

KULTUR JARINGAN GAHARU

Dr. Joko Prayitno MSc.

Balai Teknologi Lingkungan
Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

KULTUR JARINGAN

Apa yang dimaksud dengan kultur jaringan?

- Teknik menumbuhkan bagian tanaman (jaringan atau organ) secara aseptik di dalam botol (*in vitro*) yang berisi nutrisi dan/atau hormon pertumbuhan.



<http://www.clonal-solutions.com.au>

KULTUR JARINGAN

Apa kegunaan kultur jaringan?

1. Untuk memperbanyak tanaman secara **cepat** dalam jumlah banyak dan **seragam**.

cepat

: jumlah meningkat 10x dalam 2 bulan

seragam

: berasal dari satu tanaman

- Sebagai alternatif memperbanyak cara konvensional (stek, biji)
- Sebagai upaya penyelamatan tanaman langka, seperti gaharu, cendana, dll.

2. untuk mendapatkan tanaman bebas penyakit. Contoh: tanaman kentang bebas virus.

KULTUR JARINGAN

Apa kegunaan kultur jaringan?

3. untuk menumbuhkan embryo tanaman yang tidak memiliki endosperm. Contoh: tanaman anggrek.
4. untuk regenerasi tanaman hasil rekayasa genetik.

KULTUR JARINGAN

Apa kerugian dari teknik ini?

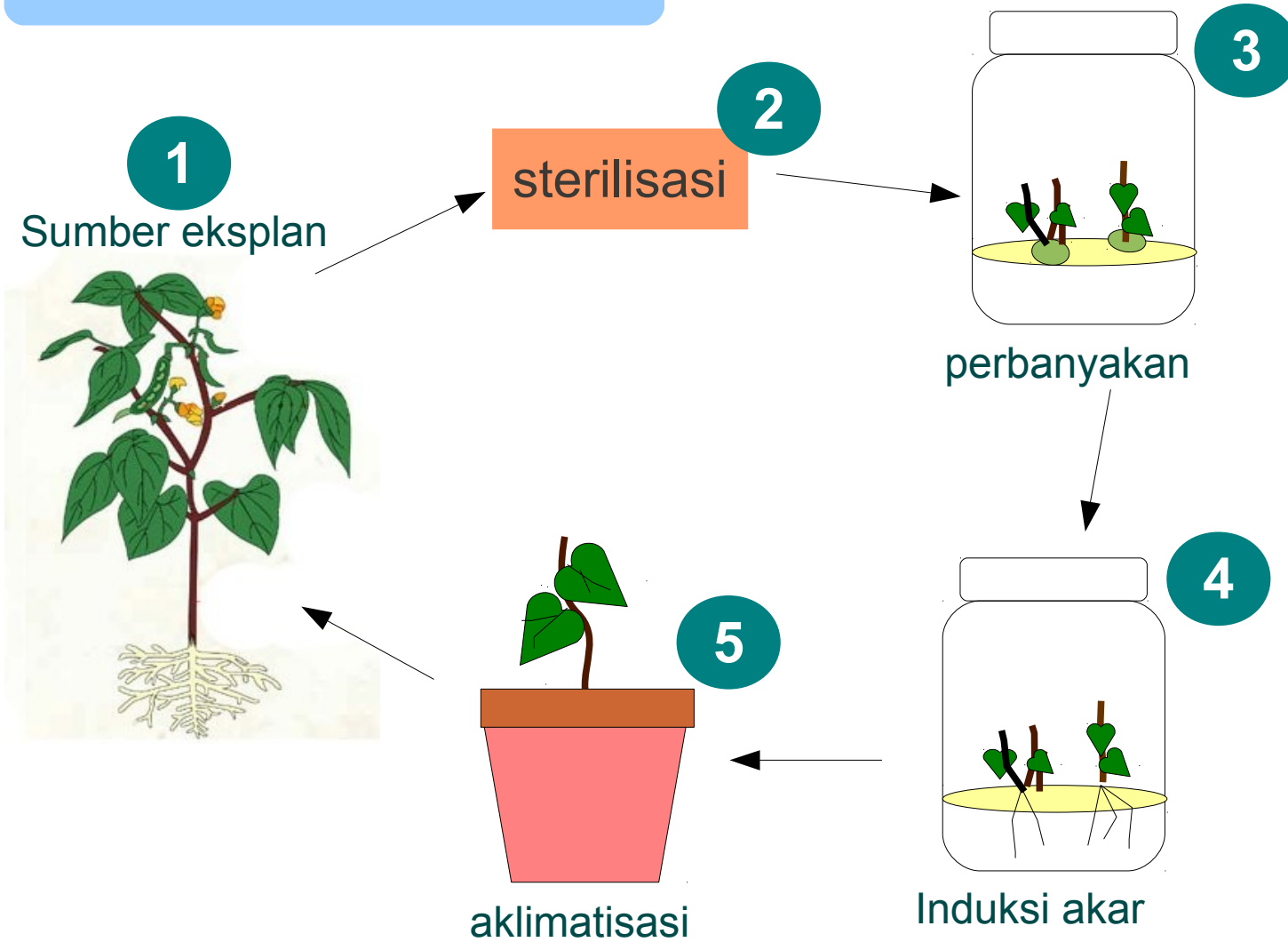
- Investasi yang lebih besar dibandingkan perbanyakan konvensional, terutama untuk membangun dan mengoperasikan lab.

TAPI...

Dapat dikompensasi dengan keuntungan yang lebih baik, terutama untuk tanaman yang mensyaratkan kualitas tinggi/baik, misal: kelapa sawit, kentang bebas virus, anggrek

KULTUR JARINGAN

Bagaimana tekniknya?



1. Sumber Eksplan

eksplan

Bagian tanaman yang digunakan sebagai sumber perbanyakan dalam kultur jaringan

Syarat:

- Mudah disterilisasi
- Dari jaringan muda, karena lebih mudah diregenerasi
- Responsif terhadap media pertumbuhan

Sumber eksplan:

- Tunas pucuk
- Tunas aksilar
- biji/embryo
- Hipokotil
- Kotiledon
- daun

Sumber Eksplan

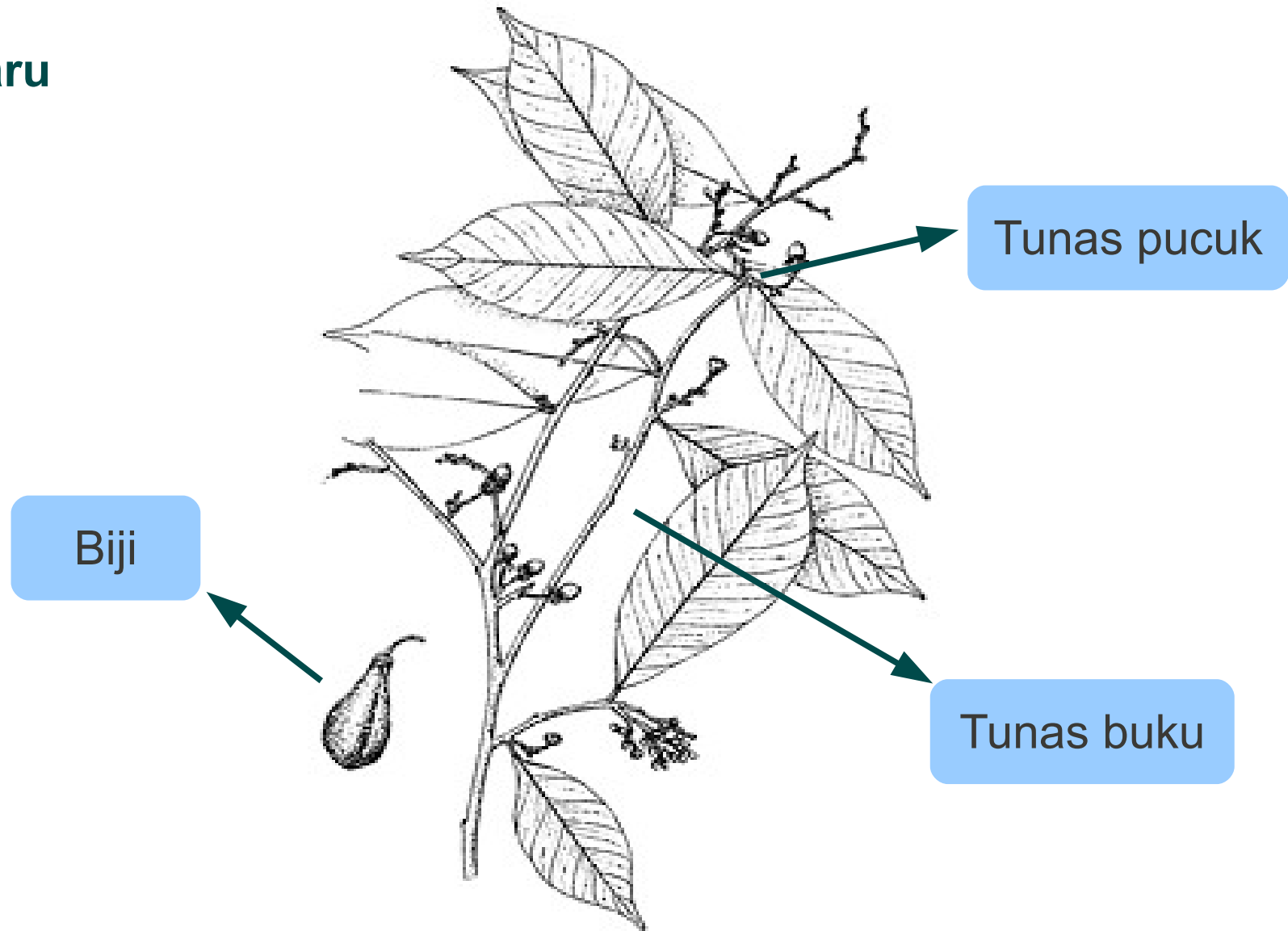
Hal-hal yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan

- Pemilihan eksplan
- Umur tanaman yang dijadikan sumber eksplan
- Kondisi fisiologi tanaman pada waktu pengambilan eksplan



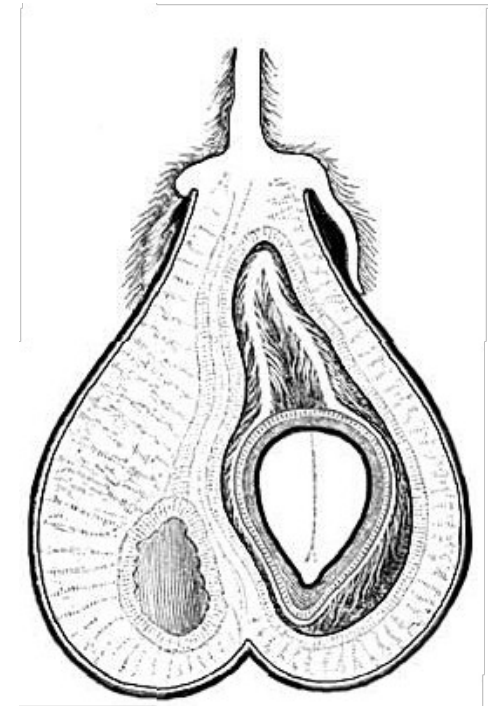
Sumber Eksplan

Gaharu



Sumber Eksplan

Biji



<http://herbnature.blogspot.com/2008/04/aquilaria-agarwood-karas-or-gaharu.html>

- Biji bersifat rekalsitran (cepat kehilangan daya tumbuh).
- Sebaiknya dipilih yang biji yang baru dipanen dari pohon.

Sumber Eksplan

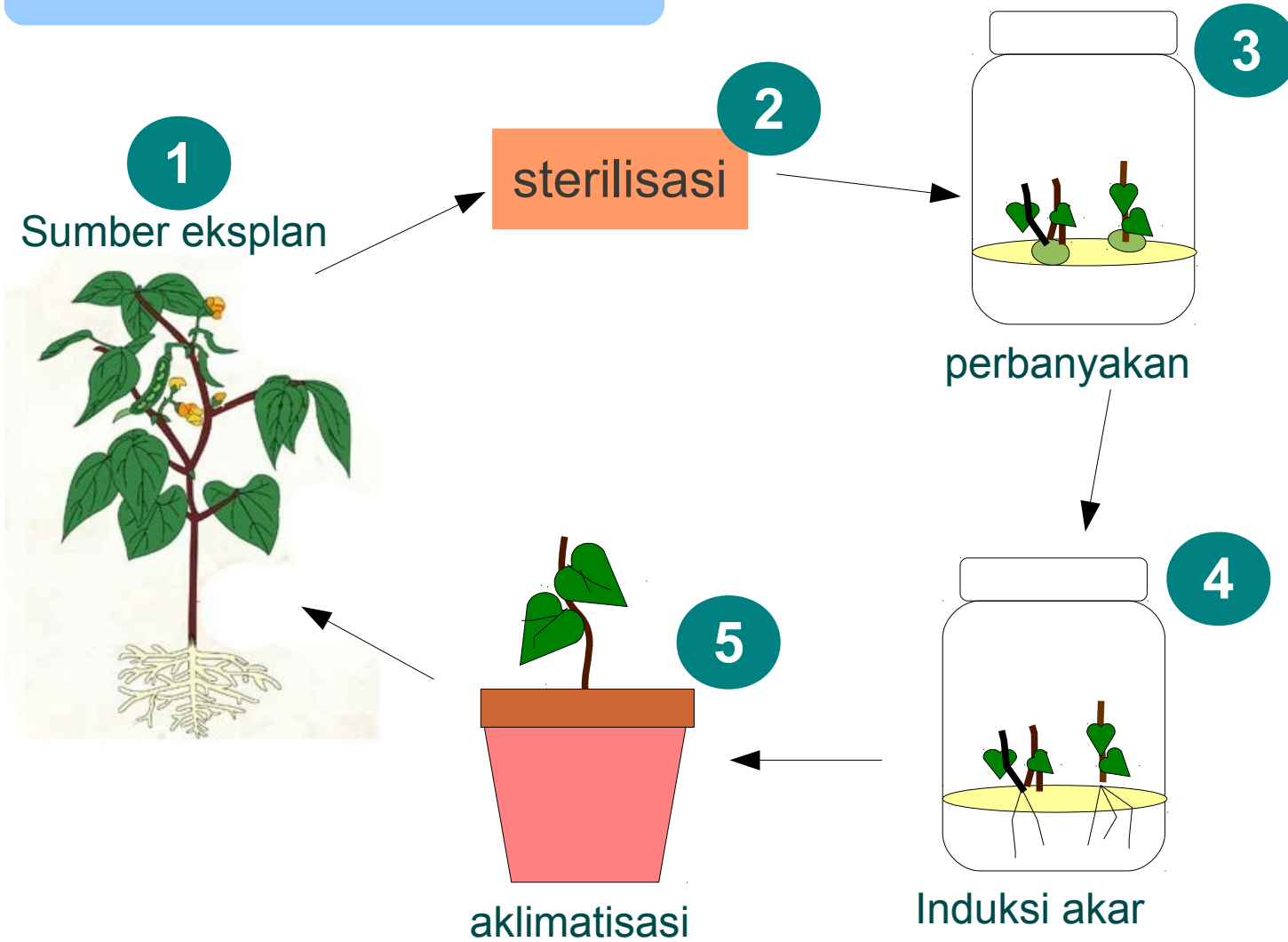
Tunas pucuk dan buku

- Tunas dari kecambah in vitro atau dari bibit di polybag.
- Tunas dari bibit sebaiknya diambil dari bibit di polibag yang memiliki tinggi sekitar 1 m, karena :
 1. Lebih mudah penanganan dan pemeliharaan
 2. Tunas dapat langsung dipotong dan disterilisasi
- Untuk mengurangi kontaminasi jamur waktu eksplan pertama kali dikulturkan, bibit di polibag disemprot dengan fungisida seminggu sebelum sterilisasi eksplan



KULTUR JARINGAN

Bagaimana tekniknya?



Sterilisasi Eksplan

- Media tumbuh selain dibutuhkan oleh tanaman, juga disukai oleh jamur dan bakteri.
- Bakteri dan jamur hidup di permukaan maupun di dalam tanaman (eksplan).



Eksplan perlu disterilisasi dan ditanam dalam kondisi aseptis

- Sterilisasi yang dilakukan adalah sterilisasi permukaan, yang hanya membunuh mikroba di permukaan eksplan.
- Bakteri dan jamur yang hidup di dalam jaringan tanaman (kalau ada) masih tetap hidup dan dapat berkembang biak sewaktu-waktu.
- Eksplan sebaiknya diambil dari tanaman yang sehat dan yang tumbuh di lingkungan relatif bersih.

Sterilisasi Eksplan

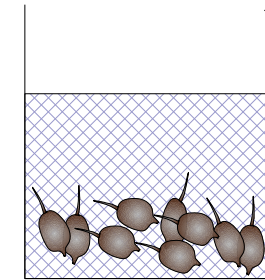
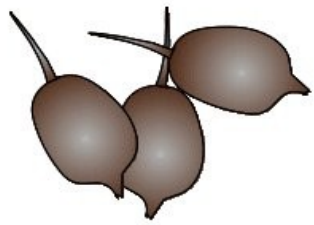
Sterilan

- Bahan aktif bersifat oksidator kuat (senyawa halogen, logam berat, asam). Yang banyak digunakan: Sodium hipoklorit (pemutih).
- Penggunaan logam berat seperti HgCl_2 sekarang tidak disarankan.
- Penggunaan antibiotik tidak terlalu efektif.

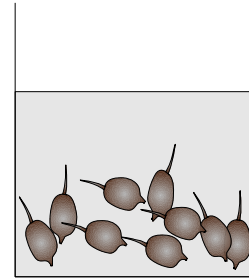
	<u>Conc</u>	<u>time</u>	<u>Action</u>
NaOCl	10-20% v/v	10-20 mins	oxidant / Halogen
CaOCl	10-20% v/v	10-20 mins	oxidant / Halogen
H_2O_2	1% v/v	10 mins	oxidant
HgCl_2	0.1% w/v	10-30 mins	Heavy metal
AgNO_3	1% w/v	10-30 mins	Heavy metal

Sterilisasi Eksplan

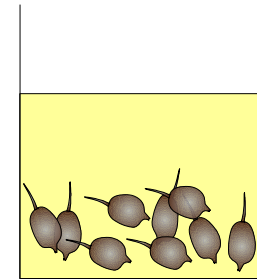
Biji



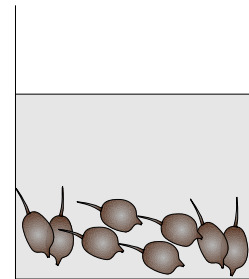
Cuci dengan
deterjen



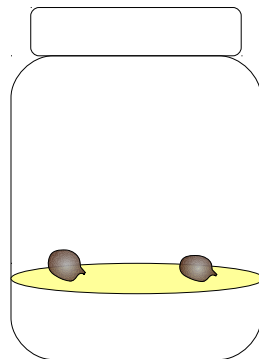
Bilas dengan
air



Na-hipoklorit
(pemutih),
20-30%,
20 menit

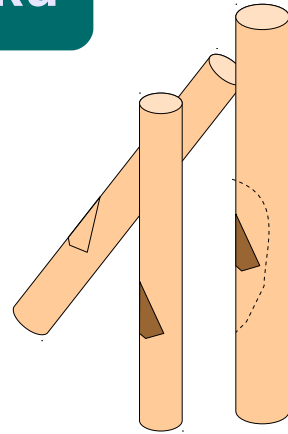


Bilas dengan
air steril 3x

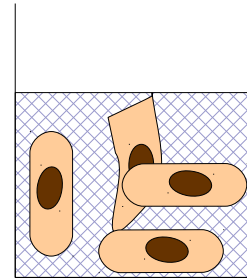


Sterilisasi Eksplan

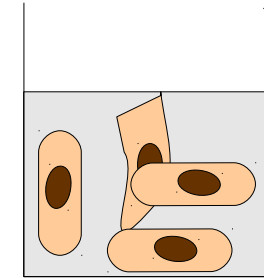
Tunas pucuk dan buku



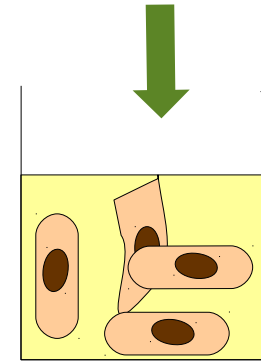
Potong menjadi ranting pendek



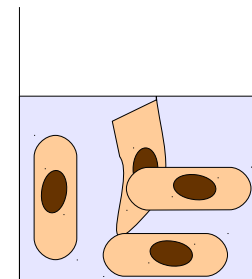
Rendam dalam fungisida 30 menit



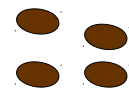
Bilas dengan air



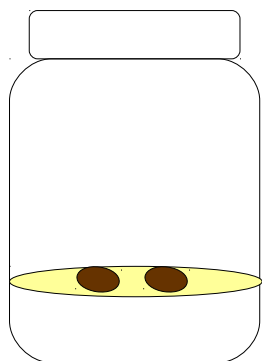
Na-hipoklorit (pemutih), 10-20%, 20 menit



Bilas dengan air steril 3x



Mata tunas



Kultur jaringan

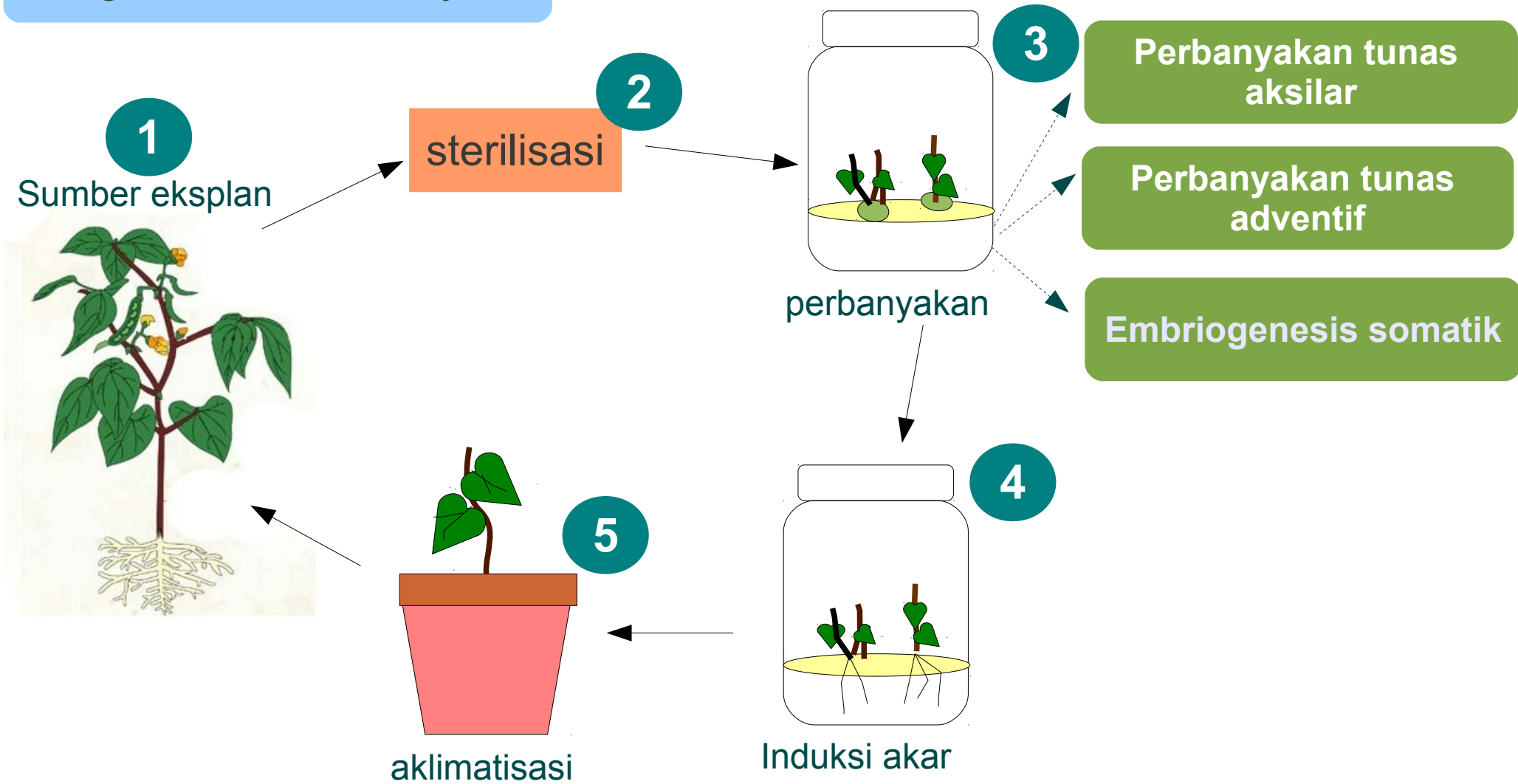
Sterilisasi Eksplan

Pencucian dengan deterjen

- Sebagian permukaan tanaman biasanya diselimuti oleh lapisan lilin ---> mengurangi kontak antara sterilan dengan tanaman
- Deterjen dapat menghilangkan lilin di permukaan tanaman dan juga sebagian mikroba yang melekat.
- Pengadukan disarankan agar kerja deterjen lebih efektif.

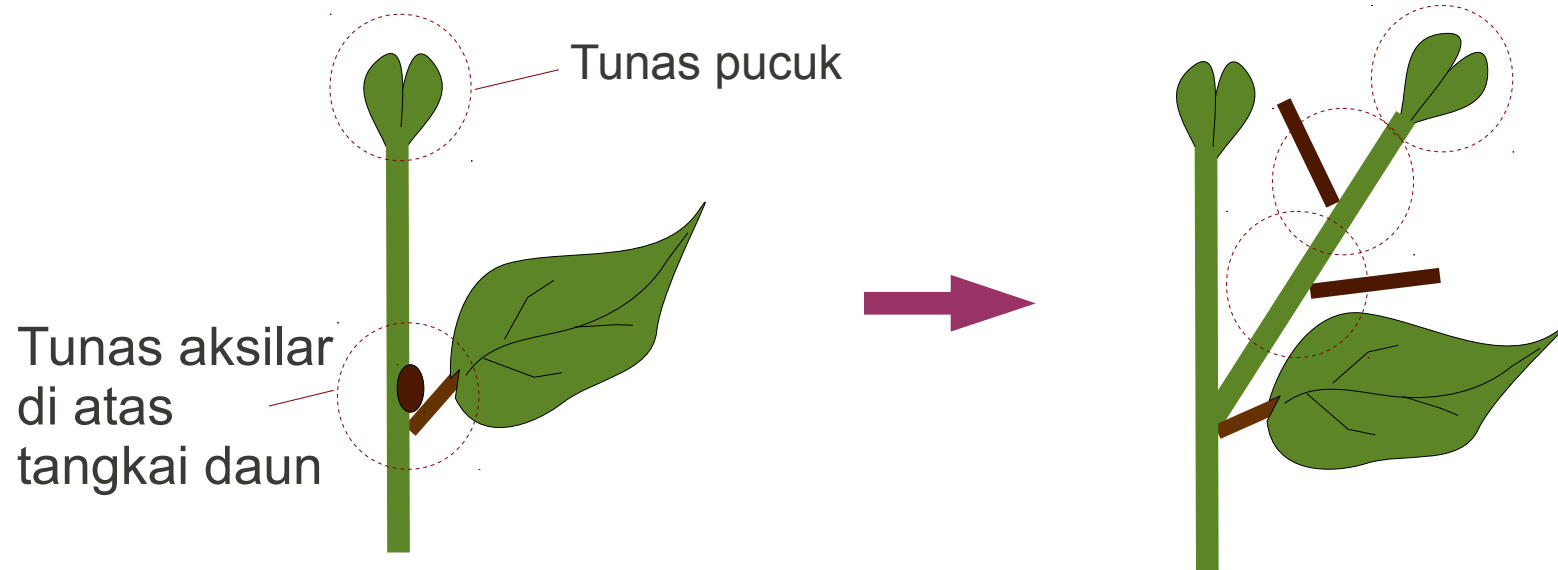
KULTUR JARINGAN

Bagaimana tekniknya?



KULTUR JARINGAN

Perbanyak tunas aksilar

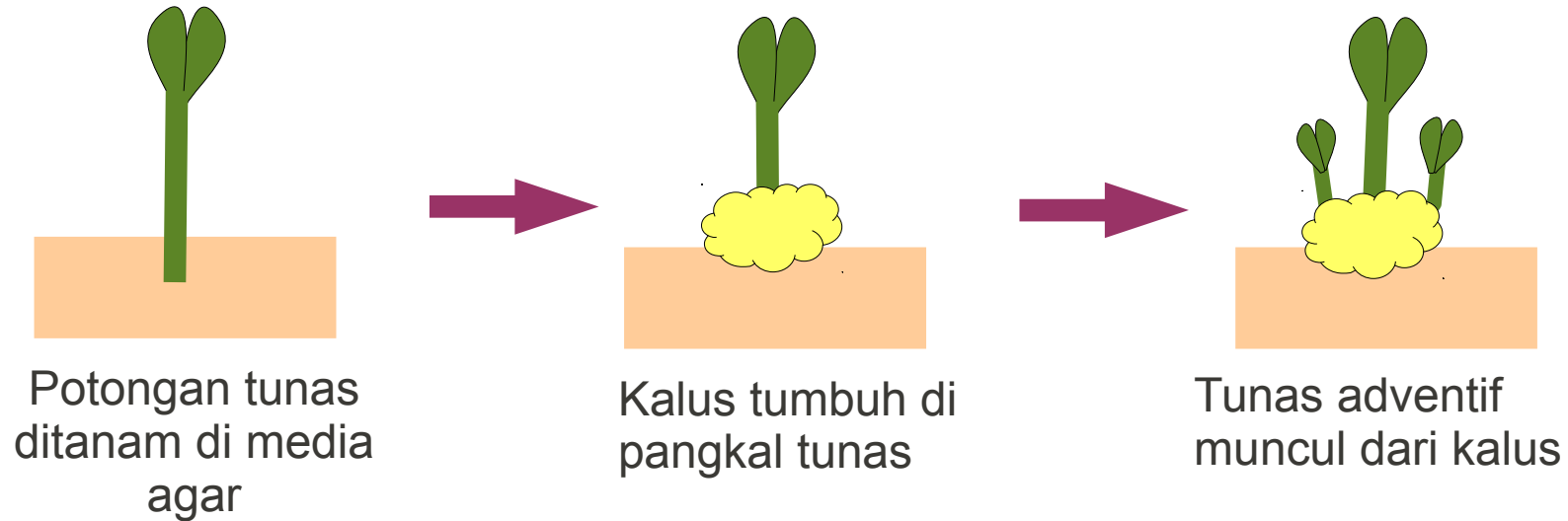


- >95% dari perbanyakan sistem kultur jaringan
- Sederhana dan praktis
- Secara genetik lebih stabil

KULTUR JARINGAN

Perbanyak tunas adventif

- Efisien, tapi secara genetik kurang stabil



- Tunas adventif = tunas yang muncul dari sel selain sel meristem tunas.
- Dalam kultur jaringan sering muncul sekumpulan massa sel akibat induksi dari fitohormon. Massa sel tersebut disebut **kalus**.

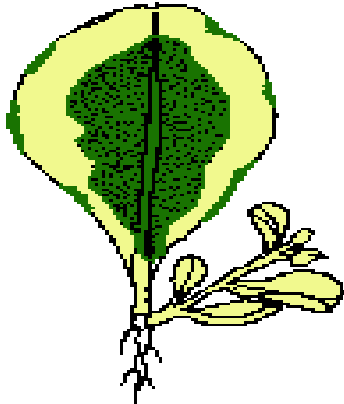


kalus

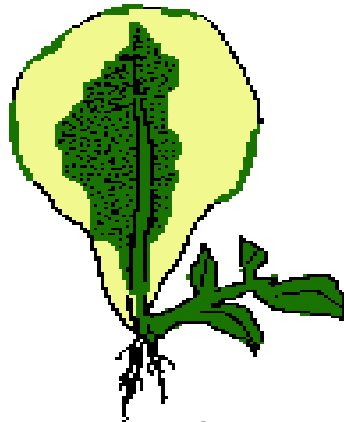
KULTUR JARINGAN

Pembentukan tunas adventif pada tanaman kimera

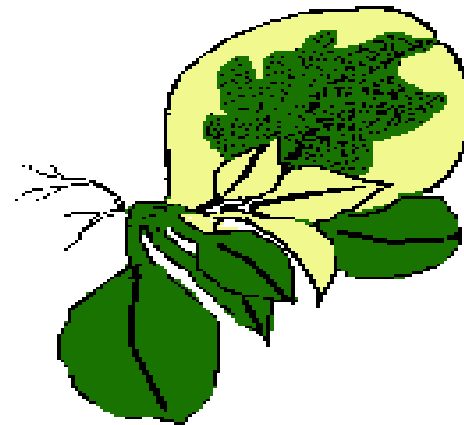
Daun utuh



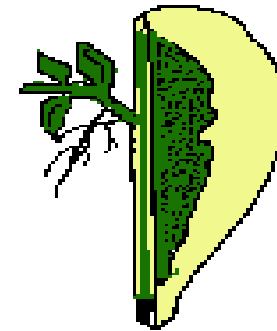
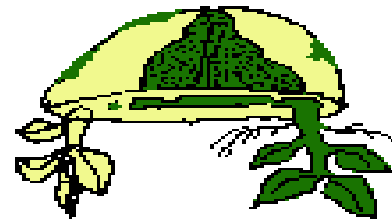
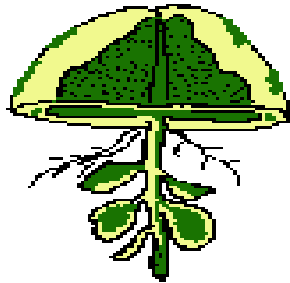
Tunas adventif kuning



Tunas adventif hijau



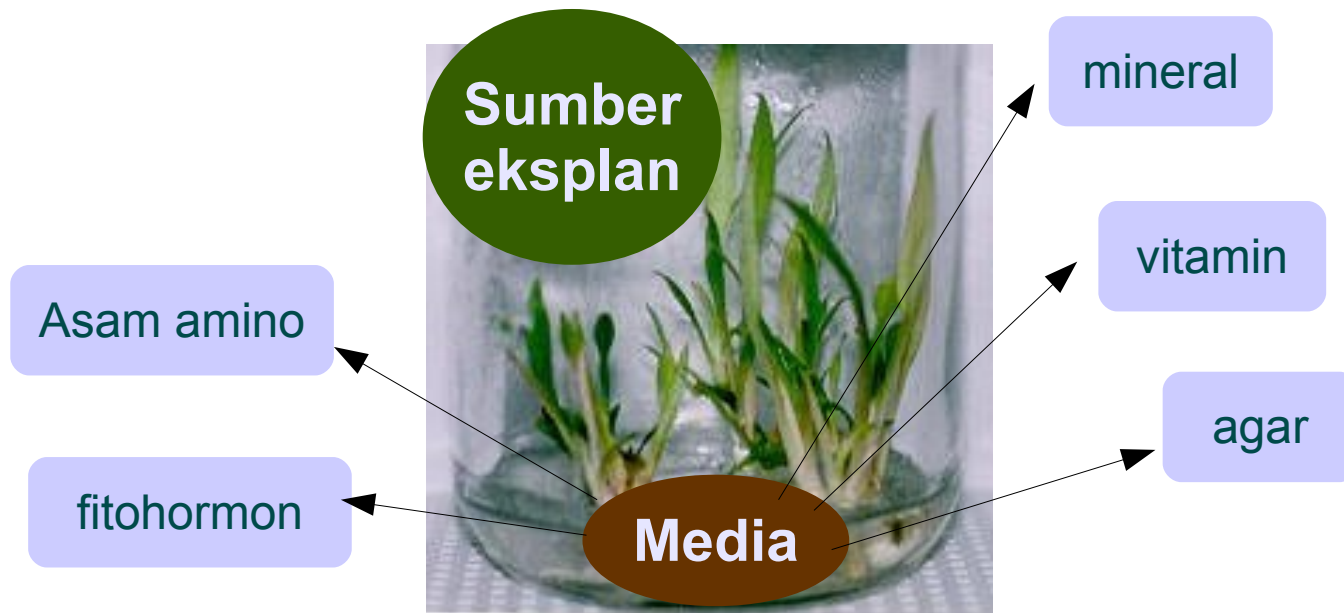
Potongan daun



- Tunas adventif yang tumbuh akan menyerupai bagian daun kimera dimana tunas tersebut muncul

KULTUR JARINGAN

Apa saja yang dibutuhkan untuk perbanyakkan?



KULTUR JARINGAN

Apa saja yang dibutuhkan untuk perbanyakkan?



Media

- Sebagai sumber makanan (nutrisi) bagi eksplan untuk tumbuh dan berkembang

Komposisi

- Unsur hara makro ($> \text{mg/L}$) : N, P, K, Ca, Mg, S
- Unsur hara mikro ($< \text{mg/L}$) : Fe, B, Mo, Zn, Cu, Mn
- Vitamin : myo-inositol, nicotinic acid, thiamin (B_1), Pyridoxin (B_6)
- Asam amino : Glycine
- Fitohormon : auksin, sitokinin
- Sumber karbon : sukrosa
- Agar

Media

Hara makro dan mikro

- Diberikan dalam bentuk garam.
- Kebutuhan tiap jenis tanaman akan unsur hara berbeda-beda. Karena itu telah dibuat berbagai jenis formula media khusus untuk jenis-jenis tanaman tertentu.
- Formulasi media yang banyak dipakai di kultur jaringan gaharu:
 - **Murashige and Skoog (MS)**, diformulasikan tahun 1962

Media

Vitamin

- Vitamin yang paling banyak digunakan: myo-inositol, nicotinic acid, thiamin (B₁), Pyridoxin (B₆).
- Vitamin berfungsi sebagai katalis dalam reaksi enzimatik di sel.
- Thiamin merupakan vitamin esensial yang dibutuhkan dalam kultur jaringan.

Media

Komposisi media Murashige dan Skoog (1961)

Senyawa Kimia	Jumlah (mg/L)	Senyawa kimia	Jumlah (mg/L)
NH_4NO_3	1650	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
KNO_3	1900	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
KH_2PO_4	170	myo-inositol	100.0
H_3BO_3	6.2	nicotinic acid	0.5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9	thiamine·HCl	0.1
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8.6	pyridoxine·HCl	0.5
KI	0.83	glycine	2.0
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	sucrose	30000
		agar	8000

Fitohormon

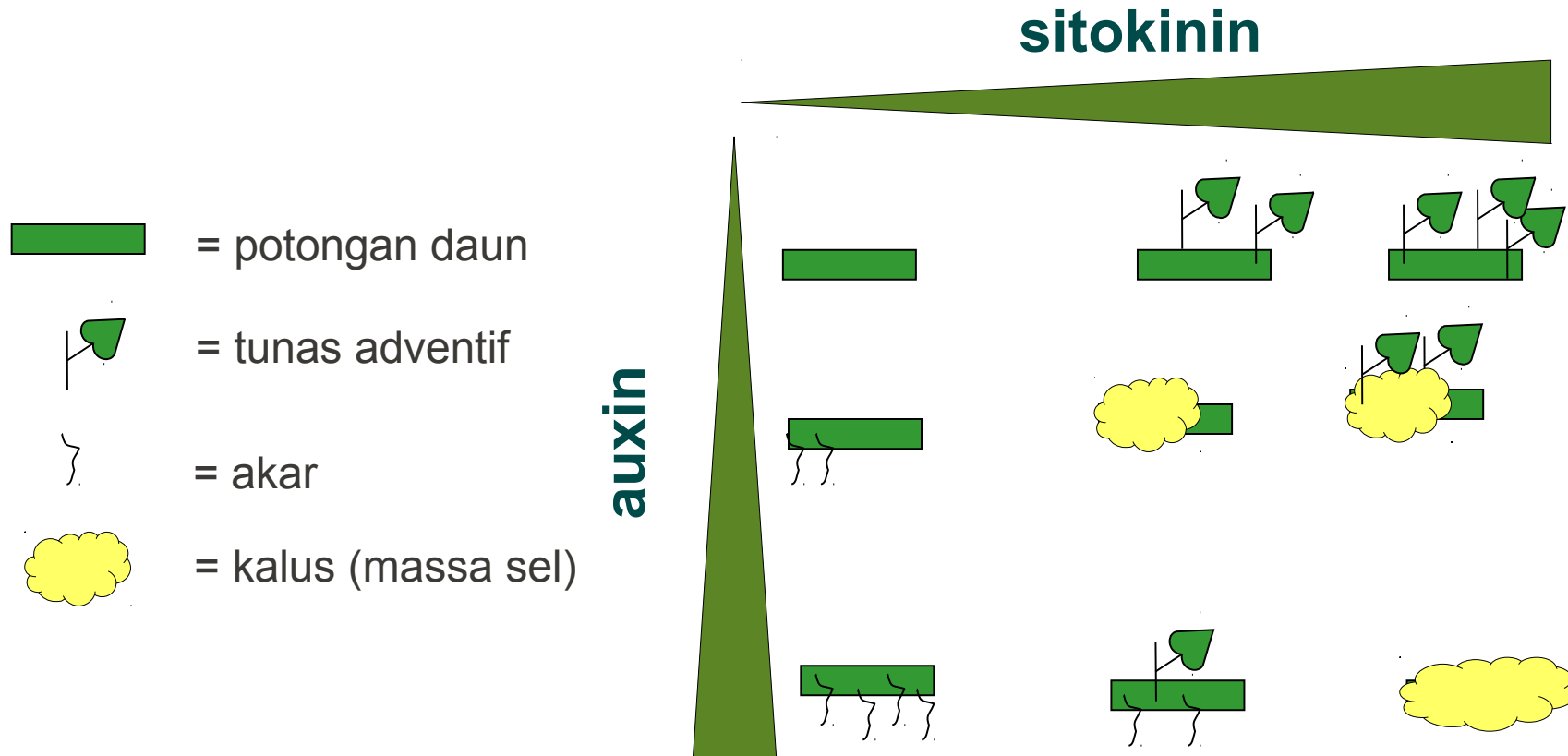
Auxin

- Merangsang pertumbuhan akar dan pembentukan kalus.
- Auksin alami, yaitu IAA, diproduksi di ujung tunas dan dialirkan ke tunas lateral dan akar.
- Auksin sintetik : NAA, 2,4-D, IBA, picloram, 2,4,5-T.

Sitokinin

- Merangsang pembentukan tunas adventif.
- Sitokinin alami, yaitu zeatin, diproduksi di ujung akar kemudian dialirkan ke tajuk.
- Sitokinin sintetik: BAP, kinetin, thidiazuron.
- Bersama dengan auksin merangsang pembelahan sel.

Interaksi auksin dan sitokinin



Hormon yang digunakan dalam kultur jaringan gaharu: sitokinin BAP 0.5 – 1.0 mg/l.

Sumber karbon

- Tanaman kultur jaringan mendapatkan sebagian energi dari proses fotosintesis. Namun...
- Tanaman tidak dapat memenuhi seluruh kebutuhannya akan senyawa karbon dari fotosintesis karena prosesnya sudah menurun
- Yang paling umum digunakan : sukrosa. Jenis lain yang dapat ditambahkan adalah glukosa dan fruktosa.
- Untuk perbanyak tanaman gaharu, digunakan sukrosa sebanyak 30 g/l.

Kondisi Tumbuh

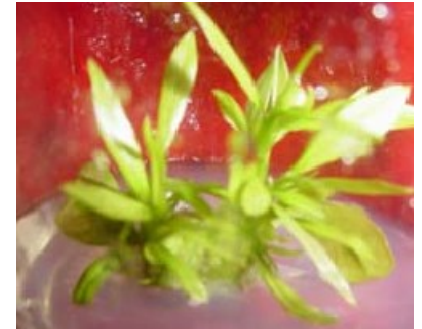
- Aseptik
- Cahaya
- Suhu : 22-25°C
- Kelembaban

Cahaya

- Cahaya buatan dari lampu neon dengan intensitas 1000 – 1500 lux (135-210 $\mu\text{mole/m}^2/\text{s}$), atau 2 buah lampu neon 20 watt pada ketinggian 40 cm di atas botol kultur.
- Pengaturan sumber cahaya dari samping juga dapat dilakukan.
- Bila intensitas cahaya ditingkatkan, dapat mengurangi kebutuhan gula, mengurangi tingkat kontaminasi dan tanaman lebih mudah tumbuh dan beradaptasi di rumah kaca.

Hasil Perbanyakan

- Eksplan tunas aksilar menghasilkan tunas baru setelah 5 minggu dalam media MS yang mengandung BAP 0.5 mg/l (Azwin et al., 2006).
- Pada media yang sama setelah 12 minggu dihasilkan rata-rata 5.6 tunas aksilar baru.
- Eksplan tunas aksilar menghasilkan 4 tunas setelah 16 hari dalam media MS yang mengandung BAP 1 mg/l (Mia et al., 2006).

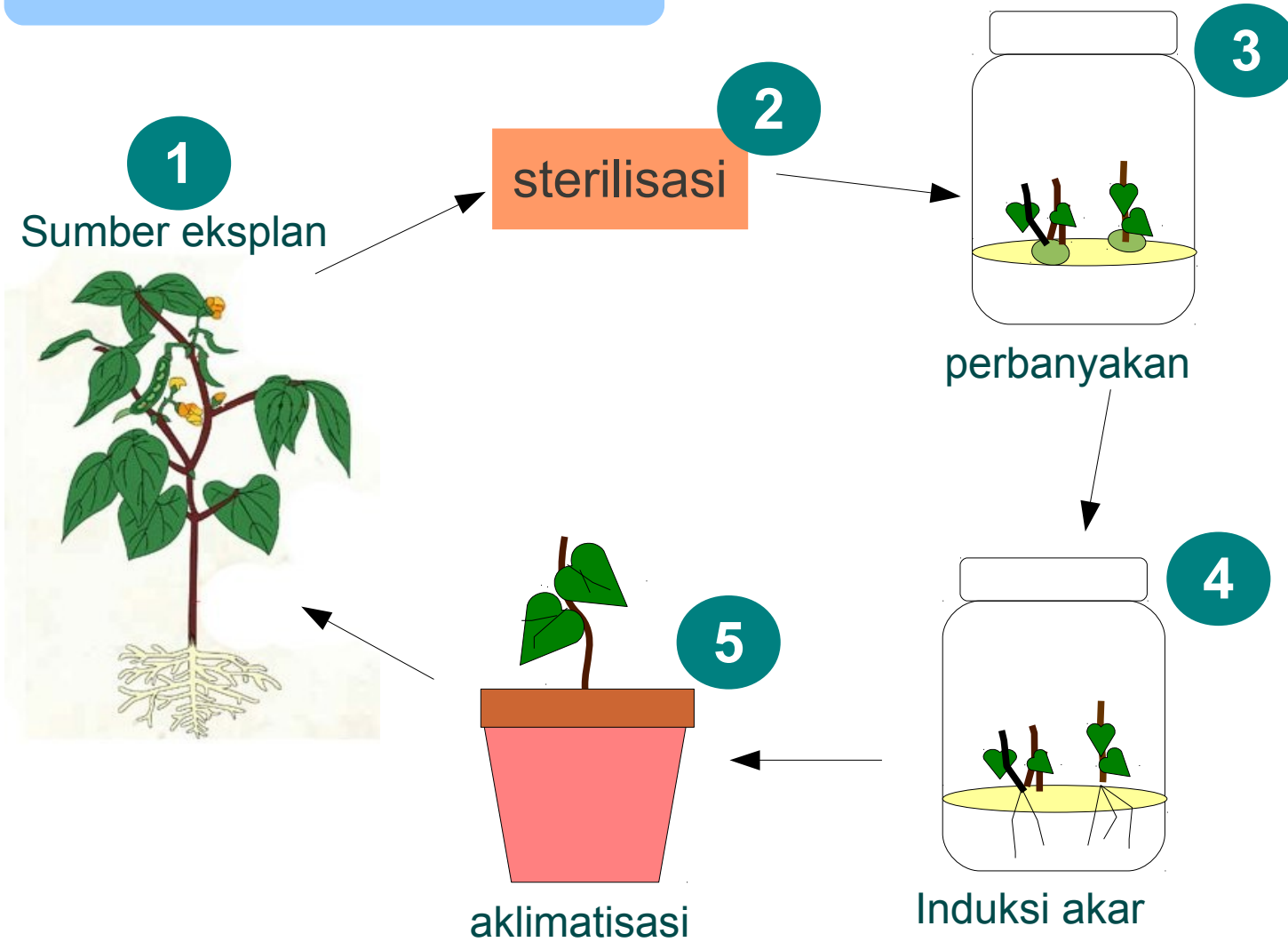


Mia et al. (2005), JAgroBiogen

Eksplan	Hormon	Waktu induksi	Referensi
Buku kotiledon	BAP 1 mg/L	16 hari	Mia et al. (2005)
Tunas aksilar bibit	BAP 0.5 mg/l	5 minggu	Azwin et al. (2006)
Tunas aksilar kecambah	BAP 0.3 mg/l	7 minggu	He et al., (2005)

KULTUR JARINGAN

Bagaimana tekniknya?



Kondisi Tumbuh

Induksi Akar

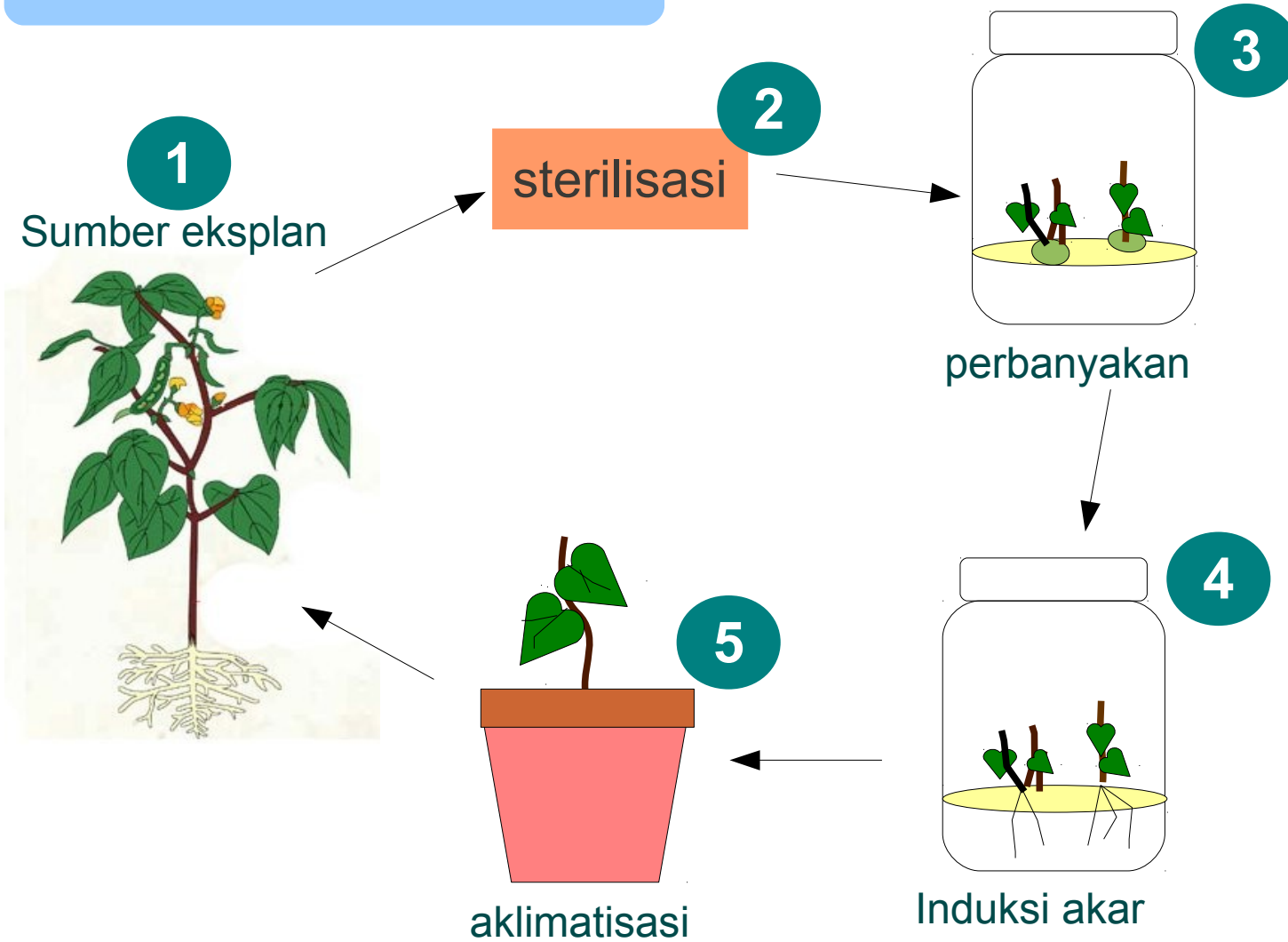
- Dalam tahap perbanyakan hanya dihasilkan tunas tanpa akar, sehingga perlu diinduksi akar agar tanaman dapat ditanam di tanah.
- Untuk menginduksi pembentukan akar digunakan auksin.
- Auksin NAA 1.0 mg/l dapat menginduksi perakaran (He *et al.*, 2005)



He *et al.*, 2005: JZhejiang

KULTUR JARINGAN

Bagaimana tekniknya?



Kondisi Tumbuh

Aklimatisasi

- Tanaman hasil kultur jaringan di botol tidak dapat langsung ditanam dipot ----> perlu aklimatisasi (adaptasi).
- Tanaman di botol dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan sisa agar dan media yang melekat di akar.
- Tanaman dipindahkan ke pot yang berisi media kompos, kemudian ditutup dengan plastik untuk menjaga kelembaban. Tanaman diletakkan di dalam rumah kaca. Setelah sebulan plastik penutup dapat dibuka

KESIMPULAN

- Eksplan yang digunakan: biji atau tunas aksilar dari kecambah *in vitro* atau bibit di polibag
- Media kultur jaringan yang digunakan untuk memperbanyak tunas gaharu adalah MS ditambah dengan sitokinin BAP 0.5 – 1.0 mg/l.
- Waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan tunas bervariasi dari 16 hari hingga 5 minggu. Tunas yang terbentuk 4-5 tunas.
- Perakaran dapat diinduksi dengan auksin NAA 0.3 mg/l selama 2 minggu.



TERIMA KASIH