

PEMBIAKAN TANAMAN HUTAN SECARA VEGETATIF (TEKNIK KULTUR JARINGAN)

Hanna Artuti



Pendahuluan

Perbanyakan vegetatif

- Perbanyakan tanaman secara vegetatif merupakan perbanyakan tanaman menggunakan bagian tanaman **selain** biji
- Perbanyakan vegetatif dapat dilakukan secara konvensional (setek, cangkok, okulasi, sambung) dan non konvensional (kultur jaringan/*tissue culture*).

Tergantung :

1. Spesies/jenis tanaman
2. Tujuan perbanyakan
3. Teknik yang dikuasai
4. Biaya yang tersedia

Kelebihan memperbanyak vegetatif:

- Tanaman hasil memperbanyak secara vegetatif mempunyai sifat-sifat yang sama dengan induknya (secara genetis).
- Masa generatif (berbunga dan berbuah) dicapai dalam waktu yang lebih cepat daripada tanaman yang diperbanyak secara generatif.
- Dapat menghasilkan bibit dalam jumlah yang besar yang mempunyai sifat seragam dalam waktu relatif singkat dari bagian tanaman yang sangat kecil sekalipun
- Tidak dibatasi oleh tempat, waktu, dan musim
- Dapat memperbanyak tanaman yang sulit diperbanyak secara generatif
- Tingkat propagasi jauh lebih tinggi
- Dapat menghasilkan tanaman bebas virus

Kelemahan perbanyak vegetatif:

- Memerlukan ketrampilan khusus, ketelitian, dan ketekunan yang tinggi
- Tingkat keberhasilan relatif lebih rendah daripada perbanyak tanaman secara generatif
- Memerlukan alat dan bahan yang lebih mahal
- Perlu metode yang spesifik untuk masing-masing jenis tanaman dan tehnik yang digunakan

Kultur jaringan tanaman

Kultur jaringan atau kultur *in vitro/tissue culture* merupakan suatu teknik untuk mengisolasi sel, protoplasma, jaringan, dan organ dan menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman pada kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman sempurna kembali (*planlet*).



Prinsip dan dasar kultur jaringan

- **Prinsip utama** : perbanyak tanaman menggunakan bagian jaringan tanaman (jaringan akar, tunas, pollen dsb.) menjadi tanaman utuh (sempurna) pada kondisi *in vitro* (di dalam gelas), menggunakan media buatan yang dilakukan dalam kondisi steril.
- Dasar yang digunakan adalah **Teori Sel**.
- Sel merupakan satuan dasar minimum suatu jasad hidup yang mampu melakukan perbanyakan sendiri (*self duplication*).
- Semua jasad (organisme) hidup terdiri dari sel yang memiliki nukleus (inti) yang terbungkus membran atau struktur serupa tapi tanpa membran.
- Sel-lah yang menentukan struktur maupun fungsi semua jasad hidup, baik tingkat rendah maupun tinggi. Sel hanya terjadi dari pembelahan sel yang ada sebelumnya, dan masing-masing sel mempunyai sistem kehidupan sendiri.

Prinsip dan dasar kultur jaringan

- Sel dari suatu organisme multiseluler di manapun letaknya, sebenarnya sama dengan sel zigot karena berasal dari satu sel tersebut.
- Setiap sel berasal dari satu sel... *Omni cellula cellula*
- Sel mengalami proses pertumbuhan dan perkembangan (pembelahan dan pembesaran, serta diferensiasi) juga dediferensiasi.
- Teori **Totipotensi Sel** (*Total Genetic Potential* atau kemampuan totipotensi), yaitu kemampuan sel untuk melakukan seluruh proses hidup setelah diisolasi dari bagian induknya sehingga dapat beregenerasi kembali pada lingkungan yang sesuai → menjadi tanaman lengkap kembali.
- Kemampuan “**Autonom**” yaitu dapat mengatur metabolisme rumah tangganya sendiri setelah terpisah dari induknya.

Ilmu yang mendasari kultur jaringan

1. Botani embriologi & anatomi tumbuhan)
2. Penyakit tumbuhan
3. Fisiologi tumbuhan
4. Biologi sel tumbuhan
5. Genetika tumbuhan

Istilah-istilah dalam kultur jaringan

- Bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan untuk inisiasi suatu kultur disebut **eksplan**.
- Pemindahan kultur ke media lain baik media yang sama ataupun yang lain disebut **subkultur**.
- Setiap masa inkubasi disebut **passage**. Passage pertama adalah subkultur pertama dari jaringan yang terbentuk dari eksplan awal.
- Bahan yang diambil pada setiap subkultur disebut sebagai **inokulum**. Eksplan harus diusahakan supaya dalam keadaan aseptik melalui prosedur sterilisasi dengan berbagai bahan kimia. Dari eksplan yang aseptik kemudian diperoleh kultur yang asenik yaitu kultur dengan hanya satu macam organisme yang diinginkan.
- Eksplan yang ditanam pada media tumbuh yang tepat dapat beregenerasi melalui proses yang disebut organogenesis dan embriogenesis

Istilah-istilah dalam kultur jaringan

- Organogenesis artinya proses terbentuknya organ-organ seperti pucuk dan akar. Pucuk yang terbentuk pada tempat yang bukan berasal dari jaringan asal yang biasa, disebut **pucuk adventif**. Contohnya, pucuk yang terbentuk dari kalus, pucuk yang terbentuk dari hipokotil, dari kotiledon atau akar.
- Embriogenesis adalah proses terbentuknya embrio somatic. **Embrio somatic** adalah embrio yang bukan berasal dari zigot, tetapi dari sel biasa dari tubuh tanaman. Bila embrio terbentuk langsung dari anther atau mikrospora, prosesnya disebut **androgenesis**. Proses pembentukan embrio dari ovarium yang belum mengalami fertilisasi, disebut **gynogenesis**.

Istilah-istilah dalam kultur jaringan

- Tanaman lengkap hasil regenerasi dalam kultur jaringan disebut **plantlet**. Plantlet sebelum dipindah ke lapangan dan diperlakukan sebagai bibit harus mengalami masa adaptasi dari kultur heterotropik menjadi autotropik. Masa adaptasi plantlet disebut **aklimatisasi**.
- Pucuk-pucuk yang terbentuk dari jaringan kalus terutama yang sudah mengalami subkultur dapat bervariasi. Variasi ini disebut **variasi somaklonal**. Penyebabnya belum diketahui secara pasti, ada kemungkinan variasi ini sudah ada dalam eksplan asal karena kromosom mosaik dalam sel-sel somatic; atau terjadi akibat lingkungan dalam kultur. Salah satu variasi yang terjadi adalah **aneuploid: jumlah kromosom $2n-1$ atau $2n+1$** .



REGENERATION OF COMPLETE PLANT

Keuntungan Kultur Jaringan

1. Sarana memperbanyak tanaman yang mempunyai presentase perkecambahan biji rendah.
2. Sebagai cara untuk menghilangkan virus dari suatu tanaman, sehingga generasi berikutnya terbebas dari virus tersebut.
3. Sebagai cara yang sangat efektif dan cepat untuk memperbanyak klon sesuai dengan sifat genetik induknya.
4. Sebagai cara yang tepat untuk program konvensi tanaman langka.
5. Memerlukan ukuran induk yang lebih kecil, dan ukuran tempat yang relatif irit dibanding pembiakan vegetatif konvensional.
6. Sebagai cara untuk eksploitasi teknologi dari metode vegetatif lain yang konvensional.

Keunggulan bibit hasil kultur jaringan

1. identik dengan induknya,
2. massal & hemat tempat ,
3. waktu yang relatif singkat,
4. lebih seragam,
5. mutu bibit lebih terjamin
6. kecepatan tumbuh bibit lebih cepat

Hambatan kultur jaringan

1. Membutuhkan biaya yang besar untuk awalnya dan juga untuk pelaksanaannya.
2. Membutuhkan tenaga yang terlatih, teliti dan disiplin.
3. Masih banyak ketidakberhasilan penerapan dengan cara ini pada banyak spesies karena belum diketahuinya media yang tepat, tingkat hormon yang tepat, cara multiplikasi dan perakaran yang tepat.
4. Masih banyak terjadi kesulitan dalam pemindahan dari penanaman mikro ke penanaman konvensional di lapangan.

Tujuan dan Manfaat Kultur Jaringan



Tujuan dan manfaat kultur jaringan

1. Pengadaan bibit.
2. Menyediakan bibit bebas virus/penyakit.
3. Membantu program pemuliaan tanaman.
4. Membantu proses konservasi & preservasi plasma nutfah termasuk *embryo rescue*.
5. Produksi senyawa kimia untuk farmasi, industri makanan & kosmetik.

1. *Pengadaan bibit*

- Penyediaan bibit yang berkualitas baik merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan dalam pengembangan kehutanan di masa mendatang.
- Pengadaan bibit pada suatu tanaman yang akan dieksploitasi secara besar-besaran dalam waktu yang cepat akan sulit dicapai dengan perbanyakan melalui teknik konvensional.
- Membantu memperbanyak tanaman (menyediakan bibit), khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangbiakkan secara generatif

2. Menyediakan bibit bebas virus/ penyakit

- Banyak virus yang tak menampakkan gejalanya, namun bersifat laten, dan akan dapat mengurangi vigor, kualitas dan kuantitas produksi. Virus dalam tanaman induk merupakan masalah untuk memperbanyak vegetatif tanaman hortikultura secara konvensional.
- Morrel & Martin (1952) menemukan bahwa pada daerah meristem apikal, ternyata kandungan virusnya paling rendah bahkan tidak ada. Hal ini mungkin karena virus bergerak melalui sistem pembuluh, sedang daerah tersebut belum ada sistem pembuluhnya.
- Selain itu aktivitas metabolisme tinggi pada daerah tersebut tidak mendukung replikasi virus, juga konsentrasi auksin yang tinggi menghambat multiplikasi.

3. Membantu program pemuliaan tanaman

Dengan kultur jaringan dapat membantu program pemuliaan tanaman untuk menghasilkan tanaman yang lebih baik melalui:

- Keragaman somaklonal,
- Kultur haploid,
- Seleksi *in vitro*,
- Fusi protoplasma,
- Transformasi gen/rekayasa genetika tanaman,
- *Embryo rescue*

3. Membantu program pemuliaan tanaman

Keragaman somaklonal

- Melalui kombinasi berbagai cara pengkulturan, hormon/zat pengatur tumbuh dan lamanya periode pengkulturan, memungkinkan adanya perubahan dan keragaman pada bentuk morfologis dan genetik atau abnormalitas (baik yang permanen maupun non permanen), yang disebut **keragaman somaklonal**.
- Keragaman somaklonal melalui kultur jaringan umumnya terjadi pada **kultur kalus akibat pengaruh media kultur**; dengan adanya keragaman somaklonal, bisa mendapatkan dan memperbanyak tanaman dengan **tingkat ploidi yang berbeda dalam waktu yang relatif singkat**.

3. Membantu program pemuliaan tanaman

Kultur haploid

- Sebagai contoh, kultur haploid dengan mengkulturkan pollen (jumlah kromosomnya setengah sel somatik), kultur triploid dengan mengkulturkan jaringan endosperm.
- Kultur jaringan juga dapat menyediakan protoplasma sel somatik dan sel generatif (misalnya polen) untuk bahan **transfer gen dalam pembentukan sel transgenik.**

3. Membantu program pemuliaan tanaman

Seleksi in vitro

- Dilakukan untuk menyeleksi tanaman yang tahan kondisi cekaman/stres, dengan keuntungan,
- Dapat digunakan untuk uji stres biotik maupun abiotik
- Menghemat lahan percobaan
- Dapat memberi tekanan seleksi yang seragam (untuk mengurangi kehilangan/*escape*)
- Dapat untuk populasi tingkat sel dalam jumlah jutaan
- Menghemat waktu dan biaya

3. Membantu program pemuliaan tanaman

Fusi protoplasma

- Kultur jaringan bisa ditujukan untuk mendapatkan hibrida baru, baik yang inter-spesifik maupun yang intra-spesifik, dengan **fusi protoplasma**, sehingga mendapatkan **hibridisasi somatik**.
- Dengan cara ini dapat mengatasi masalah inkompatibilitas.

3. Membantu program pemuliaan tanaman

Embryo rescue

- Pemuliaan tanaman terjadi melalui hibridisasi dan seleksi. Dengan menyilangkan tanaman, pemulia berusaha untuk menggabungkan karakter terbaik dari 2 tanaman yang berbeda.
- Melalui seleksi, pemulia mencoba untuk menyeleksi anakan yang memiliki kombinasi kualitas yang optimal dari kedua tanaman induk. Proses ini tentu saja sangat tergantung pada produksi benih viabel. Jika benih viabel tidak terbentuk, tidak akan ada keturunan yang akan diseleksi. Tidak ada anakan tidak berarti fertilisasi tidak terjadi setelah polinasi.
- Kemungkinan terjadi keguguran embryo pada fase dini perkembangan biji, akibat penyebab yang tidak diketahui. Dengan teknik kultur jaringan, embrio yang belum matang ini dapat diselamatkan (SBW International, 2008)
- Kultur jaringan untuk mengamankan hibrida unik yang secara konvensional sulit didapat - misalnya apabila beberapa hari setelah polinasi, embrionya gugur - dengan cara mengkulturkan jaringan embrio tersebut untuk mendapatkan tanaman yang lengkap/sepurna.

3. Membantu program pemuliaan tanaman

Embryo rescue

- Teknik penyelamatan embrio (*embryo rescue*) mulai dikembangkan tahun 1900-an yang memungkinkan benih yang belum matang atau embrio diselamatkan untuk membentuk tanaman baru.
- Ini biasanya dilakukan untuk benih – benih yang memiliki masa dormansi yang panjang. Belakangan ini juga berkembang teknik penyelamatan bakal biji yang telah terserbuki tapi tidak pernah menghasilkan benih viable.
- Penyelamatan embryo banyak dilakukan untuk memperoleh hibrida interspesifik dan intergenerik. Misalnya pada kentang dan berbagai tanaman hias.

4. *Membantu proses konservasi dan preservasi plasma nutfah*

- Konservasi dan preservasi *in vivo* dalam bentuk penyimpanan biji dan tanaman hidup (Kebun Raya).
- Penyimpanan secara kultur jaringan dapat dilakukan dengan menggunakan teknik pertumbuhan minimal (*minimal growth*) dan **kriopreservasi**.
- Untuk biji ortodoks dalam ruang dengan temperatur dan kelembapan yang terkendali. Masalahnya pada biji rekalsitran (apalagi yang ukuran bijinya besar); perlu secara kultur jaringan, yaitu sel-sel kompeten (mampu beregenerasi) disimpan dalam temperatur rendah dan dibekukan dalam nitrogen cair (**Kriopreservasi**).

5. Memproduksi senyawa kimia untuk farmasi, industri makan dan industri kosmetik

- Sel-sel tanaman yang dapat memproduksi senyawa tertentu, ditumbuhkan dalam bioreaktor besar. Misalnya untuk produksi senyawa antibiotik dari suatu jenis fungi.
- Senyawa hasil tersebut bisa didapatkan dari hasil sintesis lengkap; juga dapat merupakan hasil transformasi oleh enzim dalam sel tanaman. Misalnya pewarna merah untuk lipstik dari tanaman, yang disebut dengan biolips (prod. kosmetik kanebo)

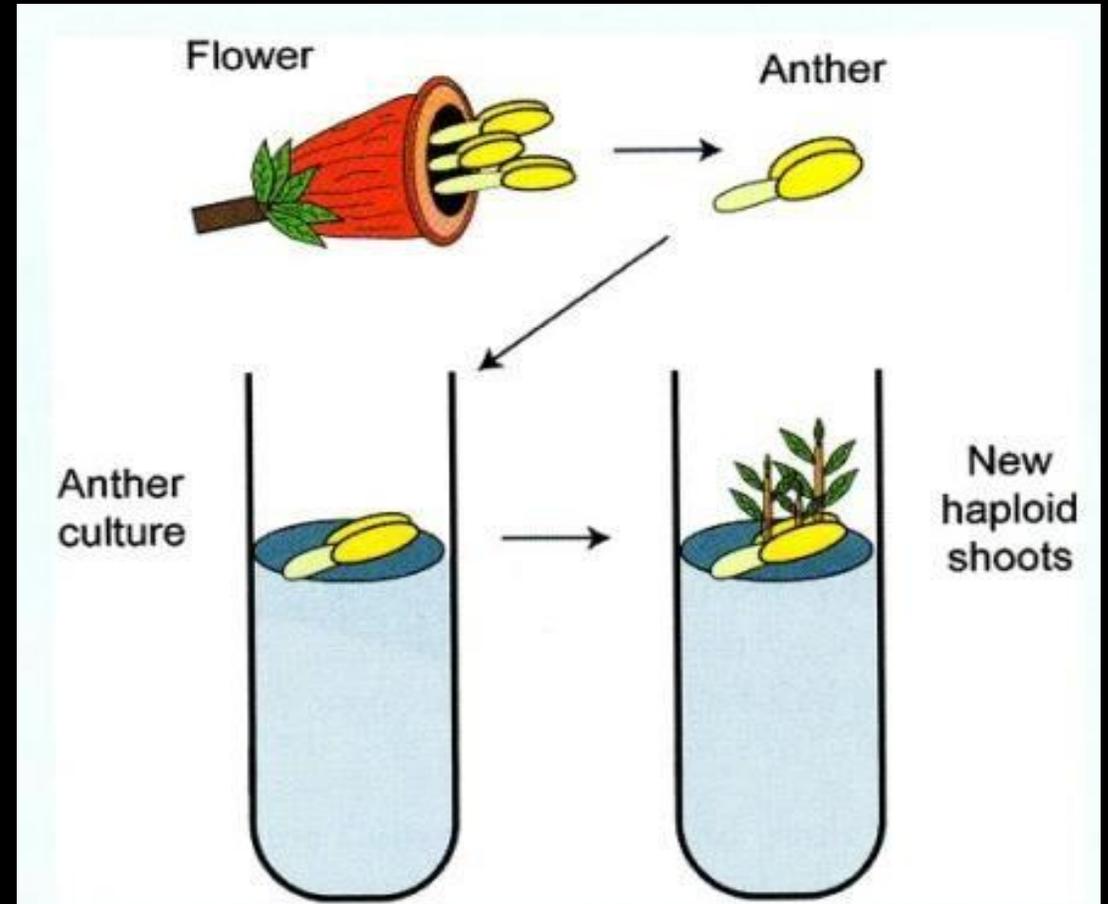
Apa yang dilakukan oleh tanaman pada KJT?

- Sel-sel tanaman – Dediferensiasi
- Pembelahan sel tanaman – Sel-sel tanaman adalah diploid
- Mitosis – kromosom menduplikasikan diri dan membentuk klon
- Meiosis – Proses pembentukan sel sex, $2n$ memisahkan diri dan menjadi gamet $1n$

Tahapan Teknik Kultur Jaringan

Kultur *in vitro* pada tanaman tingkat tinggi

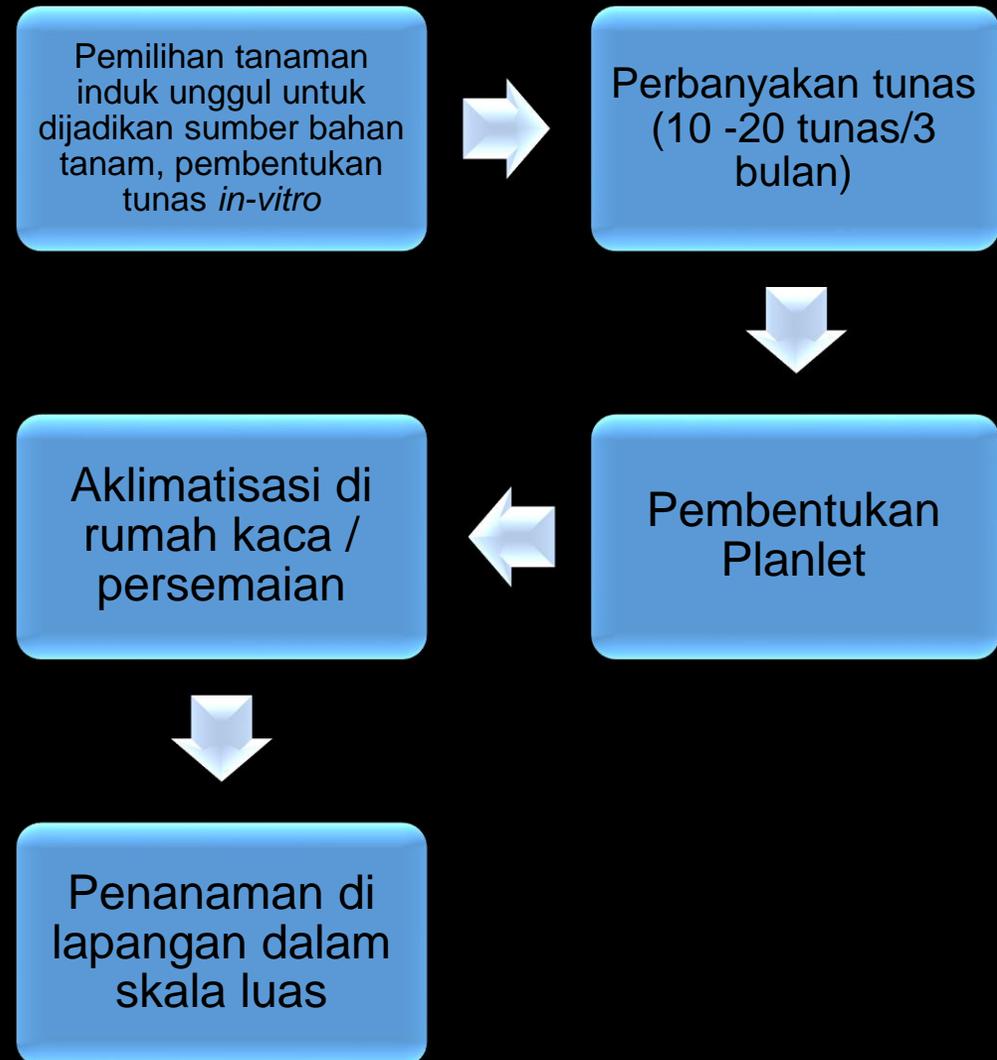
1. Kultur meristem
2. Kultur embrio
3. Kultur biji anggrek
4. Kultur ujung tunas, eksplan, kalus, kultur sel tunggal
5. Kultur protoplas
6. Kultur anther
7. Kultur endosperm



Kultur anther

Tahapan pelaksanaan kultur jaringan

1. Teknik aseptik (sterilisasi ruangan dan alat)
2. Pembuatan media
3. Persiapan eksplan
4. Inisiasi / Induksi
5. Multiplikasi / Perbanyakkan
6. Subkultur (sesuai tujuan)
7. Perakaran/*rooting*
8. Aklimatisasi / adaptasi (media agar → tanah)



1. Teknik aseptik (sterilisasi)

- Keberhasilan teknik perbanyakan tanaman secara kultur jaringan dapat dipengaruhi oleh kebersihan atau kesterilan baik ruangan, peralatan, bahan tanam dan media bahkan pekerja atau laboran bisa menjadi sumber kontaminan.

- Tujuan sterilisasi untuk memperkecil atau mengatasi terjadinya kontaminasi dan kegagalan.
- Macam sterilisasi:
 - ✓ Sterilisasi ruangan
 - ✓ Sterilisasi alat dan media
 - ✓ Sterilisasi bahan tanaman

Sterilisasi ruangan

- Ruangan disterilisasi menggunakan larutan alkohol atau bahan desinfektan
- Sterilisasi dilakukan dengan cara penyemprotan ke seluruh bagian/sudut ruangan dan diamkan selama beberapa hari
- Uji kesterilan ruangan dengan uji aseptisitas

Sterilisasi alat dan media

- Peralatan dan media tanam disteril menggunakan *autoclave*, dengan tekanan 15 PSI dan suhu 121°C.



autoclave

Sterilisasi alat

- Selaian lingkungan kerja, kontaminasi dapat berasal dari peralatan kerja yang digunakan. Oleh karena itu, peralatan kerja harus bersih dan steril, terutama peralatan yang digunakan dalam proses penanaman.
- Peralatan yang harus bersih dan steril adalah:
 - ✓ *Laminar Air Flow Cabinet (LAFC)*
 - ✓ Alat-alat diseksi (gunting, pinset dan lain-lain)
 - ✓ Alat-alat gelas (*petridish*, botol kultur dan lain-lain)

Sterilisasi media tanam

- Media tidak boleh terkontaminasi oleh jamur dan bakteri
- Sterilisasi yang biasa dilakukan menggunakan uap panas dengan suhu tinggi 121⁰C dengan alat autoklave.
- Sterilisasi media tidak boleh terlalu lama karena dapat mengakibatkan degradasi vitamin dan asam amino, terurainya gula, dan perubahan pH.
- Media tanam yang baru dibuat harus segera disterilisasi bila tidak harus disimpan terlebih dahulu dalam lemari es paling lama 1-2 hari.

Sterilisasi bahan tanaman



Bahan Tanam
Angrek

- Sebatas sterilisasi permukaan atau desinfestasi (menghilangkan infestasi kontaminan). Bukan disinfeksi (menghilangkan infeksi kontaminan dalam eksplan).
- Membersihkan debu, cendawan dan bakteri atau kontaminan dari bagian permukaan eksplan.



Bahan kimia yang digunakan dalam sterilisasi

- Alkohol dengan konsentrasi 70-80%
- Ca-hipoklorit (35-100 g/L) atau Na-hipoklorit (0,5-2%)
- Sumber NaOCl yang biasa digunakan adalah pemutih pakaian (10-40%).
- Untuk meningkatkan efektivitas sterilisasi gunakan Tween-20, Tween-80 atau deterjen air yang lunak sebagai agen pembasah.

Prosedur sterilisasi bahan tanaman

- Eksplan dicuci dibawah air kran yang mengalir dengan diberi sedikit deterjen.
- Eksplan dipotong-potong menjadi bagian yang kecil, sekitar 0,5-2cm.
- Cuci potongan eksplan dengan air kran, untuk mencegah pencoklatan dipermukaan, eksplan dapat direndam dalam larutan asam sitrat 50 mL/L dan asam askorbat sebagai anti oksidan 150 mg
- Khusus untuk tanaman berkayu, eksplan biasanya dicelupkan kedalam alkohol 70% selama beberapa detik. Tujuannya untuk menghilangkan gelembung udara disamping untuk mematikan sebagian kontaminan dipermukaan.

Eksplan terkontaminasi
apabila tidak steril

Terkontaminasi oleh
bakteri



Terkontaminasi oleh jamur

2. Pembuatan media

- Komposisi media tanam kultur jaringan terdiri dari sejumlah unsur yang umumnya terdapat di dalam tanah.
- Komponen media kultur dapat dikelompokkan kedalam: unsur makro, unsur mikro, vitamin, zat pengatur tumbuh, asam amino, air, gula, bahan pemadat media (agar), dan kadang-kadang arang aktif untuk menyerap racun dari jaringan tanaman dan merangsang pertumbuhan akar.
- Selain itu dapat pula digunakan zat-zat organik lain seperti: air kelapa, ekstrak ragi, pisang, tomat, kentang dan lain-lain.

2. Pembuatan media

- Dasar pemilihan medium: jenis tanaman, selera, tujuan, perhitungan masing-masing peneliti.
- Umumnya *trial and error*
- Penggunaan substansi organik ini jangan terlalu tinggi karena dapat merugikan pertumbuhan sel. Harus dilakukan pengujian pendahuluan
- Substansi organik kompleks ini mempunyai kelemahan yaitu tidak konsisten kadarnya dan tidak diketahui pasti komposisinya

2. *Pembuatan media*

Metode Kultur Jaringan Berdasarkan Macam Media Tanam
(*H & W, 2002*)

- Metode padat (*solid method*)
- Metode semi padat (*semi solid method*)
- Metode cair (*liquid method*)
 - *) Suspensi sel → Protocorm
 - *) Kultur kalus

2. *Pembuatan media*

Komponen Media Kultur Jaringan:

1. Unsur makro

- Unsur makro diperlukan tanaman dalam jumlah sangat besar.
- Terdiri dari: Nitrogen (N), Fosfor (P), Kalium (K), kalsium (Ca), Magnesium (Mg) dan sulfur (S).

2. Unsur mikro

- Unsur mikro diperlukan tanaman dalam jumlah sangat kecil.
- Terdiri dari: Boron (B), Cobalt (Co), Tembaga (Cu), Yodium (I), Besi (Fe), Mangan (Mn), Molibdenum (Mo) dan seng (Zn).

2. *Pembuatan media*

Komponen Media Kultur Jaringan: (lanjutan)

3. Gula

- Berperan sebagai sumber energi, diberikan dalam bentuk sukrosa.

4. Vitamin

- Hanya vitamin B1 (tiamin) yang menunjukkan esensial bagi banyak spesies tanaman.
- Pada beberapa formulasi media yang terkenal juga memasukan niasin dan piridoksin (B6).
- Myo-inositol berkarakter seperti vitamin. Myo-inositol penting untuk membantu diferensiasi dan pertumbuhan.

2. Pembuatan media

Komponen Media Kultur Jaringan: (lanjutan)

5. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

- Dalam kultur jaringan, dua golongan zat pengatur tumbuh yang sangat penting adalah sitokinin dan auksin.
- Zat pengatur tumbuh mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan dan organ.
- Interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen, menentukan arah perkembangan suatu kultur.
- Penambahan auksin atau sitokinin eksogen, mengubah level zat pengatur tumbuh endogen sel.



2. Pembuatan media

- AUKSIN

1. Merangsang pertumbuhan kalus
2. Merangsang pembesaran sel dan pertumbuhan akar
3. Mengatur morphogenensis
 - IAA, NAA, IBA, PCPA, NOA, Dicamba, 2,4D

- SITOKININ

1. Mengatur pertumbuhan melalui pembelahan sel
2. Mengawasi perkecambahan biji
3. Mengatur transport auksin
 - zeatin, 2-iP, Kinetin,
 - Benzyl Amino Purin (BAP)

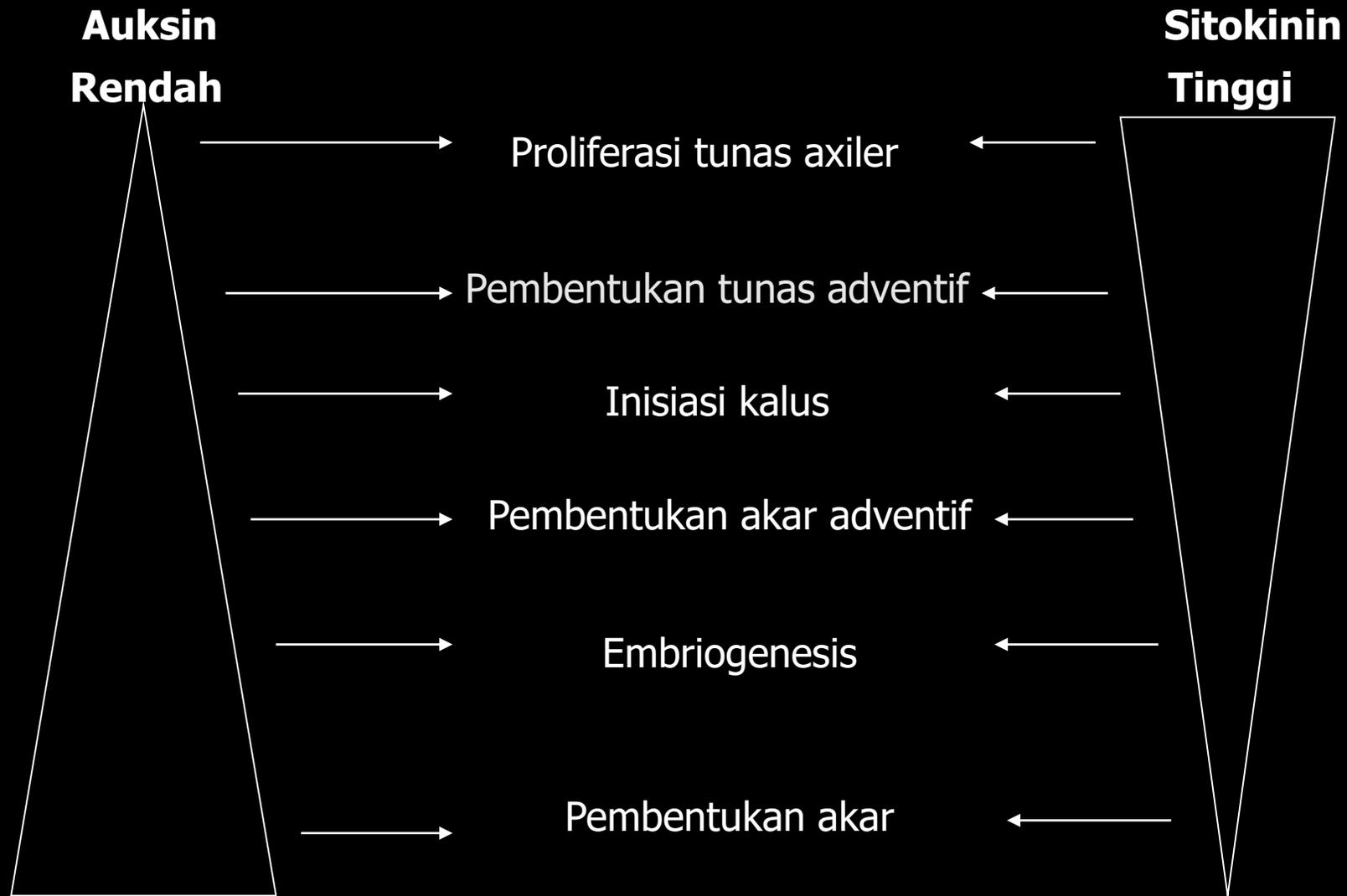
2. Pembuatan media

- Auksin yang sering digunakan adalah 2,4-D, IAA, NAA, dan IBA
- 2,4-D paling efektif utk menginduksi pembelahan sel dan pembentukan kalus
- NAA dan 2,4-D lebih stabil dibandingkan IAA, yaitu tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yg dikeluarkan oleh sel atau karena pemanasan pada saat proses sterilisasi
- IAA mudah rusak oleh cahaya dan oksidasi ensimatik.

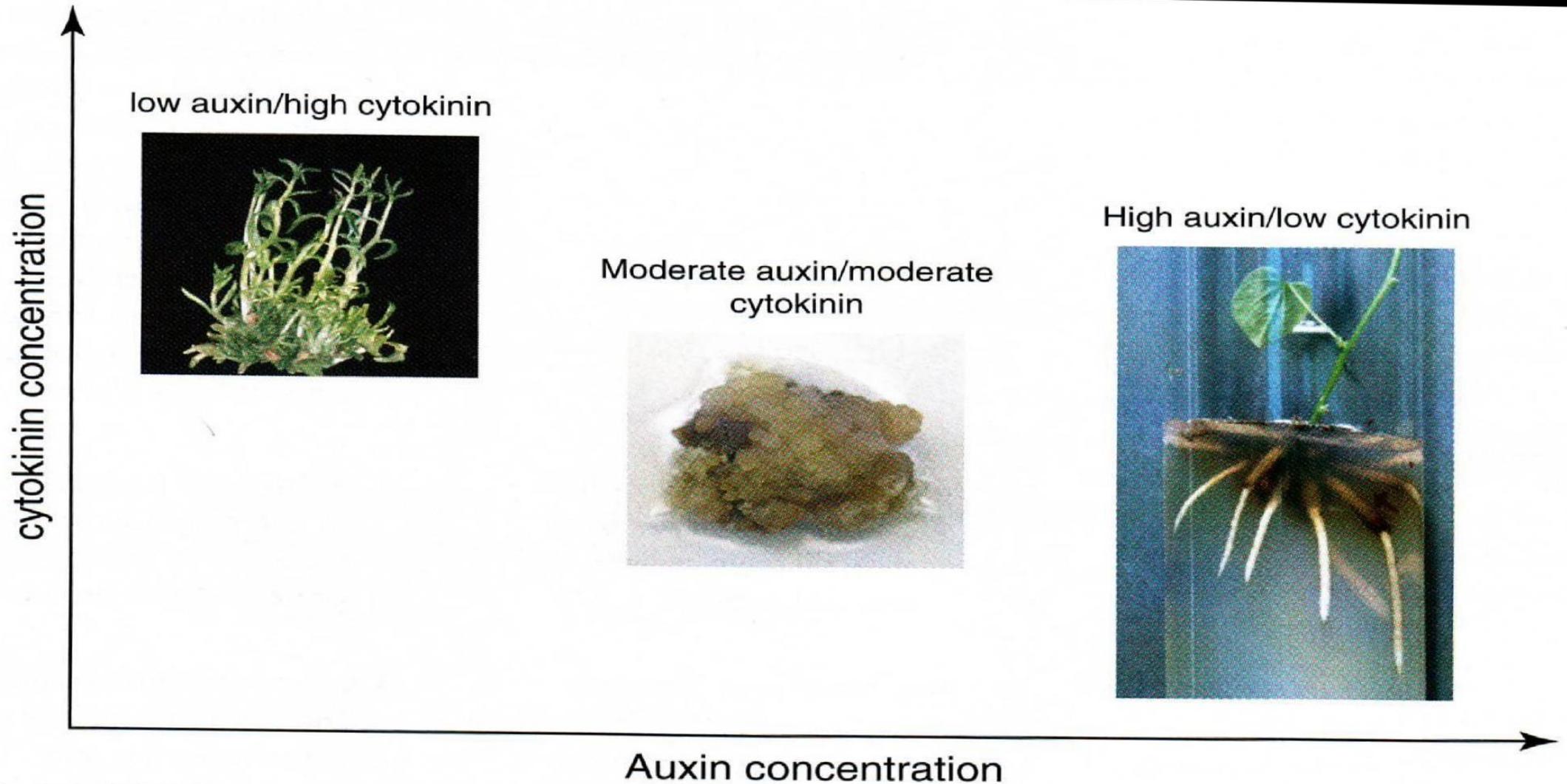
2. Pembuatan media

- Sitokinin: berperan dlm pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis. Sitokinin yang banyak dipakai adalah kinetin dan benzylaminopurin (BAP)
- Kinetin dan auksin memberikan pengaruh interaksi terhadap diferensiasi jaringan.
- Giberelin: berperan dalam pembesaran dan pembelahan sel, juga pada pembentukan akar. Penggunaan giberellin dpt meningkatkan jumlah auksin endogen
- Giberelin dalam bentuk larutan mudah rusak dan kehilangan sifatnya sebagai ZPT pada perlakuan temperatur tinggi.

Pengaruh konsentrasi auksin dan sitokinin pada pertumbuhan eksplan



Pengaruh konsentrasi auksin dan sitokinin pada pertumbuhan eksplan



Pengaruh konsentrasi auksin dan sitokinin pada pertumbuhan eksplan

Sitokinin pada media menyebabkan pertumbuhan tunas (kiri, $5\mu\text{M}$ BA), tetapi pada konsentrasi yang berlebihan (kanan, $20\mu\text{M}$ BA) dapat menghambat pertumbuhan memanjang.



2. Pembuatan media

pH media

- pH tertentu diperlukan untuk pertumbuhan jaringan tanaman agar tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH sitoplasma
- pH medium kultur jaringan biasanya berkisar antara 4,8 – 5,6 dan perlu dipertahankan tidak berubah selama medium digunakan
- Pengaturan pH bisa dilakukan menggunakan: NaOH atau KOH atau HCl pada waktu semua komponen sudah dicampur
- Penggunaan Fe, KH_2PO_4 atau K_2HPO_4 dapat mempertahankan pH medium stabil.

2. Pembuatan media

Bahan pematat

- Bahan pematat yang sering digunakan adalah agar-agar 7 – 10 g/L. Bahan pematat lain (jarang digunakan) adlh *gelrite* yang lebih bening dibandingkan agar-agar. Penggunaannya lebih sedikit yaitu 2 g/L.
- Kelemahan penggunaan bahan pematat :
 - ✓ hanya sebagian eksplant yg kontak dg medium
 - ✓ terjadi gradient nutrisi yg tdk sama
 - ✓ mobilitas zat hara menjadi kurang baik dan sering terjadi akumulasi zat-zat toksik yg dikeluarkan oleh eksplant

2. Pembuatan media

Beberapa macam medium dasar:

1. MS (Murashige dan Skoog): utk hampir semua tnm terutama herba.
2. B5 atau Gamborg: utk kultur suspensi sel kedele, alfafa, dan legume.
3. White: mengandung garam mineral dgn konsentrasi rendah. Untuk kultur akar.
4. Vacin dan Went (VW): utk kultur anggrek
5. Nitsch dan Nitsch: utk kultur tepung sari dan sel
6. Schenck dan Hildebrandt: utk kultur tanaman monokotil
7. *Woody Plant Medium* (WPM): utk kultur tanaman berkayu
8. N6: untuk tanaman serealia, terutama padi
9. NP (*New Phalaenopsis*): untuk kultur anggrek

Table 18-2

STOCK SOLUTIONS (GRAMS/LITER) USED IN PREPARING VARIOUS MEDIA FOR MICROPROPAGATION^a

Group	Compound	Murashige and Skoog (MS)	Woody plant medium (WPM)	Anderson (AND)	Gamborg B5
A	NH ₄ NO ₃	165.00	40.00	40.00	—
	KNO ₃	190.00	—	48.00	250.00
	Ca(NO ₃ 4H ₂ O)	—	38.60	—	—
B	K ₂ SO ₄	—	99.00	—	—
	MgSO ₄	18.10	18.10	18.10	12.2
	Mn SO ₄ • H ₂ O	1.69	2.23	1.69	1.00
	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0.86	0.86	0.86	0.20
	CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
	NH ₄ SO ₄	—	—	—	13.4
	CaCl ₂ • 2H ₂ O	44.00	9.6	44.00	15.00
C	KI	0.083	—	0.03	0.075
	CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0.0025	—	0.0025	0.0025
	KH ₂ PO ₄	17.00	17.00	—	—
D	H ₃ BO ₃	0.62	0.62	0.62	0.30
	Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	b	—	38.00	15.00
	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	2.78	2.78	5.57	2.78
E	Na ₂ • EDTA	3.73	3.73	7.45	3.73
	Thiamin • HCl	0.10	0.10	0.04	1.00
F	Nicotinic acid	0.05	0.05	—	0.10
	Pyridoxine • HCl	0.05	0.05	—	0.10
	Glycine	0.20	0.20	—	—
	Myo-inositol	10.00	10.00	10.00 ^c	10.00

^aThese are 100 × the final solution. Use 10 ml of each stock solution for preparing 1 liter of the culture medium.

^bCommonly added as a supplement directly to the culture medium at 85 to 255 mg/liter.

^cAdenine sulfate added, 80 mg/liter.

Terima Kasih