasa genetik konvensional. Jenis-jenis fusi protoplas yang dapat dilakukan adalah:

1. Fusi protoplas intragenera adalah fusi protoplas antara mikrobia satu genera. Fusi ini dibagi menjadi dua, yaitu: Fusi protoplas intraspecies dan fusi protoplas interspecies
2. Fusi Protoplas intergenera adalah yaitu fusi protoplas antara mikrobia yang berbeda genera

---

<sup>40</sup> *Ibid*, hlm: 22-23

## **E. SOAL DAN JAWABAN**

### **Pertanyaan-pertanyaan**

Jawablah pertanyaan-pertanyaan di bawah ini!

1. Jelaskan apa yang disebut dengan kultur protoplasma?
2. Jelaskan pula perbedaan antara kultur protoplasma dan fusi protoplasma?
3. Jelaskan perbedaan antara Fusi protoplas intragenera dan Fusi protoplas intraspecies dan berilah contohnya masing-masing.
4. Ada berapa cara penggabungan protoplasma?
5. Berilah contoh bagaimana prosedur pembuatan kultur protoplas?

### **Jawab**

1. **Kultur protoplasma yaitu :** Protoplas tumbuhan pada dasarnya adalah sel hidup yang dihilangkan dinding selnya, baik secara mekanis maupun enzimatis. Protoplas tersebut masih mengandung organel-organel sel, termasuk inti sel lalu ditanam dalam media steril.
2. Perbedaan antara kultur protoplasma dan fusi protoplasma yaitu: Fusi protoplas adalah salah satu metode persilangan atau hibridisasi tanaman dengan memanfaatkan rekayasa genetik konvensional.
3. Jenis-jenis fusi protoplas yang dapat dilakukan adalah Fusi protoplas intragenera adalah fusi protoplas antara mikrobia satu genera. Fusi ini dibagi menjadi dua, yaitu: Fusi protoplas

intraspecies dan fusi protoplas interspecies. Fusi Protoplas intergenera adalah yaitu fusi protoplas antara mikrobia yang berbeda genera.

4. Cara penggabungan dua protoplas dapat dilakukan dengan tiga cara: Stimulasi medan listrik, Zat kimia PEG MW 6000, NaNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, dekstran sulfat+gelatin, dan Polyvinylalkohol, Kombinasi perlakuan medan listrik dan cara kimia.
5. Prosedur pembuatan kultur protoplas antara lain: Mengambil daun tembakau yang telah terbuka penuh dari tanaman tembakau yang berumur dua bulan, Mensterilisasi daun dengan cara merendam selama 20 menit di dalam larutan bayclean 10%, kemudian mencuci lima kali dengan akuades steril, Meletakkan daun di dalam petridish yang diberi alas kertas saring, dengan posisi epidermis bawah di atas. Mengambil epidermis bawah dengan menggunakan pinset, Kemudian daun dipotong-potong tanpa menyertakan ibu tulang daun dan kemudian diplasmolisis dengan cara merendam di dalam larutan CPW13M, selama kurang lebih 30 menit, Dengan menggunakan pipet steril, CPW13M dibuang dan diganti dengan 20 ml larutan enzim. Diinkubasikan dalam ruangan gelap selama 16-18 jam, pada temperatur 25<sup>0</sup>C.

## BAB VII

### KULTUR HAPLOID DAN DIPLOID

#### A. PENDAHULUAN

Salah satu manfaat utama dari teknik ini adalah *androgenesis in vitro*, yaitu kemungkinan memperoleh tanaman haploid yang dapat dipergunakan untuk memperoleh diploid homozigot (varietas murni), dan juga untuk pencarian hasil mutasi yang menarik.

Anter dapat diambil pada saat pollen telah terbentuk, tetapi belum mengalami pembelahan ini menjadi inti vegetatif dan inti generatif. Untuk setiap tanaman harus dipilih stadium/ fase terbaik pengambilan eksplan. Biasanya stadium terbaik tercapai ketika bunga masih kuncup, yang berarti mempermudah proses fertilisasi. Dimungkinkan pula, memisahkan butir-butir pollen, yang berarti menghilangkan resiko memperoleh pertumbuhan dari jaringan diploid pada antera. Di dalam kultur anter atau pollen ini, sebetulnya dilakukan deviasi fungsi pollen. Bukan pembelahan *inegal* yang terjadi, tetapi sebaliknya terjadi pembelahan inti yang serupa. Modifikasi ini sangat penting, untuk dapat memperoleh pollen yang mengalami proses *callogenesis*, atau somatic embryogenesis.<sup>41</sup>

---

<sup>41</sup> Lianah, M.Pd. *Pengantar Bioteknologi*, hlm. 18.

## B. POKOK BAHASAN

1. Kultur Haploid dan Diploid
2. Kultur Antera pada Teknologi Haploid

## C. PEMBAHASAN

Salah satu manfaat utama dari teknik ini adalah *androgenesis in vitro*, yaitu kemungkinan memperoleh tanaman haploid yang dapat dipergunakan untuk memperoleh diploid homozigot (varietas murni), dan juga untuk pencarian hasil mutasi yang menarik.

Anter dapat diambil pada saat pollen telah terbentuk, tetapi belum mengalami pembelahan ini menjadi inti vegetatif dan inti generatif. Untuk setiap tanaman harus dipilih stadium/ fase terbaik pengambilan eksplan. Biasanya stadium terbaik tercapai ketika bunga masih kuncup, yang berarti mempermudah proses fertilisasi. Dimungkinkan pula, memisahkan butir-butir pollen, yang berarti menghilangkan resiko memperoleh pertumbuhan dari jaringan diploid pada antera. Di dalam kultur anter atau pollen ini, sebetulnya dilakukan deviasi fungsi pollen. Bukan pembelahan *inegal* yang terjadi, tetapi sebaliknya terjadi pembelahan inti yang serupa. Modifikasi ini sangat penting, untuk dapat memperoleh pollen yang mengalami proses *callogenesis*, atau somatic embryogenesis.<sup>42</sup>

---

<sup>42</sup> Lianah, M.Pd. *Pengantar Bioteknologi*, hlm. 18.

## 1. Kultur Haploid dan Diploid

Teknologi haploid menawarkan keunggulan yang tidak dijumpai pada teknik pemuliaan tanaman secara konvensional. Dengan teknologi ini akan dapat dikembangkan tanaman-tanaman homozigot hanya dalam kurun waktu satu generasi. Sedangkan dengan teknologi konvensional, tanaman homozigot baru dapat dihasilkan setelah melalui proses seleksi hingga 5 atau 6 generasi. Sejumlah sifat-sifat unggul antar lain yang toleransi terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, seperti kekeringan, suhu rendah, hara rendah atau pun kandungan logam berat yang tinggi di dalam tanah merupakan karakter resesif yang dapat dideteksi secara dini pada tanaman haploid. Selain itu, permasalahan yang berkaitan dengan silang luar dan inkompatibilitas sendiri dapat pula diatasi dengan pemanfaatan teknologi haploid.<sup>43</sup>

Tanaman haploid dapat diregenerasikan lewat embryogenesis mikrospora, baik melalui kultur antera maupun kultur mikrospora. Tanaman haploid tidak memiliki pasangan kromosom yang homolog, sehingga pada saat meiosis berlangsung kromosom-kromosomnya tidak berpasangan-pasangan seperti halnya tanaman normal (diploid). Melalui teknik *in vitro* tanaman haploid dapat diregenerasikan secara langsung

---

<sup>43</sup><http://www.korantempo.com.2010>.

dari gamet jantan maupun betina tanpa melalui proses pembuahan. Akan tetapi berbeda dengan tanaman normal (haploid), individu-individu haploid bersifat steril. Apabila komplemen kromosomnya digandakan secara buatan, misalnya menggunakan kolkisin atau oryzalin, maka tanaman tersebut akan menjadi doubled-haploid. Sebagaimana dengan induk haploid yang homozigot, tanaman doubled-haploid juga bersifat homozigot. Bedanya adalah tanaman doubled-haploid dapat digunakan untuk berbagai studi genetik dan tujuan perbaikan tanaman. Nilai tanaman DH sangat dihargai oleh para pemulia sejak ditemukannya tanaman haploid pertama alami melalui penelitian tim Blakeslee tahun 1922 pada *Datura stramonium*. Tanaman DH yang dihasilkan ekuivalen dengan galur-galur inbred. Saat ini, haploid dapat ditemukan pada berbagai jenis tanaman penting seperti terigu, padi, jagung, barley, tembakau, kentang dan kapas.<sup>44</sup>

Produksi tanaman haploid maupun doubled-haploid telah berhasil dilakukan pada spesies tanaman monokotil seperti *Oryza sativa* dan *Triticum aestivum*. Teknologi ini juga telah berhasil diterapkan pada tanaman-tanaman dikotil seperti *Brassica napus*, *Populus sp.*, *Malus domestica*, dan *Anemone sp.*, *Zantedeschia*

---

<sup>44</sup><http://www.biogen.doad,2010>

*sp.*, dan *Delphi nium sp.* Perbaikan kultivar yang telah ada dan pengembangan kultivar-kultivar baru yang berdaya hasil tinggi merupakan tujuan umum dari semua pemulia tanaman. Salah satu alternatif dari teknologi baru yang menunjukkan harapan bagi percepatan perakitan kultivar-kultivar baru ialah dengan penggunaan teknik produksi haploid secara *in vitro*. Teknik produksi haploid yang paling umum digunakan dalam memproduksi galur murni homozigot diploid dari satu generasi, sehingga dapat menghemat banyak generasi silang balik untuk mencapai homozigositas, ialah teknik kultur anther. Kultur anther biasa dilakukan untuk mendapatkan tanaman haploid, yang memiliki jumlah kromosom yang sama dengan gametofit dalam sel-sel saporfitiknya. Tanaman haploid dapat digunakan untuk mendeteksi rekombinan yang unik, termasuk mutan-mutan yang resesif, yang tidak dapat muncul pada tanaman diploid. Dengan penggandaan kromosom dapat diperoleh tanaman yang homozigot. Tanaman yang demikian dapat digunakan untuk bahan pemuliaan selanjutnya seperti pembuatan hibrida atau seleksi galur murni. Jadi, selain meningkatkan keragaman genetik, teknik ini dapat memperpendek siklus seleksi. Tahapan kultur anther ini lebih cepat dibanding menggunakan eksplan (bahan yang mau dikulturkan) lainnya seperti daun, karena sel-sel

jaringan penyusunnya lebih muda. Tahapan kegiatan penelitian ini meliputi inisiasi awal, subkultur/ pendewasaan, perkecambahan, dan aklamasi.

## **2. Kultur Antera pada Teknologi Haploid**

Pada pembahasan di atas kami akan memberikan contoh penelitian kultur antera yang diterapkan pada teknologi haploid. Tanaman induk yang digunakan pada penelitian ini adalah kedelai varietas budidaya. Kultivar tersebut adalah Anjasmoro, Baluran, Merubetiri, dan Wilis.

Benih tanaman kedelai dikecambahkan kemudian diambil dari tunas bunga muda dan disterilkan dengan alkohol 70% selama kurang lebih 10 detik, kelopak dan mahkota bunga dibuang dengan hati-hati, lalu antera dipisahkan dari filamen untuk selanjutnya ditumbuhkan di dalam polybag untuk mempermudah pemeliharaan dan mengendalikan pertumbuhan tanaman. Selanjutnya polybag ditempatkan di tempat terbuka. Pemeliharaan tanaman mengikuti prosedur kultur teknik yang umum dilakukan, yakni penyiraman air, pemberantasan bahan induk dilakukan setiap 3 – 4 minggu guna menjamin ketersediaan bahan eksplan (tunas bunga) yang cukup selama penelitian. Selain itu, penanaman ini juga sebagai upaya memperbanyak koleksi benih untuk digunakan sebagai bahan perbanyakannya.

Sementara itu untuk pra perlakuan stres, tunas bunga diisolasi dari tanaman induk kemudian dimasukkan ke dalam botol vial yang berisi medium starvasi. Bagian bawah tangkai bunga diupayakan terendam di dalam larutan yaitu 10 ml larutan stok + 200 ml air suling, kemudian di aduk secara konstan dan ditambahkan sakrosa sebanyak 30 gr, dan volume larutan dijadikan 1 liter dengan penambahan air suling. Kemasan medium ditetapkan  $5.8 \pm 0.02$  dengan menambahkan NaOH 1M atau HCl 0.50 M. Botol-botol tersebut selanjutnya disimpan pada suhu kamar ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) atau pada suhu rendah ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) dalam keadaan gelap total selama 2, 4, 6 dan 8 hari.

Setelah diberi pra-perlakuan, antera dan mikrospora selanjutnya diisolasi dari tunas bunga, dikulturkan dan dipelihara di dalam ruang kultur dengan suhu  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lama pencahayaan (lotoperiodesitas) adalah 16 jam per hari yang diperoleh dari lampu fluorescence dengan intensitas  $50\text{ }\mu\text{mol m}^2\text{ s}^{-1}$ . Pertumbuhan dan perkembangan kultur diamati selama 8 minggu.

Dari empat kultivar yang diuji, hanya Wilis yang memperlihatkan adanya pengaruh pra perlakuan terhadap antera, yang ditunjukkan oleh adanya proliferasi kalus pada pra perlakuan starvasi manitol pada suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 2 hari. Sementara pada pra perlakuan lainnya antera, baik yang diisolasi dari kultivar Wilis, maupun

dari empat kultivar lainnya, tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan, dan eksplan berubah menjadi pucat (mati) setelah 30hari dalam kultur. Sebaliknya antera yang diisolasi dari semua kultivar dan langsung dikulturkan (tanpa pra perlakuan) justru memperlihatkan respon yang baik terhadap kultur *in vitro*. Hal ini diperlihatkan oleh terjadinya proliferasi kalus pada antera, meskipun dengan karakteristik yang berbeda.

Dalam kurun waktu 7 hari setelah tanaman belum terlihat adanya perubahan pada eksplan yang dikulturkan . perubahan baru terlihat setelah eksplan memasuki umur 8 hari setelah inisiasi yang ditunjukkan oleh terjadinya perubahan warna dari hijau muda menjadi kecoklatan dan atau putih. Pada antera yang tidak diberi pra perlakuan warnanya cenderung mengarah kepada hijau segar sebelum terlihat adanya proliferasi kalus yang didahului oleh pembengkakan jaringan. Sementara itu pada antera yang diberi pra perlakuan, perubahan warnanya cenderung semakin pucat dan akhirnya coklat dan mati, kecuali pada antera kultivar Wilis yang diberi pra perlakuan starvasi manitol pada suhu 4 oC selama 2 hari.

Pada umur 8 hari setelah inisiasi, antera yang diisolasi dari kedelai varietas Wilis dan diperlakukan dengan starvasi manitol pada suhu 4 °C selama 2 hari mulai meregenerasikan kalus.

Sementara itu, antera yang berasal dari 4 varietas lainnya yang diuji dan dikulturkan tanpa diberi pra perlakuan mulai meregenerasikan kalus pada hari ke-10.

Hasil pada percobaan ini mengindikasikan bahwa pra perlakuan yang diuji memberikan pengaruh negatif terhadap kultur antera kedelai, kecuali pra perlakuan starvasi manitol pada suhu 4 °C selama 2 hari yang diberikan kepada tunas bunga kedelai kultivar Wilis. Hal ini disebabkan terutama sekali oleh kemunduran viabilitas dari serbuk sari dan antera di dalam tunas bunga. Di duga pemberian pra perlakuan, sekalipun pada suhu rendah dalam waktu yang relatif singkat (2 hari) telah merubah metabolisme serbuk sari dan jaringan antera ke arah yang kurang menguntungkan.

Secara eksternal, pada lama perlakuan 2 hari, terutama pada suhu 25 dan 33 °C tunas bunga sudah memperlihatkan tanda-tanda degenerasi, yakni warnanya mulai menguning. Sementara pada perlakuan suhu 4 °C, tanda-tanda generasi mulai terlihat secara eksternal setelah 6 hari penyimpanan. Disamping faktor suhu, diduga konsentrasi manitol yang digunakan juga bertanggung jawab terhadap terjadinya degenerasi jaringan tunas bunga. Diduga tingkat konsentrasi manitol yang digunakan pada percobaan ini (54.7 g L<sup>-1</sup>) menyebabkan

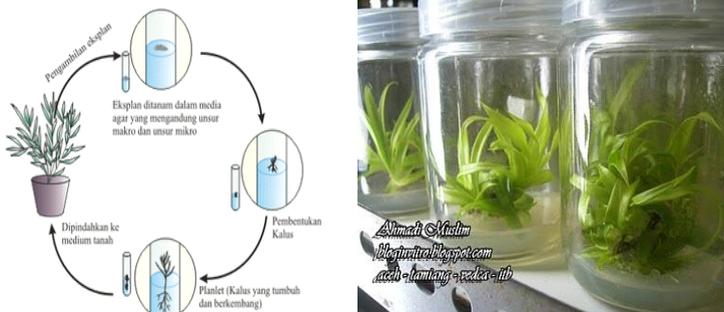
terjadinya plasmolisis pada sel-sel pada jaringan tunas muda yang masih muda.

Faktor lain yang menyebabkan rendahnya laju viabilitas eksplan pada percobaan ini adalah kecilnya ukuran antera kedelai yang dikulturkan.<sup>45</sup>

## GAMBAR-GAMBAR



Gambar 6.1 : Kultur Anther



Gambar 6.2 : Proses Kultur Jaringan

Gambar 6.3: Kultur Polen

<sup>45</sup><http://www.kora.tempo.com.2010>

#### **D. RANGKUMAN**

Dengan teknologi haploid akan dapat dikembangkan tanaman-tanaman homozigot hanya dalam kurun waktu satu generasi. Dalam teknologi ini memberikan keunggulan yang tidak dijumpai pada teknik pemuliaan tanaan secara konvensional. Kemudian dari hasil penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa pra perlakuan antera dengan starvasi manitol pada berbagai suhu dan lama penyimpanan tidak memacu perkembangan eksplan, kecuali pada kultivar Wilis yang diperlakukan dengan suhu 4 °C selama 2 hari. Proliferasi kalus dari antera kedelai varietas Anjasmoro, Baluran, Merubetiri, dan Wilis lebih baik pada antera segar yang tidak menerima pra perlakuan stres.

#### **E. LATIHAN SOAL DAN JAWABAN**

**Jawablah pertanyaan –pertanyaan di bawah ini.**

1. Apa yang di maksud dengan androgenesis in vitro?
2. Sebutkan keunggulan dari teknologi haploid?
3. Sebutkan contoh dari kultur haploid?
4. Dimanakah tanaman haploid pertama kali di temukan?

#### **Kunci jawaban**

1. *Androgenesis in vitro*, yaitu kemungkinan memperoleh tanaman haploid yang dapat dipergunakan untuk memperoleh diploid

homozigot (varietas murni), dan juga untuk pencarian hasil mutasi yang menarik.

2. Dengan teknologi ini akan dapat dikembangkan tanaman-tanaman homozigot hanya dalam kurun waktu satu generasi. Sedangkan dengan teknologi konvensional, tanaman homozigot baru dapat dihasilkan setelah melalui proses seleksi hingga 5 atau 6 generasi.
3. Kultur anter dan kultur embryogenesis
4. Tanaman haploid pertama alami melalui penelitian tim Blakeslee tahun 1922 pada *Datura stramonium*.

## **BABVIII**

### **REGENERASI TANAMAN DARI KALUS**

#### **A. PENDAHULUAN**

Penggunaan kultur jaringan berkembang dengan pesat sejalan dengan semakin besarnya manfaat dari penggunaan kultur jaringan tersebut. Pada mulanya kultur jaringan digunakan untuk memperbanyak tanaman yaitu untuk mendapatkan bibit tanaman dalam jumlah banyak dan dalam waktu yang relatif singkat, serta mempunyai sifat morfologi dan fisiologis yang sama dengan induknya. Perkembangan selanjutnya kultur jaringan digunakan untuk keperluan program pemuliaan tanaman dalam upaya memperoleh keragaman genetik atau karakter unggul secara efisien tanpa melalui proses persilangan yang membutuhkan waktu yang relatif lama. Perbanyak secara vegetatif dalam kultur *in vitro* dimungkinkan untuk memperoleh individu baru yang berbeda dengan tanaman induknya.

Regenerasi tanaman melalui kalus merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan dalam metode kultur jaringan. Kalus adalah masa sel tidak berbentuk yang terdiri dari sel-sel parenkim yang tersusun longgar dan timbul akibat proliferasi sel-sel jaringan induk atau eksplan.

Dalam makalah ini akan disajikan beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan memperbanyak tanaman melalui jalur embryogenesis somatic, tahap perkembangan eksplan membentuk

embrio somatic, serta bagaimana rangkaian proses tersebut dikendalikan oleh gen-gen tertentu.

## **B. POKOK BAHASAN**

1. Pengertian Regenerasi Kallus
2. Prosedur Regenerasi Tanaman
3. Pembentukan Plantlet Melalui Jalur SomaticEmbriogenesis

## **C. PEMBAHASAN**

### **1. Pengertian Regenerasi Kalus**

Struktur kalus dari berbagai varietas yang digunakan berbeda-beda tergantung kepada formulasi yang digunakan. Biasanya struktur kalus menggambarkan daya regenerasinya membentuk tunas dan akar. Kalus yang berbentuk globular (nodul-nodul) dan berwarna being biasanya mempunyai kemampuan lebih tinggi untuk membentuk tunas daripada kalus yang bersifat kompak dan berwarna coklat-kehitaman. Dalam hal media yang digunakan untuk memacu regenerasi kalus akan sangat menentukan. Keseimbangan nutrisi dalam media tumbuh sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus maupun diferensiasinya membentuk tunas. Morfogenesis eksplan tergantung kepada keseimbangan auksin dan sitokinin dalam media interaksi antara zat pengatur tumbuh endogen di

dalam tanaman dan zat pengatur tumbuh eksogen yang diserap dari media tumbuh.<sup>46</sup>

Setelah kalus terbentuk di dalam medium induksi kalus, maka kalus dapat dimanfaatkan untuk beberapa macam tujuan, antara lain: proliferasi lebih lanjut kalus untuk memperoleh stok kalus, digunakan sebagai bahan inisiasi suspensi sel, untuk donor protoplas, untuk diekstrak metabolic sekundernya, atau kalus didiferensiasi agar terbentuk plantlet. Terbentuknya plantlet atau vitroplant dapat melalui dua jalur, yaitu jalur organogenesis atau jalur somatic embryogenesis. Somatic embryogenesis adalah sel-sel diploid atau sel haploid somatic yang bukan sel reproduktif berkembang menjadi tumbuhan yang berdiferensiasi melalui beberapa tahap embryogenesis hanya mungkin terjadi melalui induksi kalus. Untuk dapat mengarah pada salah satu jalur regenerasi yang dikehendaki, maka kalus harus dipindah ke medium diferensiasi yang komposisi media serta lingkungan inkubasinya disesuaikan dengan jalur yang dikehendaki, penyesuaian media dan lingkungan inkubasi sangat bervariasi tergantung spesies dan eksplan yang digunakan. Akan tetapi pada umumnya untuk media dasar dapat sama dengan media

---

<sup>46</sup><http://biogen.litbang.deptan.go.id/terbitan/agrobiogen/abs-trak/agrobiogen>

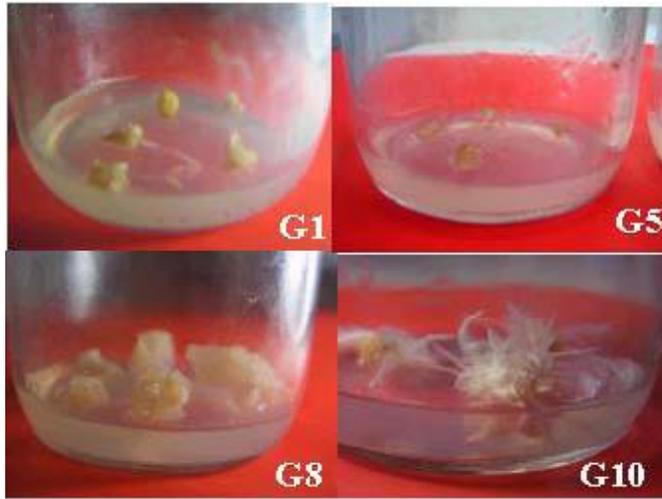
dasar inisiasi kalus, hanya untuk menuju jalur somatic embryogenesis, biasanya kadar auksinya diturunkan atau dihilangkan sama sekali dari media kultur. Sedangkan untuk organogenesis keberadaan zat pengatur tumbuh masih diperlukan tetapi keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokininnya perlu diubah untuk mencapai keseimbangan optimal.<sup>47</sup>

Regenerasi tanaman dapat dilakukan melalui dua cara yaitu organogenesis (melalui pembentukan organ langsung dari eksplan) dan embryogenesis somatic (melalui pembentukan embrio somatic). Dibandingkan dengan embryogenesis, organogenesis mempunyai keunggulan, yaitu peluang terjadinya mutasi lebih kecil, metodenya lebih mudah dan tidak memerlukan subkultur berulang sehingga tidak menurunkan genetik, cara regenerasi lebih dianjurkan karena tanaman yang diperoleh berasal dari satu sel somatic sehingga peluang diperolehnya transforman lebih tinggi. Embrio somatic biasanya berasal dari sel tunggal yang kompeten dan berkembang membentuk fase globular, hati, torpedo dan akhirnya menjadi embrio somatic dewasa yang siap didekembangkan membentuk planet. Selain itu, regenerasi tanaman melalui kultur *in vitro*

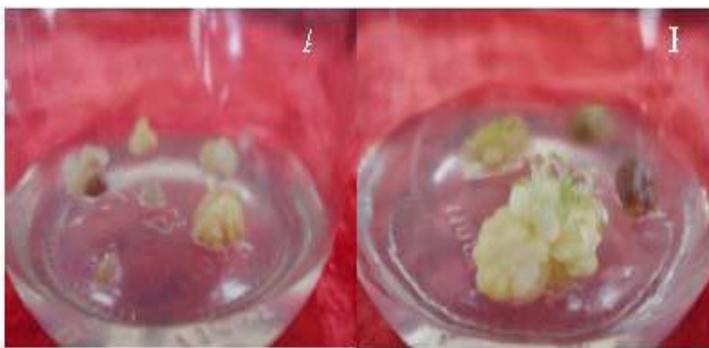
---

<sup>47</sup> Lianah, M.Pd. *Modul Bioteknologi*, Fakultas Tarbiyah IAIN Walisongo Semarang 2008.

bersifat spesifik artinya media yang dapat digunakan untuk meregenerasikan varietas tanaman tertentu belum tentu dapat digunakan untuk varietas lainnya.



Gambar 8.1: Media Kalus



Gambar 8. 2: Kalus Embriogenik pada Jagung

## 2. **Prosedur Regenerasi Tanaman Dari Kalus**

Setelah kalus terbentuk, kalus dipindah ke media baru yang konsentrasi auksinya diturunkan sampai dengan nol. Kalus diharapkan berdeferensiasi melalui jalur somatic embryogenesis. Selanjutnya kalus dipindah ke media baru dengan variasi konsentrasi auksin (0;0,5;1,0;1,5 mg/l) dan benzyl amoni purin (0;0,5;1 mg/l) untuk mengarah pada organogenesis. Secara umum metode mikropropagasi dapat melalui beberapa jalur yaitu :

- a. Kultur meristem dan kultur apeks, tanpa melalui fase kalus. Eksplan langsung mengalami diferensiasi membentuk organ (tunas). Setelah proses pengakaran akan diperoleh plantlet atau vitroplant.
- b. Kultur tunas aksiler, dengan cara menanam nodus yang memiliki tunas dormansi. Tunas aksiler akan mengalami pemanjangan, untuk selanjutnya dapat pula diinduksi per akarannya agar membentuk plantlet.
- c. 3). Mikropropagasi dengan cara mengkulturkan bagian kecil tubuh tanaman dari semua tubuh tanaman, morfogenesis bias terjadi secara langsung atau tidak langsung. Secara langsung berarti tidak melalui fase kalus, eksplan langsung mengalami proses organogenesis atau embryogenesis. Secara tidak langsung berate eksplan akan

membentuk kalus, kalus ini akan berdeferensiasi melalui jalur organogenesis atau somatik embryogenesis. Kalus juga dapat digunakan sebagai bahan suspensi sel, yang dapat membentuk kembali kalus atau sel tunggal yang langsung menuju jalur somatic embryogenesis.<sup>48</sup>

### **3. Pembentukan Plantlet Melalui Jalur Somatic Embriogenesis**

Salah satu faktor penting yang mendukung program pertanian adalah pengadaan bibit bermutu, seragam dan diperoleh dalam jumlah yang banyak. Kebutuhan tersebut sulit dipenuhi apabila pengadaan bibit dilakukan secara konvensional. Untuk mengantisipasi hal tersebut, dapat ditempuh cara perbanyak tanaman melalui kultur jaringan. Kultur jaringan telah terbukti dapat menyediakan bibit berbagai tanaman yang akan dieksploitasi secara luas terutama dapat diperbanyak setiap waktu sesuai kebutuhan, karena faktor perbanyakannya tinggi.

Pengandaan biakan dalam kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embryogenesis somatic. Cara embryogenesis somatic banyak mendapat perhatian karena jumlah propagula yang dihasilkan tidak terbatas dan dapat diperoleh

---

<sup>48</sup>*Ibid.*, Lianah

dalam waktu yang lebih singkat. Disamping itu, untuk mendukung program pemuliaan tanaman melalui rekayasa genetika, penggunaan embrio somatic dapat mempercepat keberhasilan dengan peluang transformasi yang lebih tinggi karena embrio somatic dapat berasal dari satu sel somatic. Untuk penyimpanan jangka pendek maupun jangka panjang, embrio somatic dianggap merupakan bahan tanaman yang ideal untuk disimpan karena apabila diregenerasikan dapat membentuk bibit somatic.

Disamping keuntungan, terdapat beberapa kendala dalam penerapan embryogenesis, yaitu peluang terjadi mutasi lebih tinggi, metode lebih sulit, ada penurunan daya morfogenesis dari kalus embriogenik karena subkultur berulang serta memerlukan penanganan yang lebih intensif karena kultur lebih rapuh. Namun demikian, variasi yang dihasilkan sering dianggap menguntungkan karena dapat digunakan sebagai sumber keragaman genetik (*gene pool*).

Embryogenesis somatic merupakan suatu proses dimana sel somatic (baik haploid maupun diploid) berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet. Istilah embrio somatic pertama kali digunakan oleh Tolkin pada tahun 1964 yang menggambarkan pembentukan organisme dari suatu sel atau kumpulan sel somatic. Embrio somatic dapat dicirikan dari

strukturnya yang bipolar, yaitu meristem akar dan meristem tunas. Dengan memiliki struktur tersebut maka perbanyakan melalui embrio somatic lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif yang unipolar. Disamping strukturnya, tahap perkembangan embrio somatic menyerupai embrio zigotik. Secara spesifik tahap perkembangan tersebut dimulai dari fase globular, fase hati, fase torpedo, dan planlet (Henry et al., 1998 dalam Gaj, 2001).

Embrio somatic dapat terbentuk melalui dua jalur, yaitu secara langsung maupun tidak langsung (melewati fase kalus). Keberhasilan akan tercapai apabila kalus atau sel yang digunakan bersifat embriogenik yang dicirikan oleh sel yang berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil-kecil dan mengandung butir pati. Embrio somatic dapat dihasilkan dalam jumlah besar dari kultur kalus, namun untuk tujuan perbanyakan dalam skala besar, jumlahnya kadang-kadang dapat lebih ditingkatkan melalui inisiasi sel embrionik dari kultur suspensi yang berasal dari kalus primer (Wiendi et al., 1991).

Embryogenesis mempunyai beberapa tahap spesifik, yaitu 1) induksi sel dan kalus embriogenik, 2) pendewasaan, 3) perkecambahan, dan 4) hardening. Pada tahap induksi kalus embriogenik dilakukan isolasi eksplan dan penanaman pada media tumbuh.

Untuk induksi kalus embriogenik kultur umumnya ditumbuhkan pada media yang mengandung auksin yang mempunyai daya aktivitas kuat atau dengan konsentrasi tinggi. Dari berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-D merupakan auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik. Zat pengatur tumbuh tersebut merupakan auksin sintetis yang cukup kuat dan tahan terhadap degradasi karena reaksi enzimatik dan fotooksidasi. Disamping auksin, sering pula diberikan sitokinin seperti benzyl abedin (BA) atau kinetin secara bersamaan (Bhojwani dan Razdan, 1989).

Tahap pendewasaan adalah tahap perkembangan dari struktur globular membentuk kotiledon dan primordial akar. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa tahap pendewasaan adalah tahap yang paling sulit. Pada tahap ini sering digunakan auksin pada konsentrasi rendah.

Tahap perkecambahan adalah fase dimana embrio somatic membentuk tunas dan akar. Pada media perkecambahan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan sangat rendah atau bahkan tidak diberikan sama sekali.

Tahap hardening, yaitu tahap aklimatisasi bibit embrio somatic dari kondisi *in vitro* ke lingkungan baru di rumah kaca dengan penurunan kelembaban dan peningkatan intensitas cahaya.

## **D. RANGKUMAN**

Regenerasi tanaman melalui kalus merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan dalam metode kultur jaringan. Kalus adalah masa sel tidak berbentuk yang terdiri dari sel-sel parenkim yang tersusun longgar dan timbul akibat proliferasi sel-sel jaringan induk atau eksplan.

Regenerasi tanaman dapat dilakukan melalui dua cara yaitu organogenesis (melalui pembentukan embrio somatic). Dibandingkan dengan embryogenesis, organogenesis mempunyai keunggulan, yaitu peluang terjadinya mutasi lebih kecil, metodenya lebih mudah dan tidak memerlukan subkultur beruang sehingga tidak menurunkan daya regenerasi dari kalus.

## **E. LATIHAN SOAL DAN JAWABAN**

### **Pertanyaan-pertanyaan**

**Jawablah pertanyaan-pertanyaan di bawah ini :**

1. Jelaskan tentang kalus?
2. Apa yang membedakan pembentukan kalus sehingga ada yang berwarna bening, coklat kehitaman?
3. Apa manfaat dan tujuan regenerasi tanaman dari kalus?
4. Apa perbedaan antara regenerasi kalus dan induksi kalus?
5. Dimanakah letak kalus pada tumbuhan?

## **Kunci Jawaban**

1. Kalus merupakan masa sel yang tidak berbentuk terdiri dari sel-sel parenkim yang tersusun longgar yang timbul akibat proliferasi sel-sel jaringan induk atau eksplan.
2. Kebanyakan kalus terletak disekitar epidermis berwarna bening yang baik digunakan untuk kultur jaringan, kalus terletak lebih dalam berwarna coklat kehitaman lebih sukar digunakan untuk kultur jaringan.
3. Manfaat dan tujuan Regenerasi:
  - Sebagai bahan inisiasi suspensi sel
  - Untuk donor protoplas
  - Untuk diekstrak metabolik sekudernya
  - Dideferensiasi agar terbentuk plantlet
4. Perbedaan
  - Regenerasi kalus: merupakan metode kultur jaringan, biasanya struktur kalus menggambarkan daya regenerasinya membentuk tunas dan akar.
  - Induksi kalus: merupakan perkembangan dari regenerasi kalus sebagai kultur jaringan, biasanya dipengaruhi beberapa faktor antara lain: pemilihan jenis eksplan, genotipe, suplemen media yang digunakan, jenis dan konsentrasi hormon.
5. Letaknya diseluruh sel tumbuhan, tetapi yang baik digunakan kalus yang berwarna bening disekitar epidermis.

## **BAB XI**

### **INDUKSI KALUS**

#### **A. PENDAHULUAN**

Penggunaan kultur jaringan berkembang dengan pesat sejalan dengan semakin besarnya manfaat dari penggunaan kultur jaringan tersebut. Pada mulanya kultur jaringan digunakan untuk memperbanyak tanaman yaitu untuk mendapatkan bibit tanaman dalam jumlah banyak dan dalam waktu yang relatif singkat, serta mempunyai sifat morfologi dan fisiologi yang sama dengan induknya.

Perkembangan selanjutnya kultur jaringan digunakan untuk keperluan program pemuliaan tanaman dalam upaya memperoleh keragaman genetik atau karakter unggul secara efisien tanpa melalui proses persilangan yang membutuhkan waktu yang relatif lama. Perbanyakannya secara vegetatif dalam kultur *in vitro* dimungkinkan untuk memperoleh individu baru yang berbeda dengan tanaman induknya. Perbedaan ini mengindikasikan terjadinya keragaman somaklonal. Keragaman somaklonal dapat disebabkan oleh penggunaan zat pengatur tumbuh, yaitu akusin, serta pengaruh dari lamanya kalus disubkultur.

Untuk menghasilkan tanaman transgenik ada beberapa faktor yang berperan, yaitu metode yang efisien dalam mengklon gen, ketersediaan konstruksi gen-gen baru, teknik transformasi, sistem regenerasi tanaman dan sistem vektor yang efisien

serta promoter yang spesifik. Tanpa sistem regenerasi tanaman yang efisien, maka akan sulit diperoleh tanaman transgenik yang diinginkan. Metode transformasi yang digunakan harus dapat memasukkan gen *interest* ke dalam sel tanaman yang kompeten untuk diregenerasikan, sehingga sel tersebut dapat tumbuh dan berkembang membentuk planlet/tanaman transgenik yang diharapkan.

## **B. POKOK BAHASAN**

1. Faktor-faktor yang mempengaruhi induksi kalus.
2. Macam-macam induksi kalus?

## **C. PEMBAHASAN**

### **1. Faktor-faktor yang mempengaruhi induksi kalus**

Pembentukan kalus dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya:

#### **a. Pemilihan Jenis Eksplan**

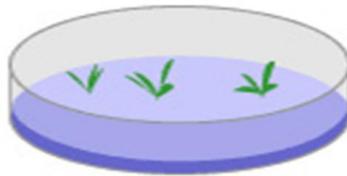
Dalam pembentukan kalus, jenis eksplan sangat menentukan berhasil tidaknya dalam menginduksi kalus. Jadi jika eksplan yang digunakan bagus maka hasil penginduksiannya juga bagus, sedangkan jika eksplan yang digunakan kurang bagus maka hasilnya juga kurang bagus.

#### **b. Genotipe**

Ketidak stabilan genetik dari materi kultur sehingga dapat menyebabkan

terjadinya keragaman somaklonal. Menurut Jayasankar, penggunaan 2,4-D atau 2,4,5 T dapat menginduksi terbentuknya keragaman somaklonal dan keragaman tersebut dapat diturunkan pada generasi berikutnya. Keberhasilan dalam menginduksi dan memperbanyak kalus embriogenik harus pula diikuti oleh keberhasilan melakukan regenerasi kalus menjadi planlet.

- c. Suplemen media yang digunakan, mencakup tipe dan kuantitas zat pengatur tumbuh, dalam hal ini auksin dan sitokinin



Plants with new genes  
grow despite antibiotics

**Gambar 9.1: Kalus dalam media**

- d. Selain itu, jenis dan konsentrasi hormon,  
Jenis asam amino serta rasio auksin dan sitokinin sangat menentukan dalam menginduksi pembentukan kalus. Komposisi auksin dan sitokinin dalam media kultur in vitro memainkan peranan penting dalam induksi dan regenerasi kalus menjadi tunas.

Interaksi antara sitokinin dan auksin merupakan hal yang krusial dalam mengontrol proses pertumbuhan dan perkembangan dalam kultur in vitro. Walaupun auksin berperan utama dalam pembelahan sel, namun pada beberapa tanaman sitokinin juga sangat dibutuhkan untuk proliferasi kalus.

Komposisi dan keseimbangan konsentrasi ZPT dalam hal ini auksin dan sitokinin, berperan dalam mengarahkan eksplan membentuk kalus. Ketidakseimbangan komposisi dan konsentrasi auksin dan sitokinin, mengakibatkan eksplan tidak dapat membentuk kalus, akan tetapi eksplan tersebut membentuk tunas adventif.



**Gambar 9.2 : Kalus pada konsentrasi berbeda**

Komposisi auksin dan sitokinin dalam media kultur *in vitro* memainkan peranan penting dalam induksi dan regenerasi kalus menjadi tunas. Interaksi antara sitokinin dan auksin merupakan hal yang krusial dalam mengontrol proses pertumbuhan dan perkembangan dalam kultur *in vitro*. Walaupun auksin berperan utama dalam pembelahan sel, namun pada beberapa tanaman sitokinin juga sangat dibutuhkan untuk proliferasi kalus. Nisbah antara sitokinin dan auksin yang akan menentukan apakah kalus akan beregenerasi 27 membentuk tunas, akar atau tunas dan akar. Penggunaan auksin seperti 2,4-D yang dikombinasikan dengan sitokinin seperti BA dapat menginduksi terbentuknya kalus pada tanaman nilam. Penggunaan auksin seperti 2,4-D memainkan peranan yang sangat penting dalam menginduksi dan memelihara kelangsungan pembelahan sel dan mengarahkan perkembangan sel membentuk kalus yang embriogenik, namun demikian 2,4-D juga dapat menyebabkan ketidak stabilan genetik dari materi kultur sehingga dapat menyebabkan terjadinya keragaman somaklonal.

Menurut Jayasankar, penggunaan 2,4-D atau 2,4,5 T dapat menginduksi terbentuknya keragaman somaklonal dan

keragaman tersebut dapat diturunkan pada generasi berikutnya. Keberhasilan dalam menginduksi dan memperbanyak kalus embriogenik harus pula diikuti oleh keberhasilan melakukan regenerasi kalus menjadi planlet. Regenerasi tunas dari eksplan kalus merupakan proses yang kompleks.

## **2. Macam-macam induksi kalus**

Dalam dunia bioteknologi ada beberapa macam kalus, antara lain: kalus yang bersifat rhizogenik, yaitu kalus yang lebih cepat membentuk akar daripada tunas. Kemungkinan hal ini disebabkan karena adanya ketidakseimbangan kandungan auksin dan sitokinin (2,4-D dan BA) di dalam eksplan sehingga eksplan lebih dahulu membentuk akar daripada tunas, padahal tunas diperlukan agar tanaman dapat melakukan fotosintesis. Wattimena menyatakan bahwa morfogenesis tunas dan akar dipengaruhi oleh nisbah auksin dan sitokinin. Nisbah auksin dan sitokinin yang tinggi akan mendorong morfogenesis akar sebaliknya nisbah auksin dan sitokinin yang rendah akan mendorong pembentukan tunas.

Kalus yang non-rhizogenik adalah kalus embriogenik yang dapat beregenerasi menjadi planlet. Pembentukan kalus embriogenik ditentukan oleh sumber N didalam media. Asam

amino merupakan sumber N organik yang cepat diambil oleh tanaman daripada Nanorganik. Selain itu, penambahan asam amino (antara lain glutamin, kasein hidrolisat, atau arginin) pada media yang sudah mengandung auksin dapat meningkatkan keberhasilan pembentukan kalus embriogenik karena di dalam kloroplas asam amino dapat berperan sebagai prekursor untuk pembentukan asam nukleat dan proses selular lainnya. Macan-nmacam tanaman juga diterangkan dalam surat al-ra'ad ayat 4.

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُّتَجَبَّرَاتٌ ۖ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ ۖ وَزُرْعٌ  
 وَخَيْلٌ ۖ صَيَّوَانٌ ۖ وَغَيْرُ صَيَّوَانٍ يُسْقَىٰ بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفْضِلٌ  
 بَعْضُهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ  
 لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿٤﴾

Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir.

#### **D. RANGKUMAN**

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi induksi kalus:

1. Pemilihan jenis eksplan
2. Genotype
3. Suplemen media yang digunakan, mencakup tipe dan kuantitas zat pengatur tumbuh, dalam hal ini auksin dan sitokinin
4. Jenis dan konsentrasi hormone

Macam-macam induksi kalus

1. Kalus yang bersifat rhizogenik, yaitu kalus yang lebih cepat membentuk akar daripada tunas
2. Kalus yang non-rhizogenik adalah kalus embriogenik yang dapat beregenerasi menjadi planlet.

#### **E. LATIHAN SOAL DAN JAWABAN**

1. Apa yang dimaksud induksi kalus?
2. Ada berapa factor yang mempengaruhi induksi kalus?sebutkan!
3. Apa yang dimaksud dengan pemilihan eksplan dalam induksi kalus?
4. Sebutkan suplemen media dalam induksi kalus?
5. Ada berapa macam induksi kalus?Sebutkan!
6. Apa yang disebut dengan kalus rhizogenik?
7. Apa yang anda ketahui tentang kalus non-rhizogenik?
8. Apa yang mempengaruhi morfogenesis akar dan tunas ?

9. sebutkan apa saja asam amino dalam induksi kalus !
10. Mengapa penambahan asam amino kedalam media yang sudah ada auksinnya dapat meningkatkan keberhasilan kalus embrionik

### **Kunci Jawaban**

Induksi kalus adalah kultur jaringan yang digunakan untuk mendapatkan bibit tanaman dalam jumlah banyak dan dalam waktu yang relatif singkat, serta mempunyai sifat morfologi dan fisiologi yang sama dengan induknya

1. Ada 4 yaitu :
  1. Pemilihan jenis eksplan
  2. Genotype
  3. Suplemen media yang digunakan, mencakup tipe dan kuantitas zat pengatur tumbuh, dalam hal ini auksin dan sitokinin
  4. Jenis dan konsentrasi hormone
- b. Dalam pembentukan kalus, jenis eksplan sangat menentukan berhasil tidaknya dalam menginduksi kalus. Jadi jika eksplan yang digunakan bagus maka hasil penginduksiannya juga bagus, sedangkan jika eksplan yang digunakan kurang bagus maka hasilnya juga kurang bagus.
- c. Suplemen media yang digunakan, mencakup tipe dan kuantitas zat pengatur tumbuh, dalam hal ini auksin dan sitokinin

- d. Ada 2 yaitu kalus rhizogenik dan kalus non-rhizogenik
- e. Rhizogenik, yaitu kalus yang lebih cepat membentuk akar daripada tunas.
- f. Kalus yang non-rhizogenik adalah kalus embriogenik yang dapat beregenerasi menjadi planlet.
- g. Auksin dan Sitokinin yang tinggi
- h. Asam amino dalam induksi kalus antara lain glutamin, kasein hidrolisat, atau arginin
- i. Karena di dalam kloroplas asam amino dapat berperan sebagai prekursor untuk pembentukan asam nukleat dan proses selul

## **BAB X**

### **SUSPENSI SEL**

#### **A. PENDAHULUAN**

Bioteknologi yang kita pelajari dalam perkuliahan ini merupakan topik yang sangat banyak diperbincangkan pada saat ini. Pemuliaan tanaman secara invitro atau disebut juga dengan budidaya jaringan merupakan salah satu bentuk bioteknologi yang berperan penting. Pada awalnya, keunggulan budidaya ini adalah mampu menghasilkan tanaman jenis unggul dalam waktu singkat. Keunggulan yang dimaksud antara lain tanaman baru yang toleran terhadap stress, bebas virus dan sebagainya. Selain itu juga penghematan dan keuntungan dari segi biaya, tenaga, tempat, maupun waktu sehingga menjanjikan masa mendatang yang lebih baik. Manfaat inilah yang membuat budidaya ini semakin banyak diminati untuk mengembangkan bidang pertanian, perkebunan ataupun bidang-bidang lainnya.

Untuk dapat melakukan kegiatan kultur invitro pada tumbuhan diperlukan pengetahuan dan ketrampilan. Pada makalah sebelumnya telah dibahas tentang laboratorium kultur invitro, tahap persisapan, sebelum kegiatan kultur invitro dimulai, pembuatan media invitro, sterilisasi eksplan, regenerasi tanaman dari kalus. Untuk selanjutnya pada makalah ini akan dibahas mengenai suspensi sel.

## **B. POKOK BAHASAN**

1. Pengertian Suspensi Sel
2. Prosedur suspensi sel dilaboratorium kultur jaringan

## **C. PEMBAHASAN**

1. Pengertian Suspensi Sel

Suspensi sel bisa diartikan sebagai kultur dari sel-sel bebas didalam medium cair.<sup>49</sup> Tujuan khusus dari suspensi sel adalah untuk memecah kallus menjadi single cell. Suspensi sel dapat menghasilkan dua macam tipe sel, yaitu:

- a. Single Cell

Single cell mempunyai kemampuan untuk tumbuh dan membelah diri dengan lebih baik. Di dalam medium cair single cell akan tampak mengapung dan kelihatan keruh. Oleh karna itu, mendapatkan single cell untuk keperluan isolasi protoplas perlu dilakukan penyaringan dengan nylon filter supaya gumpalan sel dapat tertahan, sedangkan single cell akan melewati dan dapat ditampung.

- b. Kelompok Sel atau Gumpalan Sel

Kelompok sel atau gumpalan sel mempunyai kemampuan tumbuhan dan membelah diri yang kurang bagus jika

---

<sup>49</sup> Ir. Daisy P. Sriyanti Hendrayono, dkk, *Teknik Kultur Jaringan*, Yogyakarta; Kanisius, 1994, hal.83

dibanding dengan single cell. Di dalam medium cair, kelompok sel akan tampak mengendap.

Suspensi sel dimulai dari kallus. Kallus hasil inisiasi dapat berupa kallus yang friable atau remah, dapat juga berupa kallus yang kompak. Kallus yang baik untuk suspensi sel adalah kallus yang friable, sedangkan kallus yang kompak biasanya sulit, untuk dapat menjadi suspensi sel.<sup>50</sup>

c. Media tanaman

Teknik kultur jaringan dapat dilakukan dengan dua macam metode yaitu:

(1) Metode padat (solid method)

Metode dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan kallus (induksi kallus) dan kemudian dengan medium deferensiasi yang berguna untuk menumbuhkan akar serta tunas sehingga kallus dapat tumbuh menjadi plantlet. Media padat adalah media yang mengandung semua komponen kimia yang di butuhkan oleh tanaman dan dipadatkan dengan menambahkan zat pematat.<sup>51</sup> Zat pematat tersebut dapat berupa agar-agar batangan, agar-agar bubuk atau agar-agar dalam kemasan

---

<sup>50</sup>Modul Bioteknologi, Ibu Lianah M.PD

<sup>51</sup>Op. Cit, hal.84

kaleng yang memang khusus digunakan untuk keperluan laboratorium.

Metode padat dapat digunakan menumbuhkan plantat dari protokrmus setelah dipindahkan dari suspensi sel, dan untuk menumbuhkan plantat dari protoplas yang sudah difungsikan (digabungkan).

(2) Metode cair (liquid method)

Yang dinamakan metode cair / liquid method adalah kallus di dalam budidaya invitro ini medianya cair karena tidak diberi agar-agar atau zat organik lain yang menjadikan medianya padat. Pada sistem budidaya cair dibedakan menjadi dua macam, yaitu:

(3) Metode cair yang static (a liquid static method)

Dalam sistem budidaya ini medianya cair tetapi tetapi tidak digojog. Salah satu metode cair yang static yang disebut dengan metode HELLER. Pada budidaya ini dipakai tabung reaksi dengan diameter 3 cm. Didalamnya terdapat media cair, sehelai kertas filter terbentuk dan diletakan ke dalam medium sehingga dua pertiga bagian kertas filter terbenam didalam medium dan sepertiga bagian menonjol diatas medium.

(4) Metode cair agiatik (a liquid agiatik method)

Metode cair agiatik adalah suatu metode budidaya invitro dimana medium yang dipakai adalah cair. Agitaik yang dimaksud adalah mediumnya yang cair selalu dibuat terguncang bergerak, dengan meletakan botol-botol budidaya diatas penggojog atau shaker. Macam penggojog dapat dibedakan:<sup>52</sup>

- Noating shaker yaitu penggojog dengan gerakanya yang berputar mengelilngi sumbunya yang vertikal.
- Birotoric shaker yaitu menggojog dengan gerakan menurut garis lurus yang hanya maju mundur saja.
- Incubating shaker yaitu penggojokan yang lebih canggih berfungsi sebagai penggojog sekaligus incubator.

2. Prosedur suspensi sel dilaboratorium kultur jaringan

a. Inisiasi kallus

Eksplan ( batang antara ruas kedua *jasminum sambac* ) ditanam pada medium MS (murashige dan skoog) dengan penambahan NAA 1 mg/l, BAP 0,5 mg/l dan

---

<sup>52</sup> Pof. Ir. Moese Suryowinoto, *Pemulihan Tanaman Secara Invitro*, Yogyakarta: Kanisius 1996, hal, 69

5% ekstrat yeast. Media disterilkan dengan autoclave. Batang antara ruas kedua ruas dari tanaman melati dicuci dan disterilisasikan dengan cara merendam didalam bayclean 10% selama lima menit. Setelah itu dibilas dengan aquades sterilis. Eksplan dipotong pada kedua ujungnya dan ditanam pada botol kultur, kultur di inkubasi dengan pencahayaan neon "white cool" 20 watt secara kontinu. Temperatur inkubasi berkisar 25-27 OC dalam waktu 4 minggu kallus akan terbentuk. Kallus adalah masa sel tidak terbetuk yang terdiri dari sel-sel parenkim yang tersusun longgar dan timbul akibat proliferasi sel-sel jaringan induk atau eksplan. Kallus yang diperoleh ada dua macam. Pada bagian permukaan berupa kallus yang friable atau remah, sedangkan bagian dalam realitinya kompak.

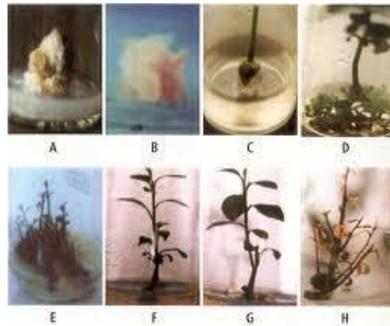
- b. Untuk kallus yang friable dapat langsung dapat dipindah kedalam media cair, diletakan shaker dengan kecepatan 120 rpm. Dengan penggojog kallus di atas shaker, maka akan terjadi perumbuhan sel yang luar biasa cepatnya. Sel dapat tumbuh dengan cepat karena berada di dalam suatu medium yang homogen dan gradual nutrisinya tidak ada. Sehingga permukaan kallus menjadi lebih baik dalam berkontak dengan nutrisi dibandingkan dengan kallus yang tumbuh diatas media padat. Pertumbuhan sel terjadi dengan cepat, karena kallus dapat menyerap

nutrisi dari dalam medium dengan sangat baik, apalagi jika diimbangi dengan suplai zat hara secara teratur sehingga media tidak kehabisan nutrisi.

- c. Sedangkan untuk kallus yang relatif kompak, diberi perlakuan terlebih dahulu untuk memisahkan sel satu dengan yang lain. Pemisahan sel dapat dilakukan dengan cara merendam kallus dalam larutan paktinase yang diberi senyawa osmotikum. Pektinase yang digunakan adalah macerozymo R10 1% ditambah 0,3 % mannitol. Kallus direndam selama satu malam. Kemudian suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 150 spm selama lima menit. Supermatan dibuang dan pelet diresuspensi kembali dengan media cair serta disentrifugasi kembali (kecepatan dan waktu yang sama). Proses ini di ulang 2-3 kali untuk menghilangkan larutan enzim. Setelah itu diresuspensi kembali dengan 2 ml media cair, untuk kemudian ditanam pada media cair, diletakan pada shaker dan diinkubasi.

Penggunaan metode cair lebih ditekankan untuk suspensi sel, yaitu untuk menumbuhkan PLB (protocorm like bodies atau disebut juga protokormus ). Drai protokormus ini nantinya dapat tumbh menjadi plantet apabila dipindahkan ke dalam media plantat yang sesuai. Selain untuk menumbuhkan protokrmus, media

cair juga di gunakan untuk memperbanyak kallus dengan jalan, berulang-ulang kali mengadakan sub kultur. Dengan perlakuan sub kultur maka jumlah kallus dapat berlipat ganda. Keberhasilan mendapatkan kallus yang baik pada suspensi sel ini ditentukan oleh beberapa faktor antara lain : jumlah kallus didalam elemeyer tidak boleh terlalu banyak atau terlalu padat karena dapat memperlambat pertumbuhan. Disamping itu, volume media cair tidak boleh terlalu besar , supaya apabila diberi kallus keadaan tidak keruh dan tidak terlalu ecer.



Gambar X.1

#### **D. RANGKUMAN**

2. Suspensi sel yaitu kultur dari sel-sel bebas di dalam medium cair.
3. Suspensi sel mempunyai tujuan untuk memecah kallus menjadi single sel
4. Suspensi sel menghasilkan dua macam tipe sel yaitu single sel dan kelompok sel atau gumpalan sel.
5. Suspensi sel dimulai dari kallus-kallus yang baik untuk suspensi sel adalah kallus yang fariable.
6. Teknik kultur jaringan dapat dilakukan dengan dua macam metode yaitu metode padat (solid method) dan metode cair (liquid method). Metode cair dibedakan menjadi metode cair yang static (a liquid staic method) dan metode cair agiatik (a liquid agiatik method).
7. Untuk suspensi sel lebih ditekankan menggunakan media cair yaitu untuk menumbuhkan plb(protocorm like bodies atau disebut protokormus)

#### **E. LATIHAN SOAL DAN JAWAB**

##### **Pertanyaan –pertanyaan**

##### **Jawablah pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.**

1. Apa yang dimaksud suspensi sel dalam kultur jaringan in vitro?
2. Bagaimana cara memisahkan antara single cell dan kelompok sel melalui suspensi sel?

3. Mengapa kallus yang variable lebih efektif digunakan dalam suspensi sel daripada kallus?
4. Diantara medium cair dan medium padat, manakah yang lebih efektif dalam melakukan suspensi sel?  
Metode cair lebih ditekankan dalam suspensi sel, yaitu untuk menumbuhkan PLB (protocorm like bodies /protokormus) yang akan memebentuk plantlet pada media yang sesuai.
5. Sebutkan media tanaman yang dapat digunakan dalam suspensi sel?
6. Apa yang dihasilkan dari kultur melalui suspensi sel?
7. Bagaimana prosuder untuk melakuakn suspensi sel?
8. Apa yang dimaksud dengan metode cair agiatik?  
Adalah suatu metode budidaya invitro dimana medium yang dipakai adalah cair. Agiatik yang dimaksud adalah mediumnya yang cair selalua dibuat terguncang bergerak, dengan meletakan botol-botol budiday diatas penggojog atau shakar.
9. Jelaskan macam-macam penggojogan?
  - Noating shaker yaitu: penggojokan dengan gerakan yang berputar mengelilingi sumbunya yang vertikal.

- Birotoric shaker yaitu: penggojogan dengan gerakan menurut garis lurus yang hanya maju mundur saja.
- Incubating shaker yaitu: penggojogan yang lebih canggih berfungsi sebagai penggojogan sekaligus incubator.

### **Kunci Jawaban**

1. Suspensi sel adalah metode kultur dari sel-sel bebas didalam medium cair dengan cara memecah kallus menjadi single cell.
2. Singe cell dalam medium cair akan mengapung dan keruh, sedangkan kelompok sel akan tampak mengendap dengan nylon filter akan dilakukan penyaringan agar gumpalan / kelompok sel dapat tertahan sedangkan single cell akan mampu menembus dan terapung pada medium air.
3. Kallus yang variable lebih akan lebih mudah dipecah sehingga single cell mampu terpisah dan memiliki kemampuan untuk tumbuh dan membelah diri daripad kallus yang kompak, memilki struktur yang terlalu solid sehingga kallus sulit dipecah membentuk single cell.
4. Media tanaman yang dapat digunakan dalam suspensi sel?
  - Metode padat (solid method) dengan cara penambahan zat pematat berupa agar-agar batangan ataupun agar-agar bubuk.

- Metode cair (liquid method) dengan cara tidak menambahkan zat pematat pada media tanamannya.
- 5. Yang dihasilkan dari kultur melalui suspensi sel adalah Single cell dan Kompak sel.
- 6. Untuk suspensi sel lebih ditekankan menggunakan media cair yaitu untuk menumbuhkan plb (protocorm like bodies atau disebut protokormu
- 7. Prosuder untuk melakuakn suspensi sel dengan cara inisiasi kallus : eksplan ditanam dalam medium MS. Ditambah NAA 1 mg/l dan ditambahkan ekstrat yeast 5% ditambahkan BAP 0'5 mg/l disterilkan dalam byclean, kemudian setelah itu eksplan dipotong kedua ujungnya lalu diinkubasi dengan cahaya neon dan temperatur 25-27°C sampai terbentuk kallus. Setelah terbentuk kalus lalu dipindahkan pada medium cair, diletakan pada shaker dengan kecepatan 120 rpm agar kallus mendapat nutrisi' kallus yang kompak harus direndam dalam larutan pektinase setelah terbentuk single cell lalu dipindahkan pada medium cair diletakan pada shaker kemudin diinkubasi. Sitokinin (kinetin, BAP, zeatid, z- ip), Asam giberelat (GA<sub>3</sub>), Asam absisat, Auksin (NAA, IAA, IBA, 2,4D, MCPA.
- 8. Metode cair agiatik adalah suatu metode budidaya invitro dimana medium yang dipakai adalah cair. Agiatik yang dimaksud adalah

mediumnya yang cair selalua dibuat terguncang bergerak, dengan meletakkan botol-botol budiday diatas penggojog atau shakar.

9. Macam-macam penggojogan :
  - Noating shaker yaitu: penggojokan dengan gerakan yang berputar mengelilingi sumbunya yang vertikal.
  - Birotoric shaker yaitu: penggojogan dengan gerakan menurut garis lurus yang hanya maju mundur saja.
  - Incubating shaker yaitu: penggojogan yang lebih canggih berfungsi sebagai penggojogan sekaligus incubator.

## **BAB XI**

### **MIKROPROPAGASI**

#### **A. PENDAHULUAN**

Teknik budaya tanaman dengan menggunakan metode konvensional dalam medium tanah atau pasir sering kali menghadapi kendala teknis, lingkungan maupun waktu. Sebagai contoh, perbanyakan tanaman dengan menggunakan biji memerlukan waktu yang relatif lama dan seringkali hasilnya tidak seperti tanaman induknya. Kendala lain yang sering muncul adalah gangguan alam, baik yang disebabkan oleh jasad hidup maupun lingkungan yang dapat mengganggu keberhasilan perbanyakan tanaman di lapangan.

Kebutuhan akan bibit tanaman dalam jumlah besar, berkualitas, bebas hama dan penyakit serta harus tersedia dalam waktu singkat seringkali tidak dapat dipenuhi dengan metode konvensional baik secara generatif maupun vegetatif, oleh karena itu manusia terus mengembangkan ilmu pengetahuan dan teknologi untuk memperoleh hasil yang menguntungkan. Cloning pada tumbuhan menggunakan dasar kultur jaringan/ tissue culture yang mengacu pada kemampuan totipotensi tumbuhan. Totipotensi adalah kemampuan sel untuk menjadi individu baru. Teknik ini berjalan dengan cara mengambil salah satu bagian dari jaringan dasar sel-sel tubuh tumbuhan (baik bisa akar, daun ataupun batang) kemudian ditempatkan di media

yang sesuai untuk pertumbuhan. Kloning ini biasanya dilakukan pada tanaman yang menghasilkan nilai ekonomi yang tinggi dan menguntungkan bagi manusia. Kultur jaringan ini merupakan cara perkembangbiakan secara vegetatif, maka dengan demikian dikenal sebagai *mikropropagasi*.

Metode-metode yang umum digunakan dalam propagasi in vitro ini antara lain adalah dengan :

1. Multiplikasi dari tunas aksiler
2. Pembentukan tunas adventif dan atau embrio somatic adventif baik secara langsung maupun tidak langsung. Langsung artinya, tunas atau embrio terbentuk langsung dari jaringan atau organ yang ditanam, sedangkan tidak langsung berarti tunas atau embrio terbentuk melalui fase kalus atau suspensi, yang diperoleh dari proliferasi eksplan. Sebagaimana Allah berfirman dalam Al Qur an Surat Ar-Rad ayat 4

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُّتَجَوِّرَاتٌ ۖ وَجَنَّتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزَرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ ۖ

وَغَيْرُ صِنَوَانٍ يُسْقَىٰ بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفْضَلُ بَعْضُهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي

الْأَكْلِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿٤﴾

4. dan di bumi terdapat bagian-bagian yang berdampingan, kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman, pohon kurma yang bercabang dan yang

*tidak bercabang; disirami dengan air yang sama, tetapi Kami lebihkan tanaman yang satu dari yang lainnya dalam hal rasanya. Sesungguhnya, pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang-orang yang mengerti.*<sup>53</sup>

Dalam firman tersebut disinggung Allah melebihkan dari tanaman yang satu dengan yang lainnya, maka secara garis besar ada perkebangbiakan dengan cara yang lain. Dalam hal ini melalui pemotongan bagian tumbuhan kemudian dibiakan dalam media yang sesuai sehingga akan didapatkan hasil yang banyak dan cepat yang terkenal dengan nama kultur jaringan yang dalam hal ini dilakukan teknik mikro propagasi.

## **B. POKOK BAHASAN**

1. Pengertian mikropropagasi
2. Bagaimana tahap-tahap mikropropagasi
3. Keuntungan dari mikropropagasi.
4. Prosedur Kultur Tunas Aksiler (Microcutting :  
Microstek

## **C. PEMBAHASAN**

### **1. Pengertian Mikropropagasi**

Mikropropagasi merupakan perbanyakan dari galur tanaman yang terpilih melalui tehnik

---

<sup>53</sup> Departemen Agama RI, *Mushaf Alqur'an Terjemah*, (Jakarta: Al Huda. 2002), hlm. 250

kultur jaringan.<sup>54</sup> Kultur jaringan merupakan teknik perbanyak tanaman secara vegetatif buatan yang didasarkan pada sifat *totipotensi* tumbuhan. Sifat *totipotensi* pada tumbuhan membuat sel tumbuhan dalam proses kultur jaringan dapat berkembang menjadi tumbuhan lengkap jika ditumbuhkan pada kondisi tertentu.<sup>55</sup>

Mikropropagasi harus dilakukan di tempat yang mempunyai peralatan yang lengkap seperti bilik media, bilik kultur, bilik pertumbuhan yang bebas kuman dan suhu yang sesuai.<sup>56</sup>

Mikropropagasi dilakukan sebagai alternatif perbanyak tanaman bukan menggunakan media tanah, melainkan menggunakan medium buatan yang dibuat sedemikian rupa, sehingga tanaman dapat tumbuh menjadi bibit yang siap ditanam.<sup>57</sup>

## 2. Tahap-Tahap Mikropropagasi

Untuk mengembangkan tanaman secara mikropropagasi sampai menjadi plantlet dan akhirnya menjadi tanaman lengkap yang siap

---

<sup>54</sup><http://mediakulturjaringan.blogspot.com/2010/10/mikropagasi-perbanyak-tanaman-nanas.html>, 2 maret 2011, 14:25:10

<sup>55</sup> Pratiwi, dkk., *Biologi untuk SMA Kelas XII*, (Jakarta: Erlangga. 2006), hlm. 173

<sup>56</sup><http://asastaniorganik.wordpress.com/2009/08/18/kultur-tisu>, 2 maret 2011, 14:30:30

<sup>57</sup> Anggota AKAPI, *Bioteknologi Pertanian*, (Yogyakarta: Gajah Mada University Press. 2008), cet., ke-II, hlm. 164

dipindahkan ke medium tanah, maka terdapat beberapa tahapan utama yang harus dilakukan, yaitu:

a. Pemilihan dan penyiapan tanaman induk sumber eksplan

Tanaman tersebut harus jelas jenis, spesies, dan varietasnya serta harus sehat dan bebas dari hama dan penyakit. Lingkungan tanaman induk yang lebih higienis dan bersih dapat meningkatkan kualitas eksplan.<sup>58</sup>



Gambar 11.1: Penyiapan tanaman induk sumber eksplan.<sup>59</sup>

b. Menyiapkan tempat dan media

Ruang pengkulturan harus bersih (steril) dengan menyapu ruang dalam kotak dengan larutan 70% alkohol atau 10% klorox atau larutan peluntur. Semua bahan yang tersedia

---

<sup>58</sup><http://kultur-jaringan.blogspot.com/2009/08/tahapan-tahapan-kultur-jaringan.html>, 1 maret 2011, 14:16:10

<sup>59</sup>*Ibid.*

dalam kotak kultur harus betul-betul steril. Tangan juga perlu bebas kuman. Peralatan kultur juga boleh direndam dalam larutan 70% alkohol. Ruang yang bisa digunakan laminar air flow.

Media yang digunakan dalam mikropropagasi berupa padat dan cair, yang menjadi catatan media digunakan mengandung lima komponen utama, yaitu:

- c. Senyawa anorganik terdiri atas unsur-unsur makro dan mikro yang umumnya mengandung nitrat dan potassium pada konsentrasi masing-masing 25 mM.
  - (1) Sumber karbon yang digunakan dapat berupa glukosa, fruktosa, maltosa atau sukrosa dengan konsentrasi sekitar 2-4%.
  - (2) Vitamin yang digunakan adalah thiamin, pyridoxine, dan asam nikotinat.
  - (3) Suplemen senyawa organik adalah asam amino, ekstra khamir, pepton, dan ekstrak malt.
  - (4) Zat pengatur untuk mendukung pertumbuhan. Kombinasi untuk perbanyakan meliputi: acetic acid 2,4 diclorophenoxy (2,4 D) atau 1-naphtalene acetic acid (NAA) dan sitokinin (kinetin, benzyl adenosine, 2-isopentyl adenosine, zeatin, thidiaruzon), dan untuk regenerasi diperlukan auksin (NAA, indole acetic acid atau IAA, indole butyric acid atau IBA)

dalam konsentrasi rendah dan sitokinin dalam konsentrasi tinggi tetapi bukan dalam bentuk 2,4-D.<sup>60</sup>



Gambar 11.2: laminar air flow

Gambar 11. 3: bekas media yang sedia steril<sup>61</sup>



Gambar 11, 4: bekas media yang boleh diautoklaf tahan pada tekanan dan suhu tinggi<sup>62</sup>

---

<sup>60</sup> Anggota AKAPI, *Op.Cit.*, hlm. 166-167.

<sup>61</sup> <http://asastaniorganik.wordpress.com/2009/08/18/kultur-tisu>, 2 maret 2011, 15:01:20

## 1. Inisiasi kultur

Tujuan utama dari propagasi secara *in-vitro* tahap ini adalah pembuatan kultur dari eksplan yang bebas mikroorganisme serta inisiasi pertumbuhan baru. Untuk mendapatkan kultur yang bebas dari kontaminasi, eksplan harus disterilisasi.

Kesesuaian bagian tanaman untuk dijadikan eksplan, dipengaruhi oleh banyak faktor. Tanaman yang memiliki hubungan kekerabatan dekat pun, belum tentu menunjukkan respon *in-vitro* yang sama. Penggunaan eksplan yang tepat merupakan hal penting yang juga harus diperhatikan pada tahap ini. Umur fisiologis dan ontogenetik tanaman induk, serta ukuran eksplan bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan, merupakan faktor penting dalam tahap ini. Bagi kebanyakan tanaman, eksplan yang sering digunakan adalah tunas pucuk (tunas apikal) atau mata tunas lateral pada potongan batang berbuku.<sup>63</sup>

---

<sup>62</sup> *Ibid.*

<sup>63</sup> <http://kultur-jaringan.blogspot.com/2009/08/tahapan-tahapan-kultur-jaringan.html>, 1 maret 2011, 14:16:10



Gambar 11.5: Tahap inisiasi.<sup>64</sup>

2. Multiplikasi atau perbanyakkan propagul

Pada tahap ini, perbanyakkan dapat dilakukan dengan cara merangsang terjadinya pertumbuhan tunas cabang dan percabangan aksiler atau merangsang terbentuknya tunas pucuk tanaman secara adventif, baik secara langsung maupun melalui induksi kalus terlebih dahulu.

3. Pemanjangan tunas, induksi, dan perkembangan akar

Tujuan dari tahap ini adalah untuk membentuk akar dan pucuk tanaman yang cukup kuat untuk dapat bertahan hidup sampai saat dipindahkan dari lingkungan *in-vitro* ke lingkungan luar. Dalam tahap ini, kultur tanaman akan memperoleh

---

<sup>64</sup><http://kultur-jaringan.blogspot.com/2009/08/tahapan-tahapan-kultur-jaringan.html>, 6 maret 2011, 14:45:27

ketahanannya terhadap pengaruh lingkungan, sehingga siap untuk diaklimatisasikan.

Tunas-tunas yang dihasilkan pada tahap multiplikasi di pindahkan ke media lain untuk pemanjangan tunas. Media untuk pemanjangan tunas mengandung sitokinin sangat rendah atau tanpa sitokinin. Tunas tersebut dapat dipindahkan secara individu atau berkelompok. Pemanjangan tunas secara berkelompok lebih ekonomis daripada secara individu. Setelah tumbuh cukup panjang, tunas tersebut dapat diakarkan.



Gambar 11.6: pemanjangan tunas, induksi, dan perkembangan akar.<sup>65</sup>

Pemanjangan tunas dan pengakarannya dapat dilakukan sekaligus atau secara

---

<sup>65</sup>*Ibid.*,

bertahap, yaitu setelah dipanjangkan baru diakarkan. Pengakaran tunas *in-vitro* dapat dilakukan dengan memindahkan tunas ke media pengakaran yang umumnya memerlukan auksin seperti NAA atau IBA. Keberhasilan tahap ini tergantung pada tingginya mutu tunas yang dihasilkan pada tahap sebelumnya. Disamping itu, beberapa perlakuan yang disebut *hardening in vitro* telah dilaporkan dapat meningkatkan mutu tunas sehingga planlet atau tunas mikro tersebut dapat diaklimatisasikan dengan persentase yang lebih tinggi. Beberapa perlakuan yang bisa dilakukan sebagai berikut:

- a) Mengondisikan kultur di tempat yang pencahayaannya berintensitas lebih tinggi (contohnya 10000 lux) dan suhunya lebih tinggi.
- b) Pemanjangan tunas mikro dilakukan dalam media kultur dengan hara mineral dan sukrosa lebih rendah dan konsentrasi agar-agar lebih tinggi.

#### 4. Aklimatisasi

Dalam proses perbanyak tanaman secara kultur jaringan, tahap aklimatisasi planlet merupakan salah satu tahap kritis yang sering menjadi kendala dalam produksi bibit secara masal. Pada tahap ini, planlet

atau tunas mikro dipindahkan ke lingkungan di luar botol seperti rumah kaca, rumah plastik, atau screen house (rumah kaca kedap serangga) proses ini disebut aklimatisasi.

Aklimatisasi adalah proses pengkondisian plantlet atau tunas mikro (jika pengakaran dilakukan secara *ex-vitro*) di lingkungan baru yang aseptik di luar botol, dengan media tanah, atau pakis sehingga plantlet dapat bertahan dan terus menjadi bibit yang siap ditanam di lapangan. Prosedur pembiakan dengan kultur jaringan baru bisa dikatakan berhasil jika plantlet dapat diaklimatisasi ke kondisi eksternal dengan keberhasilan yang tinggi.

Tahap ini merupakan tahap kritis karena kondisi iklim mikro di rumah kaca, rumah plastik, rumah bibit, dan lapangan sangatlah jauh berbeda dengan kondisi iklim mikro di dalam botol. Kondisi di luar botol berkelembaban jauh lebih rendah, tidak aseptik, dan tingkat intensitas cahayanya jauh lebih tinggi daripada kondisi dalam botol. Plantlet atau tunas mikro lebih bersifat heterotrofik karena sudah terbiasa tumbuh dalam kondisi berkelembaban sangat tinggi, aseptik, serta suplai hara mineral dan sumber energi berkecukupan.



Gambar 11. 7: contoh aklimatisasi.<sup>66</sup>

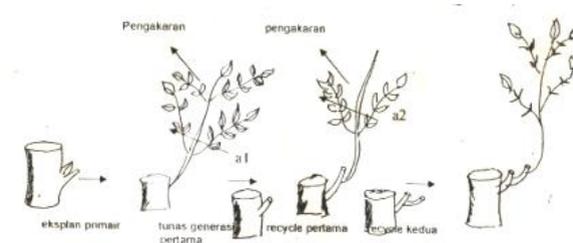
Disamping itu tanaman tersebut memperlihatkan beberapa gejala ketidaknormalan, seperti bersifat sukulen, lapisan kutikula tipis, dan jaringan vaskulernya tidak berkembang sempurna, morfologi daun abnormal dengan tidak berfungsinya stomata sebagai mana mestinya. Struktur mesofil berubah, dan aktifitas fotosintesis sangat rendah. Dengan karakteristik seperti itu, planlet atau tunas mikro mudah menjadi layu atau kering jika dipindahkan ke kondisi eksternal secara tiba-tiba. Karena itu, planlet atau tunas mikro tersebut diadaptasikan ke kondisi lingkungan yang baru yang lebih k

---

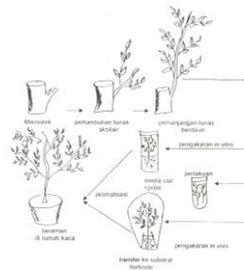
<sup>66</sup>*Ibid.*,

### 3. Prosedur Kultur Tunas Aksiler (Microcutting : Microstek)

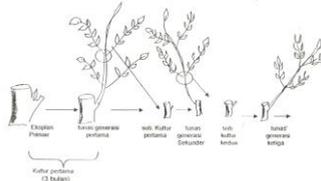
Ada tiga prosedur kultur tunas aksiler: recycle eksplan primer (gambar 1), mikrostek simple (gambar 2), dan kultur sekunder (gambar3)



Gambar 1 : Skematis Prosedur recycle eksplan primer



gambar 2 : Gambaran skematis prosedur mikrotek simpel



Gambar 11.8 : Skematis Prosedur Kultur Sekunder

#### **4. Macam-macam Propagasi atau Kloning**

##### **a. Kultur Organ**

Eksplan pada propagasi kultur organ dapat berupa tunas adventif ataupun akar adventif misalnya: pucuk tanaman tebu, umbi wortel, tunas pucuk pada bawang putih, daun muda dan tangkai daun.

##### **b. Kultur Maristem**

Eksplan pada propagasi kultur maristem dapat berupa tunas atau cabang aksiler (axillary branching) berupa ruas batang (single node culture), misalnya: tangkai bunga, tunas anggrek, ruas batang, biji belinjo, kepala sari.

##### **c. Sel yang Mempunyai Tipe Khusus**

Sela yang mempunyai tipe khusus terdapat pada serbuk sari (haploid:  $n$ ) dan endosperm (triploid:  $2n$ ), yang biasanya disebut kultur antera dan kultur endosperm.

#### **5. Keuntungan yang Dihasilkan dalam Mikropropagasi**

- a. Bioteknologi untuk menghasilkan zat-zat persenyawaan yang bermanfaat biasa diambil dari tanaman langsung.
- b. Tidak perlu menunggu tahunan sampai tanaman cukup besar untuk dipungut hasilnya.
- c. Tidak memerlukan areal tanah yang luas.

- d. Mendapatkan tanaman baru yang memiliki ciri fisiologis dan morfologi yang sama dengan induknya.
- e. Kadar persenyawaan yang berguna dalam kalus, peningkatannya dapat dimanipulasi dengan :
  - Memakai medium lain yang lebih sesuai.
  - Mengubah salah satu kadar komponen dalam medium
  - Memberi zat tambahan tertentu ke dalam medium
- f. Mendapatkan tanaman baru dalam jumlah yang banyak dan waktu yang singkat.
- g. Sebagai salah satu upaya guna kepentingan konservasi tanaman langka.

#### **D. RANGKUMAN**

1. Mikropropagasi merupakan perbanyakan dari galur tanaman yang terpilih melalui tehnik kultur jaringan.
2. Tahap-tahap mikropropagasi:
  - Pemilihan dan penyiapan tanaman induk sumber eksplan
  - Menyiapkan tempat dan media
  - Inisiasi kultur
  - Multiplikasi atau perbanyakan propagul
  - Pemanjangan tunas, induksi, dan perkembangan akar
  - Aklimatisasi

3. Keuntungan mikropropagasi:
  - Menghasilkan bibit dalam jumlah yang besar tanpa memerlukan jumlah induk yang banyak
  - untuk itu kritik dan saran yang membangun tetap diharapkan sebagai acuan dalam pembuatan makalah selanjutnya. Semoga bermanfaat bagi kita semua Waktu yang relatif singkat dan bibit yang dihasilkan bebas patogen.
4. Kerugian mikropropagasi
  - Mengurangi keanekaragaman genetik.

## **E. SOAL DAN JAWABAN**

1. Bagaimana teknik pelaksanaan dalam mikropopagasi ?

Jawaban :

- i. Memilih eksplan
  - ii. Memilih medium
  - iii. Persiapan eksplan, medium dan alat
  - iv. Sterilisasi alat dan medium
  - v. Sterilisasi eksplan
  - vi. Mananam eksplan
  - vii. Pemeliharaan sampai tumbuh kalus dan plantet
  - viii. Aglimitasi atau pemindahan ke lapangan
2. Apa macam –macam dari propagasi atau kloning?

Jawaban :

- a. Kultur organ
  - b. Kultur maristem
  - c. Sel yang mempunyai tipe khusus
3. Bagaimana caranya untuk pengambilan eksplan dalam propagasi ?

Jawaban :

- a. Umbi wortel yang telah dibersihkan, kira-kira sepanjang 6 cm di bagian tengahnya di potong dengan menggunakan skalpel
  - b. Umbi wortel di potong menjadi 3 bagian, kemudian di potong-potong lagi setebal kira-kira 5mm
  - c. Habis di potong-potong kira-kira 5 mm, kemudian diletakkan terlentang diatas cawan petri, kemudian di iris pinggir-pinggirnya
  - d. Maka potongan tersebut inilah siap untuk di pakai sebagai eksplan
4. Apa sajakah kerugian yang dialami dalam melaksanakan mikropopagasi ?

Jawaban :

- a. Kalau tidak terjadi dalam mikropopagasi akan mengakibatkan mutasi
- b. Di karenakan pada tahap pengkloningan ini, sangat sulit dilakukan dan hasilnya baru orang luar negeri saja yang bisa

## BAB XII MIKROGRAFTING

### A. PENDAHULUAN

Bioteknologi merupakan aplikasi organisasi atau bagian dari tubuh organism dalam teknologi untuk menghasilkan suatu yang bermanfaat. Hal ini berhubungan dengan pemanfaatan organism atau komponen selulernya secara terarah dan terkontrol yang melibatkan multi disiplin dan merupakan aplikasi terpadu antara mikrobiologi, biokimia, biologi sel, genetika molekuler, rekayasa genetika, dan teknik kimia.<sup>67</sup>

Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan tanaman secara vegetative buatan yang didasarkan pada sifat teori totipotensi tumbuhan. Totipotensi adalah kemampuan sel atau jaringan organism untuk tumbuh menjadi individu baru.<sup>68</sup> Totipotensi tumbuhan membuat sel tumbuhan dalam proses kultur jaringan dapat berkembang menjadi tumbuhan lengkap jika pada kondisi yang memungkinkan. Dengan kultur jaringan dalam waktu yang bersamaan dapat direroleh bibit tanaman dalam jumlah yang banyak. Beberapa metode atau cara dalam kultur jaringan diantaranya yaitu Mirrografting, Budding, Suspensi Sel,

---

<sup>67</sup> Sukarno Moh. Amin, *Buku Paket Biologi 3*, ( Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, 1995)hlm.50

<sup>68</sup> Prawirosudirjo, Ganadi, *Kamus Istilah Anatomi dan Zoologi*(Jakarta: Bharata,1969) hlm.329

Mikropopagasi, Layering, Kultur Protoplasma, Kultur Organ, Kultur Kalus dan Kultur Sel Haploid.

Melihat realita saat ini dimana keadaan bumi semakin panas, lapisan ozon yang menipis, es kutub meleleh dan banyaknya orang yang kemiskinan karena kelaparan, diperlukan langkah yang nyata untuk mengatasi masalah tersebut. Dengan beberapa teknik kultur jaringan akan mendapatkan, satu, bibit banyak dalam waktu yang singkat yang identik dengan induknya, dua, membuat tumbuhan dengan sifat-sifat yang kita kehendaki dan yang ketiga, dengan teknik- teknik tersebut dapat memperbanyak jenis tanaman untuk mengatasi Global Warming.

Pada makalah ini akan dibahas metode mikrografting sebagai salah satu usaha perbanyakan tanaman dari bentuk perkembangan bioteknologi (kultur jaringan).

## **B. POKOK BAHASAN**

Dalam makalah ini akan dibahas beberapa masalah yaitu:

1. Pengertian mikrografting.
2. Proses dalam metode mikrografting
3. Tahap-tahap perkembangan dalam mikrografting.
4. Keuntungan dan kerugian penggunaan metode mikrografting,

## **C. PEMBAHASAN**

### **1. Pengertian Mikrografting**

Mikrografting adalah usaha untuk memperbanyak tanaman dengan jalan menempelkan dua batang tanaman sehingga membentuk satu kesatuan batang. Di dalam mikrografting ini ada dua istilah yang digunakan yaitu batang induk yang dinamakan stock dan batang tanaman lain yang akan digabungkan pada stock plant yang dinamakan scion.<sup>69</sup>

Teknik mikrografting merupakan adopsi dari teknik perbanyakan tanaman yang sudah sering dilakukan secara *ex vitro* yaitu penyambungan batang bawah dan batang atas.<sup>70</sup>

QS. Al- Hijr: 20

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ ﴿٢٠﴾ وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَةً وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ

بِرَازِقِينَ ﴿٢١﴾

Artinya:

[19]. Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran.

---

<sup>69</sup> Zaenal, Arifin, *Dasar Pengetahuan Ilmu Tanaman* (Bandung: Angkasa 1987) hlm. 148

<sup>70</sup> Lianah, *Bahan Ajar Pengantar Bioteknologi* (Semarang: Tadris Biologi IAIN Walisongo, 2008) hlm. 17

*[20]. Dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rizki kepadanya.*

Di dalam proses mikrografting ini, kondisi lingkungan harus diperhatikan. Dengan kondisi lingkungan yang menguntungkan, akan mencapai keberhasilan bagi usaha perbanyakan ini. Temperature sebagai salah satu factor lingkungan cukup menentukan terhadap keberhasilan mikrografting. Pada temperature 55-90 derajat F (12,8-38 derajat C), menurut Hartmann dan Kaster (1975) akan berpengaruh aktifitas sel. Dalam hal ini akan terjadi pertumbuhan secara cepat.

Hasil penelitian Sitton (1931) yang disitir oleh Hatmann dan Kaster menunjukkan bahwa temperature sekitar 60-100 derajat F berpengaruh terhadap pembentukan callus bagi mikrografting. Adapun temperature optimum bagi presentase pembentukan callus yang paling tinggi yaitu 80-90 derajat F. Hal lain yang berpengaruh terhadap keberhasilan mikrografting yaitu jenis tanaman, aktivitas pertumbuhan suatu stock plant, tehnik propagasi, kontaminasi oleh virus, serangan hama dan penyakit, dan hormone tumbuh yang berperan selama mikrografting itu terjadi.

Khusus mengenai hormon tumbuh ini, kehadiran kinetin dan auxin sangat menentukan

terhadap pembentukan callus. Hasil penelitian Murasige dan Skoog (1962) dan Overbeek (1966) menunjukkan bahwa penggabungan penggunaan kinetin dan IAA memperlihatkan keberhasilan pembentukan callus, dibandingkan hanya dengan kinetin saja.<sup>71</sup>

## **2. Proses-Proses Dalam Metode Mikrografting**

Ada beberapa proses dalam perbanyakan tanaman melalui metode mikrografting, beberapa alat dan bahan yang dibutuhkan dalam metode mikrografting yaitu:

Alat:

1. Pisau
2. Tali atau raffia
3. Plastik
4. Botol air mineral

Bahan:

1. Bakal tanaman(batang)
2. Air
3. Tanah
4. Pupuk organik

Setelah alat dan bahan tersedia, maka proses-proses dalam mikrografting yaitu:

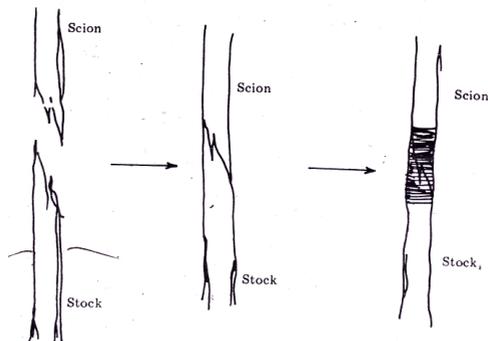
1. Memotong batang tanaman induk dengan menggunakan pisau yang tajam.
2. Potongan batang sebaiknya berukuran antara 15-20 cm dan memiliki tunas cabang.

---

<sup>71</sup> Zaenal, Arifin, *Op. cit.*, hlm. 149

3. Batang pada bagian bawah ditanam dengan media tanah dalam botol air mineral.
4. Tunggu sampai tumbuh akar pada batang stock.
5. Setelah tumbuh akar pada batang stock dilakukan penyambungan dengan batang scion.
6. Penyambungan dilakukan dengan cara menempelkan kedua batang tersebut dengan menggunakan tali raffia.
7. Berikan pupuk organik sesuai kebutuhan dan menyiraminya dengan air secukupnya
8. Lakukan penyiraman pada pagi dan sore hari secara rutin
9. Terakhir, hindarkan tanaman dari sinar matahari secara berlebihan(ditempatkan pada tempat yang teduh).

Dibawah ini merupakan cara perbanyakan tanaman dengan metode mikrografting:



**Gambar 12. 1: Proses Penyambungan**



**Gambar12.2: Bibit Sambung sedang disiapkan**



**Gambar12,3: Batang yang sudah tumbuh akar dan daun siap dipindah**



**Gambar 12.4: Tanah digulud-gulud atau digunduk-gunduk dengan jarak tanam tertentu**

### **3. Tahap-Tahap Perkembangan dalam Mikrografting**

Di dalam peristiwa mikrografting ini Hartman dan Keseter (1975) telah mengemukakan proses sebagai berikut:

Setelah dilakukan penempelan antara stock dan scion, maka pada tahap pertama, di dalam daerah cambium terjadi produksi jaringan callus (parenchyma cell). Pada tahap kedua, parenchyma cell berkembang sehingga terjadi penggabungan antar astock dan scion. Pada tahap ketiga, terjadi differensiasi pada parenchyma cell tertentu dari callus sehingga menjadi sel-sel cambium baru, sehingga terjadi penggabungan antara dua cambium (lama) dari stock dan scion. Setelah tahap pertama sampai dengan tahap ketiga selesai, maka terbentuklah jaringan vascular baru (xylem dan floem) sebagai saluran untuk mengalirkan air dan zat makanan antara stock dan scion.<sup>72</sup>

### **4. Keuntungan dan Kerugian dalam Metode Mikrografting**

#### **1. Keuntungan**

- a. Dapat memilih tumbuhan dengan sifat-sifat yang dikehendaki, tumbuhan yang mempunyai sifat khusus (sifat manis dan asam, enek, buah banyak, tahan bibit penyakit)

---

<sup>72</sup> Zaenal. Arifin, Op.cit, hlm.148

- b. Tidak akan berubah sifatnya atau sama dengan induknya.
  - c. Menghemat lahan
  - d. Dapat dibuat stock dari batang bawah dan batang atas dalam jumlah yang banyak.
  - e. Waktu penyambungan tidak bergantung dari musim.
  - f. Dapat diperoleh tanaman berkualitas baik sifat-sifat batang bawahnya (perakaran kuat, tahan terhadap lingkungan tanah)
2. Kerugian:
- Dalam mikrografting kesulitan yang dihadapi adalah lebih sedikitnya presentase keberhasilan dari pada kegagalan tumbuh.

#### **D. RANGKUMAN**

Dari penjelasan diatas maka dapat disimpulkan:

1. Mikrografting sebagai salah satu usaha perbanyak tanaman dari bentuk perkembangan bioteknologi (kultur jaringan).
2. Teknik mikrografting merupakan adopsi dari teknik perbanyak tanaman yang sudah sering dilakukan secara *ex vitro* yaitu penyambungan batang bawah dan batang atas
3. Kondisi lingkungan yang menguntungkan, akan mencapai keberhasilan bagi usaha perbanyak dengan metode mikrografting (12,8-38 derajat C).
4. Kinetin dan auxin sangat menentukan terhadap pembentukan callus.

Dengan metode mikrografting apat diperoleh tanaman berkualitas akan tetapi kesulitan yang dihadapi adalah lebih sedikitnya presentase keberhasilan dari pada kegagalan tumbuh.

## **E. LATIHAN SOAL DAN JAWABAN**

### **Pertanyaan –pertanyaan**

Jawablah pertanya –pertanyaan dibawah ini!

1. Sebutkan keuntungan dan kerugian dari teknik mikrografting.
2. Jelaskan bagaimana tahap-tahap perkembangan dalam mikrografting.
3. Bagaimana proses-proses dalam metoda mikrografting.
4. Jelaskan mengapa kondisi lingkungan akan menentukan keberhasilan dalam teknik mikrografting.

### **Jawab**

1. Keuntungan dan kerugian dari teknik mikrografting
  - a. Keuntungan dapat memilih tumbuhan dengan sifat-sifat yang dikehendaki, tumbuhan yang mempunyai sifat khusus(sifat manis dan asam, enek, buah banyak, tahan bibit penyakit), Tidak akan berubah sifatnya atau sama dengan induknya, Menghemat lahan, Dapat dibuat stock dari batang bawah dan batang atas dalam jumlah yang banyak, Waktu penyambungan tidak bergantung dari musim. Dapat diperoleh

tanaman berkualitas baik sifat-sifat batang bawahnya (perakaran kuat, tahan terhadap lingkungan tanah).

- b. Kerugian : Dalam mikrografting kesulitan yang dihadapi adalah lebih sedikitnya presentase keberhasilan dari pada kegagalan tumbuh.
2. Tahap-tahap perkembangan dalam mikrografting mikrografting ini Hartman dan Keseter (1975) telah mengemukakan proses sebagai berikut: Setelah dilakukan penempelan antara stock dan scion, maka pada tahap pertama, di dalam daerah cambium terjadi produksi jaringan callus (parenchyma cell). Pada tahap kedua, parenchyma cell berkembang sehingga terjadi penggabungan antar astock dan scion. Pada tahap ketiga, terjadi differensiasi pada parenchyma cell tertentu dari callus sehingga menjadi sel-sel cambium baru, sehingga terjadi penggabungan antara dua cambium (lama) dari stock dan scion. Setelah tahap pertama sampai dengan tahap ketiga selesai, maka terbentuklah jaringan vascular baru (xylem dan floem) sebagai saluran untuk mengalirkan air dan zat makanan antara stock dan scion.<sup>73</sup>
3. **Proses-proses dalam metoda mikrografting** Setelah alat dan bahan tersedia, maka proses-proses dalam mikrografting yaitu: Memotong batang tanaman induk dengan menggunakan pisau yang tajam. Potongan batang sebaiknya berukuran antara 15-20 cm dan

---

<sup>73</sup> Zaenal. Arifin, Op.cit, hlm.148

memiliki tunas cabang. Batang pada bagian bawah ditanam dengan media tanah dalam botol air mineral. Tunggu sampai tumbuh akar pada batang stock. Setelah tumbuh akar pada batang stock dilakukan penyambungan dengan batang scion. Penyambungan dilakukan dengan cara menempelkan kedua batang tersebut dengan menggunakan tali raffia. Berikan pupuk organik sesuai kebutuhan dan menyiraminya dengan air secukupnya. Lakukan penyiraman pada pagi dan sore hari secara rutin. Terakhir, hindarkan tanaman dari sinar matahari secara berlebihan (ditempatkan pada tempat yang teduh).

4. Kondisi lingkungan akan menentukan keberhasilan dalam teknik mikrografting sebab . Dengan kondisi lingkungan yang menguntungkan, akan mencapai keberhasilan bagi usaha perbanyakan ini. Temperature sebagai salah satu factor lingkungan cukup menentukan terhadap keberhasilan mikrografting. Pada temperature 55-90 derajat F (12,8-38 derajat C), menurut Hartmann dan Kaster (1975) akan berpengaruh aktifitas sel. Dalam hal ini akan terjadi pertumbuhan secara cepat..

## **BAB XIII**

### **PERMASALAHAN PENCOKLATAN YANG DIJUMPAI PADA KULTUR IN-VITRO DAN BAHAN MAKANAN**

#### **A. PENDAHULUAN**

Dalam pengembangan tanaman dengan menggunakan kultur in-vitro, keberhasilannya ditentukan oleh beberapa komponen utama, yaitu bahan awal, medium yang sesuai dan tempat kultifikasi. Bahan awal kultur in-vitro disebut sebagai eksplan (seleksi tanaman induk) yang berupa bagian tanaman seperti batang, daun, tunas dan akar. Eksplan merupakan tahap yang paling menentukan keberhasilan dalam kultur in-vitro, untuk itu kesterilan eksplan harus diperhatikan.<sup>74</sup>

Apabila eksplan tidak steril, maka timbul berbagai permasalahan yang sering dijumpai dalam kultur in-vitro seperti pencoklatan, kontaminasi, dan virulivikasi. Permasalah tersebut apabila berlanjut akan menghambat pertumbuhan eksplan dan biasanya diakhiri dengan kematian. Sehingga diperlukan cara untuk mengatasinya. Dan sebagai makhluk hidup yang bertugas menjadi khalifah di bumi, manusia dituntut untuk memikirkan hal tersebut agar kelestarian alam tetap terjaga. Seperti

---

<sup>74</sup>Tribowo Yuwono, *Bioteknologi Pertanian*, (Yogyakarta: Gajah Mada. University Press, 2006), hlm. 164

yang disebutkan dalam Firman Allah SWT pada Surat Al-An'am ayat 95 dan ayat 99:

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۗ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَيُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ ۗ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ ۗ فَاَنَّىٰ تُؤْفَكُونَ ﴿٩٥﴾ ﴾

Artinya: “Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, Maka Mengapa kamu masih berpaling?”(Q.S. Al-An'am: 95)

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۗ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَيُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ ۗ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ ۗ فَاَنَّىٰ تُؤْفَكُونَ ﴿٩٥﴾ فَالِقُ  
الْإِصْبَاحِ وَجَعَلَ اللَّيْلَ سَكَنًا وَالشَّمْسَ وَالْقَمَرَ حُسْبَانًا ۗ ذَٰلِكَ تَقْدِيرُ الْعَزِيزِ الْعَلِيمِ ﴿٩٦﴾ ﴾

Artinya: “Dan dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan Maka kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang

korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.” (Q.S. Al-An’am: 99)

## **B. POKOK BAHASAN**

1. Penyebab terjadinya masalah pencoklatan?
2. Cara mengatasi masalah pencoklatan?

## **C. PEMBAHASAN**

### **1. Permasalahan Pencoklatan**

Browning atau pencoklatan sering terjadi pada buah-buahan seperti peach, pear, salak, pisang dan apel. Ketika kita memakan buah tersebut maka pada potongan sisanya akan berubah warna menjadi kecoklatan. Dalam ilmu pangan, gejala itu dinamakan reaksi enzimatis atau browning atau pencoklatan. Jadi, pencoklatan atau browning adalah terbentuknya warna coklat pada bahan pangan secara alami atau karena proses tertentu.<sup>75</sup>

---

<sup>75</sup><http://WordPress.com/zyanti's Blog.html/> *pencoklatan pada apel*(diakses 25 April 2010)

Selain itu, pada eksplan yang ditanam sering kali segera berubah warna menjadi coklat, yang bila prosesnya berlanjut, maka pencoklatan akan menyebar pada media kultur. Jika hal ini terjadi, maka pertumbuhan eksplan akan terhambat dan biasanya diakhiri dengan nekrose dan mati. Pencoklatan sangat mengganggu jalannya kultur *in vitro*, sehingga sebelum melangkah lebih jauh, permasalahan ini harus diatasi terlebih dahulu. Beberapa tanaman yang sering kali menunjukkan reaksi pencoklatan ketika ditanam dalam media kultur, misalnya: eksplan tunas salak, eksplan tunas pisang, dan eksplan bambu.<sup>76</sup>

Pada umumnya proses pencoklatan ada dua macam yaitu pencoklatan enzimatis dan non enzimatis. Pencoklatan pada buah ini tergolong pada pencoklatan enzimatis, hal ini dikarenakan buah apel atau pada buah-buahan pada umumnya banyak mengandung **substrat senyawa fenolik**. Sedangkan Reaksi pencoklatan non enzimatis belum diketahui secara penuh. Tetapi pada umumnya reaksi pencoklatan non enzimatis yaitu karamelisasi, reaksi Maillard, dan pencoklatan akibat Vitamin C.<sup>77</sup>

---

<sup>76</sup> Lianah, *Pengantar Bioteknologi*, (Semarang: IAIN Walisongo, 2008), hlm. 24

<sup>77</sup> <http://WordPress.com/Anto's Blog.html/> *Browning Pada*

*Makanan* (diakses 25 April 2010)

## 2. Penyebab Terjadinya Masalah Pencoklatan

Ada banyak sekali senyawa fenolik yang dapat bertindak sebagai substrat dalam proses pencoklatan enzimatik pada buah-buahan dan sayuran. Di samping katekin dan turunannya seperti tirosin, asam kafeat, asam klorogenat, serta leukoantosianin dapat menjadi substrat proses pencoklatan. Akan tetapi, **Senyawa fenolik** dengan jenis ortodihidroksi atau trihidroksi yang saling berdekatan merupakan substrat yang baik untuk proses pencoklatan. Proses pencoklatan enzimatik memerlukan adanya enzim fenol oksidase dan oksigen yang harus berhubungan dengan substrat tersebut.

Sedangkan pencoklatan yang terjadi pada kultur in-vitro terjadi karena eksplan yang ditanam banyak yang mengandung senyawa phenol, demikian juga pencoklatan yang terjadi pada buah apel dan buah lainnya setelah dikupas. Senyawa phenol apabila mengalami oksidasi (yang dipacu dengan adanya pelukaan eksplan) dengan perantara enzim *polyphenol oxidase*. Aktifitas enzim *polyphenol oxidase* dengan bantuan oksigen akan mengubah gugus monophenol menjadi O-hidroksi phenol, yang selanjutnya diubah lagi menjadi O-kuinon. Gugus O-kuinon inilah yang

membentuk senyawa berwarna coklat dan bersifat toksik.<sup>78</sup>

Selain karena terdapatnya senyawa fenolik yang menyebabkan pencoklatan pada buah, pencoklatan juga terjadi karena tidak ada/ sedikitnya kandungan vitamin C pada buah. Hal itu dibuktikan dengan tidak berubahnya warna buah dengan kandungan vitamin C yang tinggi, seperti pada jeruk, jambu biji, kiwi, melon, lemon, dan sebagainya. Sebab vitamin C merupakan salah satu vitamin yang diperlukan oleh tubuh dan berfungsi untuk meningkatkan sistem imunitas tubuh serta sebagai antioksidan yang dapat menangkal virus-virus, sehingga pada buah yang memiliki kandungan vitamin C justru memiliki daya tahan yang lebih bagus dalam mencegah infeksi dari berbagai bakteri, virus serta pencoklatan yang terjadi pada lingkungan disekitarnya.

Perbandingan buah yang mengalami pencoklatan dengan buah yang tidak mengalami pencoklatan.

---

<sup>78</sup><http://WordPress.com/zyanti's Blog.html/> *pencoklatan pada apel*(diakses 25 April 2010)

1) Yang mengalami pencoklatan



Gmbr. 13.1:Pencoklatan pada buah apel<sup>79</sup> Gmbr.  
13.2:Pencoklatan pada kentang

---

<sup>79</sup><http://www.ubb.ac.id>Email : [info@ubb.ac.id](mailto:info@ubb.ac.id). Gambar apel-dikupas berwarna coklat (diakses 26 april 2010)

## 2) Yang tidak mengalami pencoklatan



Gmbr.13.3 Irisan buah jeruk tidak mengalami pencoklatan karena mengandung vitamin C.<sup>80</sup>

### 3. Cara Mengatasi Masalah Pencoklatan

Permasalahan pencoklatan yang timbul pada eksplan dapat menyebabkan kematian apabila tidak ada tindak lanjut untuk mengatasinya dan pencoklatan pada buah apel dan buah lainnya setelah dikupas tidak dikehendaki karena warnanya menjadi tidak segar. Oleh sebab itu, diperlukan cara untuk mengatasi permasalahan pencoklatan tersebut.<sup>81</sup>

---

<sup>80</sup><http://www.ubb.ac.id>Email : [info@ubb.ac.id](mailto:info@ubb.ac.id).(diakses 26 april 2010)

<sup>81</sup>Lianah, *OP. Cit.*, hlm 25

Berikut ini beberapa cara yang dipakai untuk mengatasi permasalahan pencoklatan pada eksplan, antara lain:

- a. Penambahan karbon aktif pada media, dengan tujuan karbon aktif akan mengabsorpsi senyawa phenol.
- b. Penambahan *polyvinylpyrolidone* (PVP) ke dalam media kultur, karena PVP dapat mengabsorpsi senyawa phenol.
- c. Dengan menambahkan agen pereduksi ((antioksidasi) untuk mencegah oksidasi senyawa phenol. Apabila reaksi tidak terjadi, maka produksi oksidasi yang berwarna coklat tidak terbentuk. Contoh dari agen pereduksi antara lain: asam askorbat, asam sitrat, dithiotheitol, giutathion, mercaptoethanol, dsb.
- d. Dengan melakukan pemotongan eksplan di dalam air steril atau di dalam air kelapa. Dengan demikian ketersediaan oksigen sangat terbatas dan reaksi oksidasi bisa berkurang.
- e. Penambahan DIECA (*diethylthiocarbamate*) ke dalam medium.
- f. Memberi pra perlakuan pada eksplan. Misalnya dengan merendam eksplan ke dalam suspensi arang aktif dan dapat pula ditambahkan sukrosa ke dalamnya.<sup>82</sup>

Sedangkan Untuk mencegah terbentuknya warna coklat pada buah apel tersebut, dapat dilakukan dengan cara

---

<sup>82</sup>Lianah, *OP. Cit.*, hlm 25

mengoleskan vitamin C pada pisau yang akan digunakan untuk memotong buah, misal dengan buah lemon yang diambil airnya, selain itu dapat juga dilakukan dengan **blanching**. **Blanching** merupakan perlakuan panas terhadap bahan dengan cara merendam bahan dalam air mendidih/ pemberian uap air panas terhadap bahan dalam waktu singkat. Tujuan blanching itu sendiri adalah untuk menginaktifkan enzim terutama enzim peroksidase dan katalase. Selain itu ada beberapa manfaat lain yang dapat diambil dari proses blanching yaitu :

- (1) Membunuh mikrobia terutama yang tidak tahan terhadap panas.
  - (2) Untuk menghilangkan gas-gas yang ada dalam sel/ jaringan bahan sehingga akan menaikkan kualitas hasil akhir.
  - (3) Untuk menghilangkan senyawa-senyawa lilin pada permukaan bahan.
  - (4) Untuk mengerutkan bahan (menaikan isi kaleng dan memudahkan memasukkan bahan kedalam kaleng dalam proses pengalengan)
  - (5) Untuk mempertajam flavour dan warna .
- Caranya setelah di kupas apel dipotong-potong, buah apel direndam dalam air panas dengan suhu 82-93 derajat celcius) atau dikenai uap panas selama 3 menit.

Selain itu, pencegah timbulnya warna coklat pada browning non enzimatis dengan menggunakan sulfite yang dapat berinteraksi dengan gugus karbonil yang mungkin ada pada bahan. Hasil reaksi tersebut akan mengikat melanoidin sehingga **mencegah timbulnya warna coklat**.<sup>83</sup>

#### D. RANGKUMAN

Berdasarkan pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa:

1. Pencoklatan atau browning adalah terbentuknya warna coklat pada bahan pangan secara alami atau karena proses tertentu.
2. Permasalahn pencoklatan pada eksplan dan buah-buahan disebabkan oleh pengaruh aktifitas enzim *polyphenol oxidase*.
3. Pencegahan masalah pencoklatan pada eksplan dengan menambahkan karbon aktif pada media, penambahan *polyvinylpyrrolidone*, antioksidasi dan DIECA. Pada buah-buahan dengan blanching. Sedangkan pada pencoklatan non enzimatis dengan menambahkan sulfite.

#### E. LATIHAN SOAL DAN JAWABAN

1. Apakah yang dimaksud dengan pencoklatan?

---

<sup>83</sup>[http://WordPress.com/Anto's Blog.html](http://WordPress.com/Anto's%20Blog.html)/ *Browning Pada Makanan* (diakses 25 April 2010)

Jawaban: Pencoklatan atau browning adalah terbentuknya warna coklat pada bahan pangan secara alami atau karena proses tertentu.

2. Sebutkanlah beberapa permasalahan pencoklatan yang sering dijumpai pada bahan makanan!

Jawaban: Biasanya permasalahan pencoklatan yang sering dijumpai pada bahan makanan terjadi pada buah dan sayur, seperti apel, pear, peach, salak, pisang dan kentang.

3. Apakah permasalahan pencoklatan yang sering dijumpai dalam kultur in-vitro dan jelaskan dampak yang ditimbulkan dari permasalahan tersebut!

Jawaban: Permasalahan pencoklatan yang sering dijumpai dalam kultur in-vitro biasanya, karena pada eksplan yang ditanam sering kali segera berubah warna menjadi coklat, yang bila prosesnya berlanjut, maka pencoklatan akan menyebar pada media kultur. Jika hal ini terjadi, maka pertumbuhan eksplan akan terhambat dan biasanya diakhiri dengan nekrose dan mati.

4. Mengapa permasalahan pencoklatan pada kultur in-vitro dan bahan makanan dapat terjadi?

Jawaban: Permasalahan pencoklatan pada kultur in-vitro dan bahan makanan dapat terjadi karena adanya senyawa fenolik dengan

jenis ortodihidroksi atau trihidroksi yang berhubungan dengan oksigen dan dibantu dengan kerja enzim *polyphenol oxidase*.

5. Ada berapa macam proses pencoklatan? Sebutkan dan jelaskan!

Jawaban: Ada dua macam pencoklatan, antara lain:

a. Pencoklatan enzimatis : yaitu proses pencoklatan yang terjadi karena pada bahan makanan mengandung substrat senyawa fenolik yang berhubungan dengan oksigen dengan perantara enzim, biasanya terdapat pada buah dan sayuran.

b. Pencoklatan non enzimatis : yaitu proses pencoklatan yang terjadi tanpa bantuan enzim, karena tidak yterdapat oksigen bebas, misalnya karamelisasi, reaksi maillard, dan pencoklatan akibat vitamin C.

6. Enzim apakah yang terdapat dalam proses pencoklatan dan apa peranannya?

Jawaban: Enzim yang terdapat dalam proses pencoklatan adalah enzim *polyphenol oxidase*, yang berperan sebagai perantara pada senyawa fenolik. Aktifitas enzim *polyphenol oxidase* dengan bantuan oksigen akan mengubah gugus monophenol menjadi O-hidroksi phenol, yang selanjutnya diubah lagi

menjadi O-kuinon. Gugus O-kuinon inilah yang membentuk senyawa berwarna coklat dan bersifat toksik.

7. Mengapa pada buah dengan kandungan vitamin C yang tinggi tidak mengalami pencoklatan?

Jawaban: Pada buah dengan kandungan vitamin C yang tinggi tidak mengalami pencoklatan, sebab vitamin C merupakan salah satu vitamin yang diperlukan oleh tubuh dan berfungsi untuk meningkatkan sistem imunitas tubuh serta sebagai antioksidan yang dapat menangkal virus-virus, sehingga pada buah yang memiliki kandungan vitamin C justru memiliki daya tahan yang lebih bagus dalam mencegah infeksi dari berbagai bakteri, virus serta pencoklatan yang terjadi pada lingkungan disekitarnya.

8. Bagaimanakah cara mengatasi pencoklatan pada eksplan?

Jawaban: Cara mengatasi pencoklatan pada eksplan, antara lain:

- a. Penambahan karbon aktif pada media.
- b. Penambahan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) ke dalam media kultur.
- c. Dengan menambahkan agen pereduksi ((antioksidasi) untuk mencegah oksidasi senyawa phenol.

- d. Dengan melakukan pemotongan eksplan di dalam air steril atau di dalam air kelapa.
  - e. Penambahan DIECA  
(*diethtylthiocarbamate*) ke dalam medium.
  - f. Memberi pra perlakuan pada eksplan.
9. Bagaimanakah cara yang mudah untuk mengatasi pencoklatan pada buah?
- Jawaban: Untuk mencegah terbentuknya warna coklat pada buah apel tersebut, dapat dilakukan dengan cara mengoleskan vitamin C pada pisau yang akan digunakan untuk memotong buah, misal dengan buah lemon yang diambil airnya
10. Apakah manfaat yang dapat diambil dari proses blanching?
- Jawaban: Manfaat yang dapat diambil dari proses blanching, antara lain:
- a. Membunuh mikrobia terutama yang tidak tahan terhadap panas.
  - b. Untuk menghilangkan gas-gas yang ada dalam sel/ jaringan bahan sehingga akan menaikkan kualitas hasil akhir.
  - c. Untuk menghilangkan senyawa-senyawa lilin pada permukaan bahan.
  - d. Untuk mengerutkan bahan (menaikkan isi kaleng dan memudahkan

memasukkan bahan kedalam kaleng  
dalam proses pengalengan)

- e. Untuk mempertajam flavour dan  
warna .

**BAB. XIV**  
**APLIKASI PRAKTEK BIOTEKNOLOGI**

**BUDIDAYA JAMUR TIRAM**  
*(Pleurotusostreatus)*

**PETUNJUK PRAKTIKUM SAINS BIOLOGI**  
**JAMUR TIRAM (Pleurotus Treatus)**

**A. Landasan Teori**

Jamur tiram termasuk salah satu dan jenis jamur kayu. Ada beberapa kerabat jamur tiram yang di bedakan berdasarkan warna tubuh buahnya, seperti Pleurotus ostreatus berwarna putih kekuningan. Jamur tiram jenis ini paling populer di budidayakan di indonesia.

Pleurotus sajoroaeju warna tubuh buah kelabu, Pleurotus plorida warna buahnya putih bersih, Pleurotus plabelatus warna tubuh buahnya merah muda, dan Pleurotus eytydious berwarna abalon. Pleurotus ostretus berasal dari bahasa yunani, pleuro berarti bentuk samping ata u posisi menyamping antara tangkai dengan tudung.

Sebutan ostrealus berasal dari warna dan kenampakan tudung yang menyerupai kulit tiram. Tudungbuah pada jamur dewasa mempunyai diametr antara 5 cm sampai 15 cm tumbu ideal pada 4000 m samapi dengan 8000 mdpl, suhu 15° samapi 25° R, kelembaban 60%-80%.

## **1. TUJUAN :**

Membudidayakan jamur tiram

## **2. ALAT DAN BAHAN**

1. serbuk gergaji 100 kg
2. bekatul 10 kg
3. kapur mati 1 kg
4. kapuk 1 gulung
5. Cincin peralon ¼ dm
6. kantung plastik ukuran 18 x 35 x 0,5
7. bibit jamur tiram 1 botol
8. termometer
9. higrometer
10. rak tempat media

## **3. CARA KERJA**

1. Campurkan secara merata bahan nomer 1, 2, dan 3.
2. Tutuplah dengan plastik selama 2 hari agar terjadi fermentasi secara sempurna.
3. Lalu masukkan kedalam kantong plastik, beri cincin pralon dan sumbat dengan kapuk sebagai isolasi dan di press agar padat.
4. Rebuslah selama 8 jam
5. Diginkan selama 48 jam (2 hari 2 malam)
6. Inakulasikan bibit kedalam media ( tempat menanam).
7. Biarkan kurang lebih 2 bulan pada rak, di tempat yang lembab dan suhu antara 15-25° C. Bila miselium sudah memenuhi media plastik siap disobek agar O<sub>2</sub> banyak masuk.

8. Lalu amati apa yang terjadi ?  $\pm$  10 hari catat suhu dan kelembabannya, catat dalam hasil pengamatan dan beri kesimpulannya.
9. Amati pula sampai  $\pm$  6 bulan, apa yang terjadi.

**PROBLEM :**

1. Sebutkan ciri-ciri jamur tiram secara umum.
2. Beri gambar dan keterangannya.
3. Berapa suhu yang diperlukan untuk pertumbuhannya.
4. Berapa pula kelembapan idealnya.
5. Mengapa pada media yang sudah dipersiapkan secara matang tumbuh jamur lain dan ada belatungnya.
6. Bagaimana cara menurunkan jika suhu lebih dari 25° C.
7. Dan bagaimana pula cara menaikkan kelembapan udara kurang dari 60%.
8. Berapa lama jarak antara panen 1 dan panen 2 ?
9. Berapa lama pula media tersebut dapat bertahan ?
10. Sebutkan hama yang bisa menyerang jamur tiram, dan bagaimana cara memberantasnya.

## **LAMPIRAN \_LAMPIRAN**

**Lampiran 1: contoh laporan praktikum  
bioteknologi**

**Lampiran 2: Glosari**

**LAPORAN PRAKTIKUM BIOTEKNOLOGI  
BUDIDAYA JAMUR TIRAM PUTIH**

*Dosen pengampu : Lianah, M. Pd*



**Disusun Oleh :**

**NURDIAN DWI INAYAH**

**083811038**

**FAKULTAS TARBIYAH  
INSTITUT AGAMA ISLAM NEGERI  
WALISONGO  
SEMARANG**

**2011**

## **BUDIDAYA JAMUR TIRAM** (*Pleurotusostreatus*)

### **A. TUJUAN**

Mempelajari cara membudidayakan jamur tiram (*Pleurotusostreatus*)

### **B. DASAR TEORI**

Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) adalah jamur pangan dari kelompok Basidiomycota dan termasuk kelas Homobasidiomycetes dengan ciri-ciri umum tubuh buah berwarna putih hingga krem dan tudungnya berbentuk setengah lingkaran mirip cangkang tiram dengan bagian tengah agak cekung. Jamur tiram masih satu kerabat dengan *Pleurotus eryngii* dan sering dikenal dengan sebutan King Oyster Mushroom.

Tubuh buah jamur tiram memiliki tangkai yang tumbuh menyamping (bahasa Latin: pleurotus) dan bentuknya seperti tiram (*ostreatus*) sehingga jamur tiram mempunyai nama binomial *Pleurotus ostreatus*. Bagian tudung dari jamur tersebut berubah warna dari hitam, abu-abu, coklat, hingga putih, dengan permukaan yang hampir licin, diameter 5-20 cm yang bertepi tudung mulus sedikit berlekuk. Selain itu, jamur tiram juga memiliki spora berbentuk batang berukuran  $8-11 \times 3-4 \mu\text{m}$  serta miselia berwarna putih yang bisa tumbuh dengan cepat.

Di alam bebas, jamur tiram bisa dijumpai hampir sepanjang tahun di hutan pegunungan daerah yang sejuk. Tubuh buah terlihat saling bertumpuk di permukaan batang pohon yang sudah melapuk atau pokok batang pohon yang sudah ditebang karena jamur tiram adalah salah satu jenis jamur kayu. Untuk itu, saat ingin membudidayakan jamur ini, substrat yang dibuat harus memperhatikan habitat alaminya. Media yang umum dipakai untuk membiakkan jamur tiram adalah serbuk gergaji kayu yang merupakan limbah dari penggergajian kayu.

Pada umumnya jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*), mengalami dua tipe perkembangbiakan dalam siklus hidupnya, yakni secara aseksual maupun seksual. Seperti halnya reproduksi aseksual jamur, reproduksi aseksual basidiomycota secara umum yang terjadi melalui jalur spora yang terbentuk secara endogen pada kantung spora atau sporangiumnya, spora aseksualnya yang disebut konidiospora terbentuk dalam konidium. Sedangkan secara seksual, reproduksinya terjadi melalui penyatuan dua jenis hifa yang bertindak sebagai gamet jantan dan betina membentuk zigot yang kemudian tumbuh menjadi primordia dewasa. Spora seksual pada jamur tiram putih, disebut juga basidiospora yang terletak pada kantung basidium.

Mula-mula basidiospora bergerminasi membentuk suatu masa miselium monokaryotik, yaitu miselium dengan inti haploid. Miselium terus bertumbuh hingga hifa pada miselium tersebut berfusi dengan hifa lain yang kompatibel sehingga terjadi plasmogami membentuk hifa dikaryotik. Setelah itu apabila kondisi lingkungan memungkinkan (suhu antara 10-20 °C, kelembapan 85-90%, cahaya mencukupi, dan CO<sub>2</sub> < 1000 ppm) maka tubuh buah akan terbentuk. Terbentuknya tubuh buah diiringi terjadinya kariogami dan meiosis pada basidium. Nukleus haploid hasil meiosis kemudian bermigrasi menuju tetrad basidiospora pada basidium. Basidium ini terletak pada bilah atau sekat pada tudung jamur dewasa yang jumlahnya banyak (lamela). Dari spora yang terlepas ini akan berkembang menjadi hifa monokarion. Hifa ini akan memanjangkan filamennya dengan membentuk cabang hasil pembentukan dari dua nukleus yang dibatasi oleh septum (satu septum satu nukleus). Kemudian hifa monokarion akan mengumpul membentuk jaringan sambung menyambung berwarna putih yang disebut miselium awal dan akhirnya tumbuh menjadi miselium dewasa (kumpulan hifa dikarion). Dalam tingkatan ini, hifa-hifa mengalami tahapan plasmogami, kariogami, dan meiosis hingga membentuk bakal jamur. Nantinya, jamur dewasa

ini dapat langsung dipanen atau dipersiapkan kembali menjadi bibit induk.

### **C. ALAT DAN BAHAN**

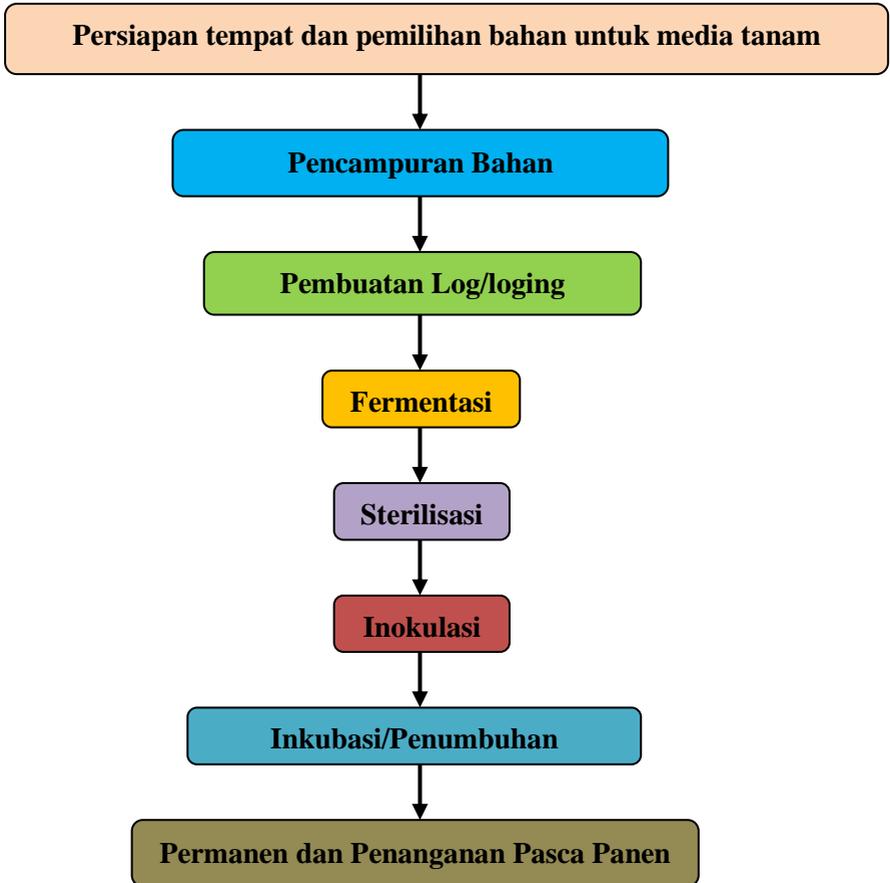
1. Serbuk gergaji 100 kg.
2. Bekatul 10 kg.
3. Kapur mati 1 kg.
4. Kapas
5. Cincin pralon dengan ukuran  $\frac{1}{4}$  dm
6. Kantong plastik ukuran 18cm x 35 cm x 0,5cm
7. Bibit jamur tiram 1 botol
8. Termometer
9. Higrometer
10. Rak tempat media

### **D. CARA KERJA**

1. Mancampur secara merata bahan no. 1,2 dan 3
2. Memasukan dalam kantong plastik, dan sumbat dengan kapas sebagai isolasi dan dipres agar padat
3. Merebus selama kurang lebih 6 jam
4. Mendinginkan selama 24 jam
5. Menginokulasi bibit kedalam media
6. Membiarkan kurang lebih 2 bulan pada rak yang ditempatkan ditempat yang lembab dan suhu sekitar 15-25°C
7. Menyobek plastik bila misellium sudah memenuhi media agar lebih banyak masuk

8. Mengamati apa yang terjadi selama kurang lebih 6 bulan

### E. HASIL PENGAMATAN



Gambar Dokumentasi selama praktek budidaya jamur Tiram di Tadris Biologi Fakultas Tarbiyah IAIN Walisongo Semarang 2011

## Persiapan tempat untuk kumbung jamur



## Pencampuran bahan no. 1,2,dan 3 Pembuatan Baglog



## Baglog siap tanam Alat-alat inokulasi



**Proses sterilisasi Proses inkubasi**



**Baglog dengan Misellium 10 %**



**Jamur tiram putih (Pemanenan dan penanganan pasca panen)**

**Hasil panen budi daya jamur**

No	Panen	Tanggal	Hasil panen
1	I	18 April 2011	3 Ons
2	II	19 April 2011	10 Ons
3	III	19 April 2011	4 Ons
4	IV	19 April 2011	5 Ons
5	V	26 April 2011	4 Ons
6	VI	26 April 2011	7 Ons
7	VII	1 Mei 2011	1 Ons
		Jumlah	34 Ons atau 3,4 Kg

## F. PEMBAHASAN

Klasifikasi jamur tiram putih

(*Pleurotus ostreatus*)

Kingdom : Fungi

Devisio : Basidiomycetes

Class : Homobasidiomycetes

Ordo : Agaricales

Family : Tricholometaceae

Genus : *Pleurotus*

Species : *Pleurotus ostreatus*

Jamur tiram banyak terdapat pada batang kayu yang masih hidup atau sudah mati. Jamur ini hidup baik pada substrat yang banyak mengandung lignin dan selulosa. Jamur tiram atau jamur tiram putih adalah jamur pangan dengan tudung berbentuk setengah lingkaran mirip cangkang tiram dengan bagian tengah agak cekung dan berwarna putih hingga krem.

Beberapa varietas ada yang berwarna hitam dan merah. Tubuh buah memiliki batang yang berada di pinggir dan bentuknya seperti tiram, sehingga jamur tiram mempunyai nama binomial *Pleurotus ostreatus*. Tubuh buah mempunyai tudung yang berubah dari hitam, abu-abu, cokelat, hingga putih dengan permukaan yang hampir licin dengan diameter 5-20 cm. tepi tudung mulus sedikit berlekuk. Miselium berwarna putih dan dapat tumbuh dengan cepat. Di alam bebas, jamur tiram bisa dijumpai hampir sepanjang tahun di hutan

pegunungan dan daerah yang sejuk. Tubuh buah terlihat saling bertumpuk di permukaan batang pohon yang sudah melapuk atau pokok batang pohon yang sudah ditebang.

Pembudidayaan jamur tiram biasanya dilakukan dengan media tanam serbuk gergaji. Selain sebagai campuran pada berbagai jenis masakan, jamur tiram merupakan bahan baku obat statin. Jamur tiram diketahui membunuh dan mencerna nematoda yang kemungkinan besar dilakukan untuk memperoleh nitrogen.

Pada budidaya jamur tiram suhu udara memegang peranan yang penting untuk mendapatkan pertumbuhan badan buah yang optimal. Pada umumnya suhu yang optimal untuk pertumbuhan jamur tiram, dibedakan dalam dua fase yaitu fase inkubasi yang memerlukan suhu udara berkisar antara 22 - 28°C dengan kelembaban 60 - 70 % dan fase pembentukan tubuh buah memerlukan suhu udara antara 16 - 22°C.

Tingkat keasaman media juga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan jamur tiram. Apabila pH terlalu rendah atau terlalu tinggi maka pertumbuhan jamur akan terhambat, bahkan mungkin akan tumbuh jamur lain yang akan mengganggu pertumbuhan jamur tiram itu sendiri. Keasaman pH media perlu diatur antara

pH 6 - 7 dengan menggunakan kapur (Calsium carbonat).

Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) merupakan bahan makanan bernutrisi dengan kandungan protein tinggi, kaya vitamin dan mineral, rendah karbohidrat, lemak dan kalori. Jamur ini memiliki kandungan nutrisi seperti vitamin, fosfor, besi, kalsium, karbohidrat, dan protein. Untuk kandungan proteinnya, lumayan cukup tinggi, yaitu sekitar 10,5-30,4%. Komposisi dan kandungan nutrisi setiap 100 gram jamur tiram adalah 367 kalori, 10,5-30,4 persen protein, 56,6 persen karbohidrat, 1,7-2,2 persen lemak, 0.20 mg thiamin, 4.7-4.9 mg riboflavin, 77,2 mg niacin, dan 314.0 mg kalsium. Kalori yang dikandung jamur ini adalah 100 kj/100 gram dengan 72 persen lemak tak jenuh. Serat jamur sangat baik untuk pencernaan. Kandungan seratnya mencapai 7,4- 24,6 persen sehingga cocok untuk para pelaku diet.

Jamur tiram ini memiliki manfaat kesehatan diantaranya, dapat mengurangi kolesterol dan jantung lemah serta beberapa penyakit lainnya. Jamur ini juga dipercaya mempunyai khasiat obat untuk berbagai penyakit seperti penyakit lever, diabetes, anemia. Selain itu jamur tiram juga dapat bermanfaat sebagai antiviral dan antikanker serta menurunkan kadar kolesterol. Di samping itu, jamur tiram juga dipercaya mampu membantu penurunan berat badan karena berserat

tinggi dan membantu pencernaan. Jamur tiram ini mengandung senyawa pleuran yang berkhasiat sebagai antitumor, menurunkan kolesterol, serta bertindak sebagai antioksidan.

Dalam proses pembudidayaan, syarat tumbuh jamur tiram yang baik antara lain:

a. Air

Kandungan air dalam substrat berkisar antara 60-65%. Apabila kondisi kering maka pertumbuhan jamur akan terganggu atau terhenti, begitu pula sebaliknya apabila kadar air terlalu tinggi maka miselium akan membusuk dan mati.

b. Suhu

Suhu inkubasi atau saat jamur tiram membentuk miselium dipertahankan antara 60-70%. Suhu pada pembentukan tubuh buah berkisar antara 16-22° C.

c. Kelembaban

Kelembaban udara selama masa pertumbuhan miselium 60-70%. Kelembaban udara Pada pertumbuhan badan buah 80-90%.

d. Cahaya

Pertumbuhan jamur tiram sangat peka terhadap cahaya secara langsung. Cahaya tidak langsung (cahaya pantul biasa  $\pm$  50-15000 lux) bermanfaat dalam perangsangan awal terbentuknya tubuh buah. Intensitas cahaya yang dibutuhkan untuk pertumbuhan jamur sekitar 200 lux (10%). Sedangkan pada

pertumbuhan miselium tidak diperlukan cahaya.

e. Aerasi

Dua komponen penting dalam udara yang berpengaruh pada pertumbuhan jamur yaitu Oksigen ( $O_2$ ) dan Karbon Dioksida ( $CO_2$ ). Oksigen merupakan unsure penting dalam respirasi sel. Sumber energi dalam sel dioksidasi menjadi karbondioksida. Konsentrasi Karbon Dioksida ( $CO_2$ ) yang terlalu banyak dalam kumbung menyebabkan pertumbuhan jamur tidak normal. Didalam kumbung jamur konsentrasi  $CO_2$  tidak boleh lebih dari 0,02%.

f. Tingkat Keasaman (pH)

Tingkat keasaman media tanam mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan jamur tiram putih. Pada pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan mempengaruhi penyerapan air dan hara, bahkan kemungkinan akan tumbuh jamur yang lain yang akan mengganggu pertumbuhan jamur tiram itu sendiri. pH optimum pada media tanam berkisar 6-7.

## G. KESIMPULAN

Dari hasil pembahasan dapat disimpulkan bahwa Jamur tiram atau jamur tiram putih adalah jamur pangan dengan tudung berbentuk setengah lingkaran mirip cangkang

tiram dengan bagian tengah agak cekung dan berwarna putih hingga krem.

Pembudidayaan jamur tiram biasanya dilakukan dengan media tanam serbuk gergaji.

Suhu yang optimal untuk pertumbuhan jamur tiram, dibedakan dalam dua fase yaitu fase inkubasi yang memerlukan suhu udara berkisar antara 22 - 28 °C dengan kelembaban 60 - 70 % dan fase pembentukan tubuh buah memerlukan suhu udara antara 16 - 22 °C. Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) merupakan bahan makanan bernutrisi dengan kandungan protein tinggi, kaya vitamin dan mineral, rendah karbohidrat, lemak dan kalori. Jamur tiram ini memiliki manfaat kesehatan diantaranya, dapat mengurangi kolesterol dan jantung lemah serta beberapa penyakit lainnya. Jamur ini juga dipercaya mempunyai khasiat obat untuk berbagai penyakit seperti penyakit lever, diabetes, anemia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Sudjadi, Bagod. *Biologi 1*. Jakarta: Yudistira. 2007.
- Winarsih, Sri. *Ensiklopedia Dunia Fungi*. Semarang: PT Bengawan Ilmu. 2008.
- <http://bisnisukm.com/usaha-jamur-tiram-yang-makin-menjamur.html>
- [http://id.wikipedia.org/wiki/Jamur\\_tiram](http://id.wikipedia.org/wiki/Jamur_tiram)

## GLOSARI

<i>BA</i>	=	<i>Bensil Aminopurin</i>
<i>GA</i>	=	<i>GIBRELIN ACID</i>
<i>IAA</i>	=	<i>Indole acetic acid</i>
<i>IBA</i>	=	<i>Indole butyric acid</i>
<i>NAA</i>	=	<i>1-naphtalene acetic acid</i>
<i>IECA</i>	=	<i>diethylthiocarbamate</i>
<i>PVP</i>	=	<i>polyvinylpyrolidone</i>
<i>PLB</i>	=	<i>protocorm like bodies</i> <i>/protokormus</i>
<i>(2,4 D)</i>	=	<i>acetic acid 2,4 diclorophenoxy</i>
<i>WPM</i>	=	<i>Woody Plant Medium</i>

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Qur'an dan Terjemahannya*, Departemen Agama Republik Indonesia, Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo, 1994
- Agus GRK. *Anggrek (Bunga Dengan Aneka Pesona Bentuk Warna)*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 2001.
- Amin, Moh, Sukarno, *Buku Paket Biologi 3*, Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, 1995
- Arifin, Zaenal, *Dasar Pengetahuan Ilmu Tanaman*, Bandung: Angkasa 1987
- Buckle, *Ilmu Pangan*, UI Press, Jakarta: 1987
- Constabel,dkk. *Metode Kultur Jaringan Tanman edisi kedua*. Bandung: ITB Press.1991
- Dais, Ir.Dkk,*Teknik Kultur Jaringan*,Yogyakarta: Kanisius, 1994
- Edhi Sandra. 2001. *Kultur Jaringan Anggrek Skala Rumah Tangga*. Agromedia Pustaka. Jakarta.*Jurnal AgroBiogen* 2(2):74-80 *Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

Ganadi, Prawirosudirjo, *Kamus Istilah Anatomi dan Zoologi*, Jakarta: Bharata, 1969.

George E Fand Sherrington P D, 1984. *Plan Propagation by Tissue Culture*. England Exegetis Limited.

Gunawan, L.W., 1990, *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Laboratorium Kultur Jaringan*, Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi. IPB, Bogor.

Harjanto, Hari. *Memperbanyak Tanaman Hias Favorit*. Penebar Swadaya.

Iryanto, Koes. 2006. *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme*. Bandung : Yrama Widya.

[http://id.wikipedia.org/wiki/Kultur\\_jaringan](http://id.wikipedia.org/wiki/Kultur_jaringan)

[http://jogjacreative.files.wordpress.com/2009/03/img\\_](http://jogjacreative.files.wordpress.com/2009/03/img_)

<http://www.pustaka-deptan.go.id/publikasi/bt091042.pdf>

<http://www.smallcrab.com/others/474-mengenal-kultur-jaringan>

[http://iwansain.wordpress.com/kultur\\_jaringan](http://iwansain.wordpress.com/kultur_jaringan)

<http://www.smallcrab.com/others/474-mengenal-kultur-jaringan>

[http:// www.kultur-jaringan.blogspot.com](http://www.kultur-jaringan.blogspot.com) (di akses pada 20 Maret 2010)

[http:// www.eshaflorea.com](http://www.eshaflorea.com) (di akses pada 20 Maret 2010)

[http:// www.gemination.com](http://www.gemination.com) (di akses pada 20 Maret 2010)

<http://ekmon-saurus.blogspot.com/2008/11/bab-3-sterilisasi.html>

[http://WordPress.com/ zyanti's Blog.html/](http://WordPress.com/zyanti's_Blog.html) *pencoklatan pada apel* (diakses 25 April 2010)

<http://kultur-jaringan.co.cc/kultur-jaringan-tanaman-dan-cara-pemilihan-eksplan/>

[http://www.situshijau.co.id/tulisan.php?act=detail&id=113&id\\_kolom=13](http://www.situshijau.co.id/tulisan.php?act=detail&id=113&id_kolom=13)

<http://harnawatiaj.wordpress.com/2008/03/18/sterilisasi/>

<http://infokuljar.blogspot.com/2010/08/sterilisasi-eksplan-bahan-tanam-kultur.ht>

<http://www.ubb.ac.id> Email : [info@ubb.ac.id](mailto:info@ubb.ac.id). Gambar apel-dikupas berwarna coklat (diakses 26 april 2010)

<http://noviarahma.blogspot.com/2010/11/apa-itu-fusi-protoplas.html>

<http://abangtamiang.blogspot.com/2010/08/perbanyak-mikropropagasi-wortel.html>

<http://mediakulturjaringan.blogspot.com/2010/08/macam-macam-formulasi-media-kultur.html>

<http://www.google.co.id/imglanding?q=media+kultur+padat&hl=id&sa=G&gbv=2&tbs=isch:1&tbnid=56gf5NgASGtpJM:&imgrefurl=http://denikrisna.wordpress.com/category/bakul/mikrobiologi-farmasi/&imgurl=http://ssmmid.org/files/2010/04/nutrient-agar.jpg&ei=rTiQTdyHCJCKuAP-zqC6DQ&zoom=1&w=640&h=480&biw=1152&bih=700>

<http://www.resep.us/pembuatan-media-kultur-jaringan-anggrek-dari-air-kelapa/>

<http://hamdan-motor.blogspot.com/2008/07/kultur-jaringan.html>

<http://blogs.unpad.ac.id/nurajengfitrihandayani/files/2010/06/images>

[GH3.jpghttp://beemaardany.files.wordpress.com/2010/05/hasil-kultur2.jpg](http://beemaardany.files.wordpress.com/2010/05/hasil-kultur2.jpg)

Katuuk, J. R. P., 1989, *Teknik Kultur Jaringan Dalam Mikropropagasi Tanaman*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Perguruan Tinggi, Proyek Pengembangan Lembaga Pendidikan Tenaga Kependidikan, Jakarta,.

- Lianah, 2008. *Modul bioteknologi*, Laboratorium Biologi Fakultas Tarbiyah IAIN Walisongo. Semarang.
- .PAU Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. 1988
- Raharjo, moese, Prof. Ir, *Pemuliaan Tanaman Secara Invitro*, Yogyakarta: Kanisius, 1996
- Sarwono. *Mengenal Dan Membuat Anggrek Hibrida*. Agromedia Pustaka, Jakarta. 2002
- Sumardi, I., 1989. *Kultur Jaringan Tumbuhan* . Yogyakarta. UGM
- Susilo Deni, Efek Pengolahan Terhadap Zat Gizi Pangan, Jakarta: CV. Puspita Husada, 2008.
- Soeryoan winoto, M., 1985. *Budidaya Jaringan Dan Manfaatnya*. Yogyakarta. UGM.-----  
-, 1990. *Pemuliaan Tanaman Secara in Vitro*. Yogyakarta. UGM.
- , 1991. *Budidaya Jaringan Tumbuhan*. Yogyakarta. UGM.
- Santoso, U dan Nursadi, F 2004. *Kultur Jaringan Tanaman* Malang. UMM Press
- Samsur, Istamar. *Biologi SMA Kelas XII*. Jakarta : Erlangga. 2007

- Sriyanti, D.P. dan A.Wijayani, 1994, *Teknik Kultur Jaringan*, Yayasan Kansius. Yogyakarta, 18, 54, 57, 63, 67, 69, 82-83.
- Purnamaningsih, R. *Seleksi in vitro tanaman padi untuk ketahanan terhadap aluminium*. Thesis S2. Institut Pertanian Bogor. 2003
- Yuwono Tribowo, *Bioteknologi Pertanian*, Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 2006.
- Wattimena, G.A. *Bioteknologi Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. 1992
- Wetter, L. R. Ph. D, F Constabel, Ph. D, *Metode Kultur Jaringan Tanaman*, Bandung: ITB, 1991