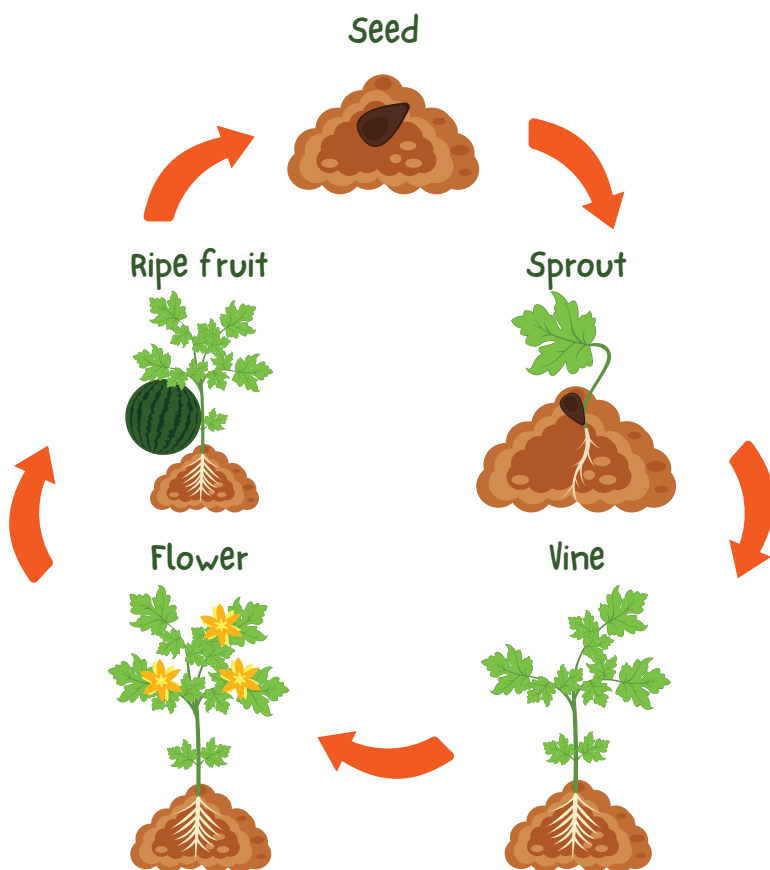


KULTUR JARINGAN

PENULIS :

**Maria Almeida, Mar'atus Sholihah, Nouke Lenda Mawikere,
Putri Damayanti, Annisa Nurul Ilmi, Yudia Azmi, Jamilatus Sa'diyah,
Sri Nopitasari, Natasha Florenika, Ellok Dwi Sulichantini,
Aloysia Sri Pujiyanti, Veronica L. Tuhumena, Rahayu Opi Anggoro,
Yuke Mareta Ariesta Sandra**



KULTUR JARINGAN

**Maria Almeida
Mar'atus Sholihah
Nouke Lenda Mawikere
Putri Damayanti
Annisa Nurul Ilmi
Yudia Azmi
Jamilatus Sa'diyah
Sri Nopitasari
Natasha Florenika
Ellok Dwi Sulichantini
Aloysia Sri Pujiyanti
Veronica L. Tuhumena
Rahayu Opi Anggoro
Yuke Mareta Ariesta Sandra**



GET PRESS INDONESIA

KULTUR JARINGAN

Penulis :

Maria Almeida
Mar'atus Sholihah
Nouke Lenda Mawikere
Putri Damayanti
Annisa Nurul Ilmi
Yudia Azmi
Jamilatus Sa'diyah
Sri Nopitasari
Natasha Florenika
Ellok Dwi Sulichantini
Aloysia Sri Pujiyanti
Veronica L. Tuhumena
Rahayu Opi Anggoro
Yuke Mareta Ariesta Sandra

ISBN : 978-634-255-128-8

Editor : Mila Sari S.ST., M.Si

Penyunting : Tri Putri Wahyuni, S.Pd

Desain Sampul dan Tata Letak : Atyka Trianisa, S.Pd

Penerbit : GET PRESS INDONESIA

Anggota IKAPI No. 033/SBA/2022

Redaksi :

Jln. Palarik Air Pacah No 26 Kel. Air Pacah
Kec. Koto Tangah Kota Padang Sumatera Barat

Website : www.getpress.co.id

Email : adm.getpress@gmail.com

Cetakan pertama, November 2025

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan
dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Segala Puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT dalam segala kesempatan. Sholawat beriring salam dan doa kita sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW. Alhamdulillah atas Rahmat dan Karunia-Nya penulis telah menyelesaikan Buku Kultur Jaringan ini.

Buku Ini Membahas Pendahuluan, Pengertian Dan Manfaat Kultur Jaringan, Prinsip Dasar Kultur Jaringan, Fasilitas Laboratorium Kultur Jaringan Dan Prinsip Sterilisasi, Media Kultur Jaringan, Eksplan, Sterilisasi, Induksi Kalus, Embryogenesis Somatic, Kultur Embrio, Induksi Keragaman Somaklonal, Induksi Tanaman Tahan Cekaman Lingkungan Dan Penyakit, Teknik Kultur Tanaman Penghasil Metabolit Sekunder, Kultur Dan Fusi Protoplast, Pemanfaatan Kultur Jaringan Dalam Rekayasa Genetik Tumbuhan.

Proses penulisan buku ini berhasil diselesaikan atas kerjasama tim penulis. Demi kualitas yang lebih baik dan kepuasan para pembaca, saran dan masukan yang membangun dari pembaca sangat kami harapkan.

Penulis ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung dalam penyelesaian buku ini. Terutama pihak yang telah membantu terbitnya buku ini dan telah mempercayakan mendorong, dan menginisiasi terbitnya buku ini. Semoga buku ini dapat bermanfaat bagi masyarakat Indonesia.

Padang, Oktober 2025

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Pendahuluan.....	1
1.2 Pengertian Kultur Jaringan	9
1.3 Manfaat Kultur Jaringan.....	11
DAFTAR PUSTAKA.....	13
BAB 2 PRINSIP DASAR KULTUR JARINGAN	15
2.1 Definisi	15
2.2 Prinsip Kultur Jaringan.....	16
2.2.1 Totipotensi	17
2.2.2 Prinsip Budidaya Terkendali.....	19
DAFTAR PUSTAKA.....	23
BAB 3 FASILITAS LABORATORIUM KULTUR JARINGAN TANAMAN DAN PRINSIP STERILISASI.....	25
3.1 Pendahuluan Tentang Kultur Jaringan Tanaman	25
3.2 Fasilitas Laboratorium Kultur Jaringan	26
3.3 Prinsip dan Metode Sterilisasi dalam Kultur Jaringan Tanaman	42
DAFTAR PUSTAKA.....	49
BAB 4 MEDIA KULTUR JARINGAN.....	53
4.1 Pendahuluan.....	53
4.2 Komponen Media Kultur	54
4.2.1 Makronutrien.....	54
4.2.2 Mikronutrien.....	56
4.2.3 Sumber Karbon	58
4.2.4 Vitamin	58
4.2.5 Zat Pengatur Tumbuh.....	59
4.2.6 Agen pematid.....	60
4.2.7 pH media	60
4.2.8 Arang Aktif	61
4.3 Jenis-jenis media	61
4.3.1 Murashige and skoog (MS)	62
4.3.2 Gamborg (B5)	62

4.3.3 White	63
4.3.4 Nitsch & Nitsch (NN)	63
4.3.5 Vacin & Went (VW)	64
4.3.6 Woody Plant Medium (WPM)	64
4.4 Pembuatan Media	64
4.4.1 Persiapan Larutan Stok	65
4.4.2 Pencampuran Komponen Media	65
4.4.3 Pengaturan pH Media	65
4.4.4 Sterilisasi Media	66
4.4.5 Penambahan zat yang sensitif panas	66
4.5 Faktor yang Memengaruhi Keefektifan Media	66
DAFTAR PUSTAKA	68
BAB 5 EKSPLAN	71
5.1 Pengertian dan Konsep Eksplan	71
5.2 Sumber dan Jenis Eksplan	73
5.3 Faktor yang Mempengaruhi Pemilihan Eksplan	76
5.4 Teknik Isolasi dan Sterilisasi Eksplan	77
5.5 Respon Eksplan dalam Kultur Jaringan	78
5.6 Aplikasi Eksplan dalam Kultur Jaringan	80
DAFTAR PUSTAKA	82
BAB 6 STERILISASI	85
6.1 Pendahuluan	85
6.2 Ruang Lingkup Sterilisasi	85
6.2.1 Sterilisasi Ruangan	85
6.2.2 Sterilisasi Alat Penabur	86
6.2.3 Sterilisasi Alat dan Bahan	87
6.2.4 Sterilisasi Media	88
6.2.5 Sterilisasi Bahan Tanam (Eksplan)	89
6.3 Metode Sterilisasi	92
6.3.1 Sterilisasi Mekanik atau Filtrasi	92
6.3.2 Sterilisasi Fisik	92
6.3.3 Sterilisasi Kimia	96
DAFTAR PUSTAKA	97
BAB 7 INDUKSI KALUS	99
7.1 Konsep dan Mekanisme Induksi Kalus	99
7.2 Karakteristik Morfologi dan Potensi Regenerasi Kalus	102
7.3 Faktor yang Mempengaruhi Induksi Kalus	104
7.4 Aplikasi Induksi Kalus	108

7.5 Tantangan dan Prospek Penelitian Induksi Kalus.....	110
DAFTAR PUSTAKA.....	113
BAB 8 EMBRYOGENESIS SOMATIC	117
8.1 Pendahuluan.....	117
8.2 Sejarah Dan Dasar Teori Embriogenesis Somatik.....	118
8.2.1 Sejarah	118
8.2.2 Dasar Teori.....	118
8.3 Definisi Dan Tahapan Embriogenesis Somatik	119
8.3.1 Definisi Embriogenesis Somatik	119
8.3.2 Perbedaan Embriogenesis Somatik dan Zigotik.....	119
8.3.3 Tipe Embriogenesis Somatik.....	120
8.3.4 Tahapan Embriogenesis Somatik.....	120
8.3.5 Tahapan Perkembangan Embriogenesis Somatik	123
8.4 Mekanisme Molekuler dan Regulasi Embriogenesis	
Somatik	124
8.4.1 Regulasi Genetik.....	124
8.4.2 Regulasi Hormonal	125
8.4.3 Regulasi Epigenetik.....	125
8.4.4 Integrasi Sinyal Molekuler	125
8.5 Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan ES.....	125
8.6 Aplikasi Embrio Somatik	132
8.7 Tantangan dan Prospek Embrio Somatik.....	133
DAFTAR PUSTAKA.....	136
BAB 9 KULTUR EMBRIO	139
9.1 Pendahuluan.....	139
9.2 Dasar-Dasar Kultur Embrio	140
9.2.1 Pengertian Kultur Embrio	140
9.2.2 Proses Dasar Kultur Embrio	140
9.2.3 Faktor yang Mempengaruhi Kultur Embrio	141
9.2.4 Aplikasi Kultur Embrio dalam Pertanian	141
9.3 Tujuan dan Aplikasi Kultur Embrio	142
9.3.1 Tujuan kultur Embrio	142
9.3.2 Aplikasi Kultur Embrio	142
9.4 Metodologi Kultur Embrio.....	143
9.4.1 Persiapan Eksplan	143
9.4.2 Sterilisasi Eksplan	144
9.4.3 Penyusunan Media Kultur.....	145
9.4.5 Proses Kultur	145

9.4.6 Aklimatisasi	145
9.4.7 Evaluasi Hasil	145
9.5 Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur Embrio	146
9.5.1 Komposisi Media Kultur	146
9.5.2 Kondisi Lingkungan.....	146
9.5.3 Sifat Eksplan.....	147
9.5.4 Interaksi Antar Embrio.....	147
9.5.5 Stres Metabolik.....	147
9.6 Contoh Aplikasi Kultur Embrio	147
9.6.1 Embryo Rescue dalam Pemuliaan Tanaman	148
9.6.2 Pengembangan Model In Vitro untuk Penelitian	148
9.6.3 Reproduksi Hewan melalui Fertilisasi In Vitro (IVF)	148
9.6.4 Peningkatan Hasil IVF pada Manusia	148
9.6.5 Penggunaan Mikrofuidik untuk Analisa Embriologis.....	149
9.6.6 Pengembangan Embryo dalam Penelitian Perkembangbiakan	149
9.7 Tantangan dan Prospek Kultur Embrio	149
9.7.1 Tantangan dalam Kultur Embrio.....	150
9.7.2 Prospek Kultur Embrio.....	150
DAFTAR PUSTAKA	152
BAB 10 INDUKSI KERAGAMAN SOMAKLONAL.....	159
10.1 Latar Belakang Keragaman Somaklonal	159
10.2 Mekanisme Timbulnya Keragaman Somaklonal	161
10.2.1 Peran Kultur Jaringan terhadap Keragaman Somaklonal.....	162
10.3 Studi Kasus Mekanisme Keragaman Somaklonal pada Tanaman Rempah dan Obat	164
10.3.1 Jahe (<i>Zingiber officinale</i>)	164
10.3.2 Kunyit (<i>Curcuma longa</i>).....	164
10.3.3 Temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i>)	165
10.3.4 Kayu Manis (<i>Cinnamomum verum</i>)	165
10.3.5 Lada (<i>Piper nigrum</i>).....	165
10.3.6 Pala (<i>Myristica fragrans</i>).....	166
10.3.7 Vanili (<i>Vanilla planifolia</i>)	166
10.3.8 Kapulaga (<i>Elettaria cardamomum</i>).....	166

10.3.9 Sereh Wangi (<i>Cymbopogon nardus</i>)	167
10.3.10 Cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i>)	167
10.4 Mekanisme Molekuler Keragaman Somaklonal	167
10.4.1 Perubahan Genetik (Mutasi DNA)	168
10.4.2 Perubahan Epigenetik	169
10.4.3 Aktivitas Elemen Transposabel	169
10.4.4 Rekombinasi Genetik Abnormal.....	170
10.4.5 Perubahan Jumlah Kromosom (Aneuploidi dan Poliploidi)	170
10.4.6 Perubahan pada Organela Sel (Plastida dan Mitokondria)	170
10.4.7 Stres Oksidatif dan Kerusakan DNA.....	171
10.4.8 Ketidakseimbangan Hormon Tanaman.....	171
10.4.9 Instabilitas Genom selama Regenerasi	172
10.4.10 Interaksi antara Faktor Genetik dan Lingkungan Kultur	172
10.5 Metode Induksi Keragaman Somaklonal	173
10.5.1 Kultur Kalus dan Subkultur Berulang	174
10.5.2 Penggunaan Media dengan Regulasi Zat Pengatur Tumbuh.....	174
10.5.3 Stres Abiotik sebagai Pemicu Variasi.....	175
10.5.4 Penggunaan Agen Mutagenik Kimia	176
10.5.5 Radiasi Fisik untuk Induksi Keragaman	176
10.5.6 Teknik Seleksi In Vitro Berbasis Stres Biotik	177
10.5.7 Kombinasi Teknik untuk Efektivitas Maksimal	178
10.6 Tantangan dan Prospek Masa Depan Metode Induksi Keragaman Somaklonal	178
DAFTAR PUSTAKA.....	181
BAB 11 INDUKSI TANAMAN TAHAN CEKAMAN LINGKUNGAN DAN PENYAKIT	185
11.1 Pendahuluan.....	185
11.2 Mekanisme Fisiologis dan Biokimia Toleransi Cekaman pada Kultur In Vitro.....	186
11.3 Seleksi In Vitro untuk Toleransi Cekaman Abiotik.....	187
11.3.1 Seleksi In Vitro untuk Toleransi Cekaman Kekeringan.....	189
11.3.2 Seleksi In Vitro untuk Toleransi Salinitas.....	190
11.3.3 Seleksi In Vitro untuk Toleransi Logam Berat.....	191

11.3.4 Toleransi Stres Melalui Teknologi Transgenik	192
11.4 Induksi Ketahanan Penyakit Melalui Kultur Jaringan...	194
11.5 Aplikasi <i>Plant Growth Promoting Microbes</i> (PGPM) dalam Kultur Jaringan.....	196
11.5 Prospek Pengembangan.....	197
DAFTAR PUSTAKA	199
BAB 12 TEKNIK KULTUR TANAMAN PENGHASIL METABOLIT SEKUNDER.....	205
12.1 Pendahuluan	205
12.2 Produksi Senyawa MS dan Faktor yang Mempengaruhi.....	208
12.3 Peningkatan Produksi Metabolit Sekunder	214
12.4 Produksi dan Isolasi Metabolit Sekunder.....	216
DAFTAR PUSTAKA	218
BAB 13 KULTUR DAN FUSI PROTOPLAS.....	219
13.1 Pendahuluan	219
13.1.1 Definisi protoplas dan kultur protoplas.....	220
13.1.2 Perkembangan sejarah kultur protoplas	221
13.1.3 Signifikansi protoplas dalam bioteknologi tanaman	221
13.2 Isolasi dan Kultur Protoplas.....	222
13.2.1 Prinsip dasar isolasi protoplas	223
13.2.2 Teknik Isolasi, Kultur, dan Regenerasi Protoplas..	224
13.3 Fusi Protoplas	224
13.3.1 Prinsip, mekanisme, dan faktor yang mempengaruhi.....	224
13.3.2 Metode dan identifikasi hasil	227
13.4 Aplikasi Kultur dan Fusi Protoplas.....	228
13.4.1 Hibridisasi Somatik.....	228
13.4.2 Peningkatan sifat tanaman	229
13.4.3 Produksi metabolit sekunder dari kultur protoplas.....	229
13.4.4 Transformasi Genetik Berbasis Protoplas.....	230
13.5 Diskusi dan Arah Masa Depan	231
DAFTAR PUSTAKA	232

BAB 14 PEMANFAATAN KULTUR JARINGAN DALAM REKAYASA GENETIK TUMBUHAN	239
14.1 Kultur Jaringan sebagai Fondasi Revolusi Rekayasa Genetika Tumbuhan.....	239
14.1.1 Konvergensi Historis: Ketika Dua Bidang Ilmu Bertemu.....	240
14.1.2 Peta Perjalanan: Peran Kultur Jaringan dalam Siklus Rekayasa Genetika.....	241
14.1.3 Tujuan dan Ruang Lingkup Bab.....	242
14.2 Dasar-Dasar Kultur Jaringan yang Relevan untuk Transformasi Genetik.....	243
14.2.1 Platform yang Tak Tergantikan	243
14.2.2 Totipotensi: Landasan Teoretis Utama	243
14.2.3 Jenis-Jenis Kultur yang Kritis dalam Transformasi Genetik.....	245
14.2.4 Diferensiasi dan Regenerasi: Organogenesis vs. Embriogenesis Somatik.....	247
14.2.5 Komponen Media Kultur yang Esensial	248
14.3 Metode-Metode Introduksi Gen (Transformasi Genetik) pada Tumbuhan	249
14.3.1 Metode Biologis: Transformasi <i>mediated-Agrobacterium tumefaciens</i>	250
14.3.2 Metode Fisik/Kimia: Transformasi Langsung.....	251
14.3.3 Pemilihan Metode yang Tepat	252
14.4 Peran Kultur Jaringan dalam Seleksi dan Regenerasi Tanaman Transgenik.....	253
14.4.1 Jembatan Antara Sel dan Tanaman Utuh.....	253
14.4.2 Peran Kultur Jaringan dalam Seleksi Transformasi.....	254
14.4.3 Konfirmasi dan Aklimatisasi.....	256
14.5 Aplikasi dan Studi Kasus: Pemanfaatan Kultur Jaringan dalam Rekayasa Genetika Tumbuhan	258
14.5.1 Peningkatan Produktivitas dan Ketahanan Terhadap Cekaman Biotik.....	258
14.5.2 Peningkatan Kualitas Nutrisi dan Komposisi Produk.....	260
14.5.3 Produksi Senyawa Biofarmasi dan Industri (<i>Molecular Pharming</i>)	262

14.5.4 Aplikasi dalam Pemuliaan Tanaman dan Konservasi	263
14.5.5 Tantangan, Kontroversi, dan Perspektif Masa Depan.....	263
14.6 Kesimpulan	264
DAFTAR PUSTAKA	265
BIODATA PENULIS	

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Perbedaan kultur jaringan dengan metode konvensional	2
Tabel 3.1. Jenis sterilisasi, metode, serta obyek yang disterilkan	43
Tabel 3.2. Bahan yang digunakan dalam sterilisasi eksplan.....	44
Tabel 5.1. Respon eksplan berbagai spesies tanaman dalam kultur jaringan.....	79
Tabel 8.1. Perbedaan Embriogenesis Somatik dan Zigotik .	119
Tabel 8.2. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan dari Embriogenesis Somatik (ES)	129
Tabel 8.3. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) dalam Embriogenesis Somatik	131
Tabel 9.1. Metode sterilisasi eksplan daun kopi	144
Tabel 11.1. Aplikasi beberapa jenis agen selektif kimia pada seleksi in vitro untuk toleransi kekeringan.....	190
Tabel 11.2. Aplikasi beberapa jenis agen selektif kimia pada seleksi in vitro untuk toleransi kekeringan.....	193

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1. Kultur Jaringan Tumbuhan	2
Gambar 1.2. Gottlieb Haberlandt (Bapak Kultur Jaringan). 4	
Gambar 1.3. Pola totipotensi pada sel	6
Gambar 1.4. Tokoh- tokoh kultur jaringan tumbuhan	9
Gambar 2.1. Kultur Jaringan Tumbuhan	15
Gambar 2.2. Totipotensi.....	19
Gambar 2.3. Media Kultur	20
Gambar 2.4. Alat Sterilisasi Media Kultur	22
Gambar 2.5. Contoh tempat menyimpan kultur jaringan....	22
Gambar 3.1. Peralatan dan sarana penunjang yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman...	42
Gambar 3.2. Beberapa metode sterilisasi peralatan dalam kultur jaringan: A) Menggunakan oven, B) Menggunakan <i>Glass Bead Sterilizer</i> , dan C) Menggunakan Api Bunsen.....	47
Gambar 5.1. Pembentukan kalus dari eksplan daun <i>Fraxinus nigra (black ash)</i>	72
Gambar 5.2. Bagian tumbuhan yang digunakan untuk eksplan secara <i>in vivo</i>	74
Gambar 6.1. Enkas	87
Gambar 6.2. Autoklaf.....	88
Gambar 6.3 Rak penyimpanan	88
Gambar 6.4. Sterilisasi Eksplan Biji Jeruk Kasturi.....	91
Gambar 7.1. Induksi kalus pada <i>V.anthelmintica</i>	101
Gambar 7.2. Ragam keragaan kalus kopi arabika	104
Gambar 7.3. Kalus dengan potensi morfogenik yang berbeda seringkali diisolasi dari satu eksplan	107
Gambar 7.4. Kalus tanaman <i>Goniiothalamus Tapis</i> Miq.	109
Gambar 8.1. Perkembangan embrio somatik anggrek bulan <i>Ph amabilis</i> (L.) Bl. secara <i>in vitro</i>	121
Gambar 8.2. Gambaran histologis perkembangan embrio somatik <i>Ph amabilis</i> (L.) Bl.....	122
Gambar 8.3. Induksi kalus embriogenik (EC) dan perkembangan embrio somatik pada <i>Lilium</i> <i>pumilum</i> :.....	130

Gambar 9.1. Hasil perkembangan buah kopi Arabika	144
Gambar 11.1. Berbagai teknik dalam kultur jaringan untuk regenerasi tanaman dapat dimanfaatkan dalam proses seleksi dan transformasi genetik tanaman.....	194
Gambar 12.1. Metabolit sekunder dan fungsinya bagi tumbuhan	206
Gambar 12.2. Jalur utama biosintesis dan hubungannya dengan MS.....	208
Gambar 12.3. Warna dan tekstur kalus hasil induksi berbagai konsentrasi Cu ²⁺ pada media	215
Gambar 12.4. Pembentukan akar berambut menggunakan bakteri <i>Agrobacterium</i> yang dilakukan pada potongan daun, batang muda dengan cara menginfeksi dengan jarum suntik.....	216
Gambar 13.1. Protoplas <i>Arabidopsis thaliana</i>	220
Gambar 13.2. Fusi protoplas.....	225

BAB 1

PENDAHULUAN

Oleh Maria Almeida

1.1 Pendahuluan

Ketika orang membahas topik tentang budi daya tanaman, pada umumnya yang dimaksud adalah budi daya tanaman secara *in-vivo* yang dilakukan di dalam pot, rumah kaca, ataupun lapangan. Teknik budidaya tersebut dapat dikelompokkan menjadi beberapa bidang seperti pertanian tanaman pangan, hortikultura, perkebunan, kehutanan, pemuliaan tanaman, bioteknologi (Zulkarnain, 2022). Perkembangan zaman saat ini, kehidupan manusia dalam semua bidang telah dipengaruhi oleh teknologi, salah satunya di bidang Biologi. Salah satu cabang ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK) dalam bidang Biologi yang mempelajari aplikasi dari organisme biologis untuk kepentingan manusia disebut bioteknologi. Adanya bioteknologi akan membantu manusia dalam mencari inovasi baru demi menunjang kesejahteraannya untuk mengatasi berbagai permasalahan, seperti yang berkaitan dengan pertanian dan pangan yang sulit diatasi dengan metode konvensional. Bioteknologi merupakan solusi yang tepat dan menjanjikan karena peran pentingnya dalam menciptakan produk yang kreatif dan akan terus mengalami perkembangan yang pesat.

Bioteknologi memiliki banyak bidang fokus yang dipelajari, salah satunya kultur jaringan. Saat ini kultur jaringan merupakan teknik penting dalam bidang keilmuan seperti biokimia, biologi molekuler, pemuliaan tanaman, bioteknologi pertanian, dan industri bibit tanaman (Hapsoro and Yusnita, 2018). Kultur jaringan tanaman merupakan dasar untuk semua bioteknologi tanaman. Bagian yang akan dikultur disebut eksplan, dimana eksplan dapat diambil dari bagian tanaman seperti akar, pucuk, bunga, daun (Widyastuti and Deviyanti, 2018). Penentuan bagian tanaman yang akan digunakan sebagai eksplan perlu dipertimbangkan dengan baik karena kompetensi bagian-bagian organ tanaman tersebut akan berbeda

responnya terhadap zat pengatur tumbuh (ZPT) dan lingkungan mikro (Rahmat, A *et al.*, 2023). Jaringan tanaman yang masih muda di sekitar meristem apikal memiliki kemampuan regenerasi yang lebih baik daripada jaringan tanaman yang lebih tua (Dwiyani, 2013). Salah satu hambatan dari tehnik *in-vitro* adalah adanya kontaminasi mikroorganisme yang dapat menyerang eksplan sebagai bahan tanam sehingga eksplan terhambat pertumbuhannya (Msogoya *et al.*, 2012). Namun demikian, teknik kultur jaringan tanaman (*in-vitro*) memiliki prospek yang lebih baik dibandingkan dengan metode perbanyakan konvensional (*in-vivo*).



Gambar 1.1. Kultur Jaringan Tumbuhan
 Sumber: (Almeida and Esyanti, 2013)

Adapun perbedaan perbanyakan kultur jaringan (*in-vitro*) dengan metode konvensional (*in-vivo*) adalah sebagai berikut:

Tabel 1.1. Perbedaan kultur jaringan dengan metode konvensional

Kultur jaringan	Konvensional
Propagul relatif kecil	Propagul relatif besar, terutama cangkok
Perbanyakan massal tanaman superior, dari satu propagul menjadi banyak	Satu propagul menjadi satu tanaman

Kultur jaringan	Konvensional
Hasil perbanyakan 1 dapat dipakai langsung untuk perbanyakan selanjutnya	Harus menunggu beberapa saat sebelum diisolasi lagi
Dalam keadaan aseptik, tanaman tidak mudah terkena serangan patogen	Rentan terkena serangan patogen
Tidak memerlukan tempat yang luas, dapat dilakukan di dalam ruangan yang relatif kecil	Memerlukan tempat yang luas
Tidak bergantung musim, dapat dilakukan dalam segala musim	Sangat bergantung musim

(Widyastuti and Deviyanti, 2018)

Keuntungan-keuntungan dilakukannya kultur jaringan yaitu *pertama*, menghasilkan jutaan klon dalam waktu setahun (singkat) hanya dari sejumlah bagian kecil material awal, dimana apabila menggunakan metode konvensional (*in-vivo*) akan memerlukan waktu bertahun-tahun untuk menghasilkan tanaman dengan jumlah yang sama dan jumlah bahan yang diperlukan juga lebih banyak. *Kedua*, teknik kultur jaringan menjadi alternatif bagi spesies-spesies tanaman yang resisten terhadap sistem perbanyakan konvensional dengan dilakukannya manipulasi terhadap faktor lingkungan seperti penggunaan zat pengatur tumbuh (ZPT). *Ketiga*, dihasilkannya tanaman yang bebas hama/patogen. *Keempat*, teknik kultur jaringan tidak bergantung musim karena proses kultur jaringan dilakukan pada kondisi lingkungan yang terkendali seperti di laboratorium (Zulkarnain, 2022). *Kelima*, teknik kultur jaringan digunakan sebagai metode perbanyakan spesies tanaman langka (Widyastuti and Deviyanti, 2018).

Teknik kultur jaringan selain memiliki keuntungan, juga memiliki kelemahan antara lain memerlukan biaya yang cukup tinggi sehingga harga bibit hasil kultur jaringan relatif mahal dibandingkan bibit anakan. Hal ini dikarenakan produksi bibit kultur jaringan menuntut persyaratan tertentu yang harus dipenuhi. Syarat pokok pelaksanaan kultur jaringan tanaman adalah kondisi laboratorium dengan segala fasilitasnya seperti bahan media tanam secara kimiawi, alat-alat kerja yang harganya bervariasi dari yang murah

hingga mahal, sarana pendukung untuk menciptakan kondisi aseptik, dan fasilitas dasar seperti listrik, air, bahan bakar (Widyastuti and Deviyanti, 2018). Kultur jaringan menggunakan prinsip perbanyakan tanaman secara vegetatif. Metode ini memanfaatkan sifat totipotensi tanaman yang mampu berdiferensiasi membentuk jaringan lain hingga tumbuh dan berkembang menjadi individu baru. Keberhasilan dari kultur jaringan sendiri tergantung dari keadaan media tanam, sterilisasi, lingkungan tumbuh (intensitas cahaya, suhu, kelembapan, dll).

Teknik kultur jaringan sudah dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti pertanian dan farmasi. Di bidang pertanian, kultur jaringan membantu penyediaan bibit unggul dalam jumlah besar, menghasilkan bibit yang bebas hama dan penyakit serta memperbaiki sifat-sifat tanaman. Di bidang farmasi, kultur jaringan menjadi salah satu metode alternatif untuk memperoleh metabolit sekunder yang berkhasiat obat karena dapat dilakukan modifikasi media, zat pengatur tumbuh, dan sumber karbon agar menghasilkan metabolit yang diinginkan. Selain itu, kultur jaringan penting dalam tujuan konservasi tanaman yang terancam hilang dari biodiversitas. Hal ini dilakukan dengan menerapkan konservasi *in-vitro* yang dapat dilakukan melalui penyimpanan keadaan tumbuh (jangka pendek), penyimpanan pertumbuhan minimal (jangka pendek dan menengah), dan penyimpanan dengan teknik pembekuan (jangka panjang).



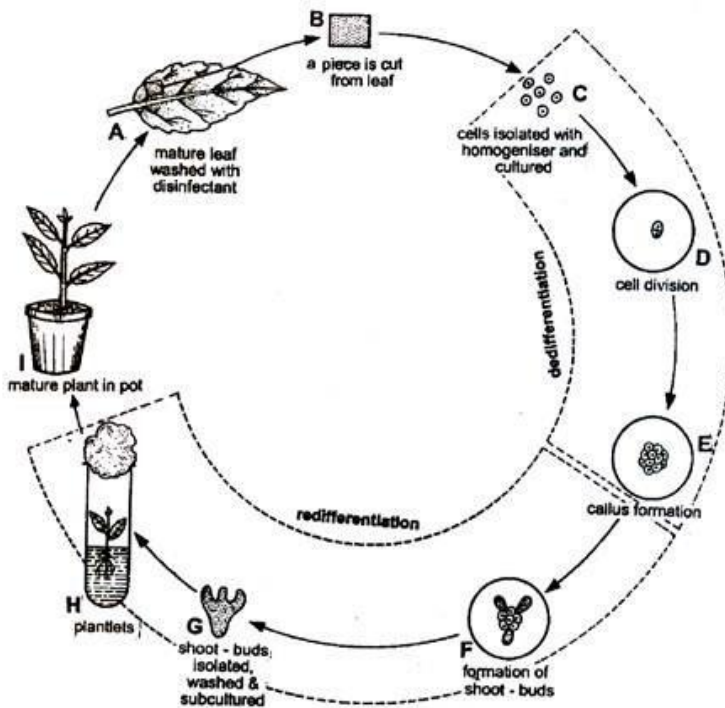
Gambar 1.2. Gottlieb Haberlandt (Bapak Kultur Jaringan)
Sumber: (Harahap *et al.*, 2019)

Kultur jaringan memiliki landasan yang berdasarkan atas tiga kemampuan dasar dari tanaman (Biondi and Thorpe, 1981), yaitu:

1. Totipotensi

Kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh bila mendapat stimulasi yang sesuai dan tepat. Totipotensi memberikan implikasi bahwa semua informasi pertumbuhan dan perkembangan organisme terdapat di dalam sel. Secara teoritis, semua sel memiliki kemampuan totipotensi, namun yang mengekspresikan keberhasilan terbaik adalah sel meristematik.

Landasan totipotensi berdasarkan pada dasar teori yang ditulis oleh Schleiden dan Schwann, yang menyatakan bahwa bagian tanaman yang hidup bersifat autonomi dan totipotensi. Sel bersifat autonom artinya dapat mengatur rumah tangganya sendiri, yang dimaksud disini adalah dapat melakukan metabolisme, tumbuh, berkembang secara independen, jika diisolasi dari jaringan induknya. Totipotensi diartikan sebagai kemampuan sel atau jaringan tumbuhan yang diambil dari bagian manapun apabila dibudidayakan di dalam media yang sesuai, akan dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman sempurna, artinya dapat beregenerasi, bereproduksi, berkembang biak secara normal melalui biji atau spora. Pada teknik kultur jaringan, bila komposisi medium yang digunakan tepat, maka jaringan tumbuhan mampu mengalami pembelahan sel dan berdiferensiasi sehingga membentuk individu lengkap. Hal ini membuktikan sifat totipotensi pada tumbuhan (Almeida and Esyanti, 2013). Menurut kedua ahli tersebut, sel mempunyai kemampuan otonom maupun tumbuh mandiri, bahkan mempunyai kemampuan totipotensi. Teori sel berkembang menjadi konsep totipotensi melahirkan kultur jaringan. Jadi, Teknik kultur jaringan merupakan suatu evolusi teknik dari teori sel.



Gambar 1.3. Pola totipotensi pada sel
Sumber: (Pullaiah, Subba Rao and Sreedevi, 2017)

2. Rediferensiasi

Kemampuan sel-sel masak (mature) kembali menjadi ke kondisi meristematik. Dimana diferensiasi sel merupakan suatu perubahan sel yang telah mencapai volume pertumbuhan akhir menjadi terspesialisasi sesuai fungsinya menghasilkan jenis jaringan, organ, organisme baru. Sel berkembang dari satu titik pertumbuhan baru yang diikuti oleh rediferensiasi yang mampu melakukan reorganisasi menjadi organ baru.

3. Kompetensi

Menggambarkan potensi endogen dari sel atau jaringan untuk tumbuh dan berkembang dalam satu jalur tertentu. Contohnya *embryogenically competent cell*, adalah kemampuan untuk berkembang menjadi embrio fungsional penuh. Sebaliknya adalah non-kompeten atau *morphogenetically* tidak mempunyai kemampuan.

Para pakar yang berperan dalam sejarah dimulainya pengetahuan kultur- jaringan tanaman antara lain adalah:

- 1902 Bapak kultur jaringan tanaman adalah Gottlieb Haberlandt, seorang botanis Jerman, Haberlandt adalah orang pertama yang membudayakan sel-sel yang terisolasi dan sepenuhnya terdiferensiasi sejak tahun 1898 dan mempresentasikan hasil percobaan perintisnya pada tahun 1902
- 1904 Hannig berhasil melakukan kultur embrio tanaman Cruciferae pada larutan gula dan garam mineral
- 1922 Knudson mengecambahkan anggrek secara *in-vitro* dan pada tahun yang sama Robbins mengkulturkan ujung akar secara *in-vitro*
- 1939 Gautheret, Nobecourt dan White menemukan auksin sebagai pengatur pertumbuhan alami dan pengakuan akan pentingnya vitamin -B dalam Skoog juga menemukan sitokinin pada tahun 1939
- 1940 Gautheret melakukan kultur jaringan kambium secara *in-vitro* pada tanaman Ulmus untuk studi pembentukan tunas adventif
- 1941 Van Overbeek menguji penggunaan air kelapa untuk campuran media pada perkembangan embrio dan pembentukan kalus dalam kultur Datura.
- 1944 Pembentukan tunas adventif pertama pada kultur tembakau secara *in-vitro* oleh Skoog
- 1946 Tanaman lengkap pertama dihasilkan dari eksplan kultur tunas ujung pada Lupinus dan Tropaeolum oleh Ball
- 1950 Ball mencoba menanam jaringan kalus tanaman *Sequoia sempervirens* dan dapat menghasilkan organ
- 1954 Muir berhasil menumbuhkan tanaman lengkap dari kultur sel tunggal melalui kultur suspensi (media cair)
- 1955 Miller dan kawan-kawan memisahkan yang pertama diketahui sebagai sitokinin dari DNA sperma ikan herring dan menamakannya kinetin. Saat ini, banyak senyawa sintesis serta alami

dengan aktivitas seperti kinetin. Ketersediaan zat-zat ini telah memungkinkan untuk menginduksi pembelahan dalam sel-sel jaringan yang sangat matang dan terdiferensiasi seperti mesofil

- 1960 Laminar air flow digunakan pertama kali pada akhir tahun 60-an. Tahun 1960, Jones mendesain metode mikrokultur untuk menumbuhkan sel tunggal yang bergantung pada media terkondisikan (media dimana jaringan dapat tumbuh). Teknik ini menyebabkan pengamatan lebih lanjut mengenai kultur sel. Bergmann juga mengembangkan Teknik mengkloning sejumlah besar sel tunggal dari tumbuhan tingkat tinggi yang sekarang digunakan secara luas untuk kloning sel dan percobaan kultur protoplas.
- 1964 Guha dan Maheswari mendemonstrasikan kemungkinan memproduksi sejumlah besar planet haploid androgenik dari polen biji-bijian *Datura innoxia* dengan mengkulturkan anther yang belum matang
- 1970 Percobaan pertama Power melakukan penyatuan (fusi) isolasi protoplas menggunakan NaNO_3
- 1971 Takebe berhasil mengkultur tanaman lengkap dari eksplan protoplas
- 1972 Hibrida somatik pertama antara *Nicotiana glauca* dan *N. langsdorfli* diproduksi oleh Carlson dan rekan kerjanya
- 1981 Larkin dan Scowcroft mengadakan penelitian variasi somaklonal (variasi yang terdeteksi pada tanaman diregenerasi dari segala bentuk kultur) yang pertama kali untuk mendapatkan tanaman yang tahan penyakit. Tanaman regenerasi disebut sebagai somaklon
- 1984 Dilakukan transformasi sel pertama kali oleh Horch. Transformasi merupakan salah satu cara untuk mendapatkan kultur varietas unggul. Tanaman tembakau transgenik pertama yang mengekspresikan gen asing yang direkayasa

- diproduksi dengan bantuan *A. tumefaciens*. Pada tahun 1984, Evans mengenalkan istilah gametoklon untuk tanaman yang diregenerasi dari sel-sel gamet
- 1986 Transformasi tanaman pertama dilakukan oleh IPTC
- 1992 Transformasi tanaman wheat oleh Vasil
- 1996 Pelepasan pertama tanaman hasil transformasi genetik



Gambar 1.4. Tokoh- tokoh kultur jaringan tumbuhan (Bhojwani and Razdan, 1996)

1.2 Pengertian Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan suatu teknik membudidayakan dan memperbanyak suatu individu dari bagian sel atau jaringan tanaman

yang ditumbuhkan dalam media dan kondisi yang terkontrol dan aseptik (Putri *et al.*, 2021). Kultur Jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi dari bagian tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan, dan organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan meregenerasi menjadi tanaman utuh (Ziraluo, 2021). Kultur jaringan merupakan salah satu tehnik dalam perbanyakan tanaman secara klonal untuk perbanyakan massal (Lestari, 2011). Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh (Habibah, Rahayu and Anggraito, 2021).

Kultur Jaringan Tumbuhan adalah suatu metode atau teknik mengambil bagian-bagian tanaman seperti protoplas, sel, sekelompok jaringan dan organ untuk ditumbuhkan di lingkungan dan medium secara aseptik (Mastuti, 2017). Mengacu pada definisi kultur jaringan tumbuhan maka ada tiga hal penting yang perlu diperhatikan dari definisi tersebut, yaitu Pertama, bagian tanaman baik sel maupun jaringan yang akan ditumbuhkan disebut eksplan. Eksplan dapat berasal dari semua bagian tumbuhan baik organ maupun jaringan dan sel spesifik (polen, endosperma, mesofil, kotiledon, hipokotil). Kebutuhan eksplan dalam ukuran kecil tidak akan mengganggu keberadaan tumbuhan induknya. Hal ini sangat berarti bagi tumbuhan langka untuk menjaga kelestariannya. Kedua, Lingkungan dan medium buatan yang sesuai. Temperatur, intensitas cahaya dan kelembaban ruang kultur diatur sesuai dengan kebutuhan pertumbuhan jaringan. Medium kultur mengandung sumber energi dan garam anorganik untuk mendukung kebutuhan pertumbuhan sel dan diletakkan di dalam wadah/botol kaca. Selain itu, medium buatan juga mengandung zat pengatur tumbuh yang pada umumnya dari kelompok sitokinin dan auksin. Ketiga, kondisi aseptik yang dimaksud yaitu kondisi steril yang harus dipenuhi oleh eksplan, beberapa peralatan serta tahap pengerjaan kultur sehingga dipastikan tidak mengandung kontaminan berupa mikroorganisme. Pertumbuhan mikroorganisme yang lebih cepat dibandingkan jaringan tumbuhan maka akan menghambat pertumbuhan eksplan.

1.3 Manfaat Kultur Jaringan

Dalam dunia pertanian, kultur jaringan memiliki manfaat yang sangat penting. Kultur jaringan berperan dalam perkembangbiakan vegetatif sehingga dapat menghasilkan tanaman baru yang cepat, berkualitas, dan efisien (Wahyuni, Wulandari and Muflihati, 2020). Teknik ini melibatkan penggunaan media kultur seperti agar yang mengandung nutrisi tanaman. Kultur jaringan efektif menghasilkan bibit yang relatif lebih banyak. Berikut ini adalah beberapa manfaat dari kultur jaringan tanaman: (Rahmat, A *et al.*, 2023)

1. Perbanyakan Massal
Dengan menggunakan kultur jaringan, tanaman dapat diperbanyak dalam jumlah yang besar dan cepat. Hal ini sangat berguna dalam memproduksi bibit tanaman yang langka atau sulit dikembangkan secara konvensional.
2. Eliminasi Penyakit
Melalui kultur jaringan, tanaman yang terinfeksi penyakit dapat diisolasi dan dimurnikan dari patogen tersebut. Dengan cara ini, dapat dihasilkan bibit tanaman yang sehat dan bebas penyakit.
3. Pemulihan Tanaman Terancam Punah
Kultur jaringan digunakan untuk mempertahankan spesies tanaman langka atau terancam punah. Dengan melakukan perbanyakan massal melalui teknik ini, populasi tanaman dapat dilestarikan.
4. Produksi Tanaman Transgenik
Kultur jaringan juga penting dalam pengembangan dan produksi tanaman transgenik. Melalui teknik ini, gen-gen spesifik dapat dimasukkan ke dalam sel tanaman sehingga menghasilkan karakteristik baru seperti ketahanan terhadap hama.
5. Pemuliaan Tanaman
Kultur jaringan juga digunakan dalam pemuliaan tanaman untuk menghasilkan varietas baru dengan karakteristik unggul seperti ketahanan terhadap penyakit, produktivitas tinggi.
6. Konservasi Sumber Daya Genetik

Dalam upaya melestarikan sumber daya genetik tumbuhan langka, kultur jaringan menjadi alat yang sangat penting. Dengan memperbanyak tanaman melalui kultur jaringan, kita dapat mengurangi resiko kehilangan keanekaragaman genetik dan mempertahankan spesies yang berharga

7. Produksi Tanaman Hidroponik

Kultur jaringan digunakan dalam produksi tanaman hidroponik, dimana tanaman tumbuh dalam larutan nutrisi tanpa menggunakan media tanah. Melalui kultur jaringan, bibit-bibit berkualitas tinggi dapat dihasilkan untuk digunakan dalam sistem hidroponik yang modern dan efisien

8. Regenerasi Tanaman

Tanaman yang rentan terhadap gangguan lingkungan dapat diregenerasi melalui kultur jaringan. Dalam kondisi kontrol laboratorium, bagian tanaman seperti daun atau batang dapat diperbanyak untuk menghasilkan individu yang sehat dan bebas patogen

9. Produksi Tanaman Khusus

Melaui teknik kultur jaringan, petani memiliki kesempatan untuk menghasilkan varietas tanaman yang unggul dengan sifat-sifat tertentu. Misalnya, tanaman tahan terhadap hama. Hal ini memberikan peluang untuk meningkatkan produktivitas dan ketahanan tanaman secara menyeluruh.

10. Konservasi Keragaman Genetik

Kultur jaringan digunakan dalam program konservasi genetik untuk tanaman langka. Dengan mengisolasi dan memperbanyak individu-individu tersebut, kita dapat mempertahankan keanekaragaman genetik yang penting bagi kelestarian spesies

11. Perbaikan Sifat Tanaman

Teknik kultur jaringan memungkinkan para peneliti melakukan modifikasi genetik pada tanaman dengan cara lebih efisien. Ini membuka peluang untuk mengembangkan varietas yang memiliki sifat unggul seperti resisten terhadap hama, peningkatan nilai gizi, adaptasi terhadap iklim. Di era pertanian modern ini, kultur jaringan tanaman membawa revolusi pengembangan varietas tanaman baru dan perbaikan genetic.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeida, M., & Esyanti, R. 2013. *Evaluasi Kondisi Biji Tomat (Lycopersicum esculentum) Yang Telah Dibawa Ke Luar Angkasa: Fisik, Kimia, Pertumbuhan, dan Produktivitas*. Thesis. Institut Teknologi Bandung.
- Bhojwani, S., & Razdan, M. 1996. *Plant Tissue Culture*. 5th edn. Netherland: Elsevier Science.
- Biondi, S., & Thorpe, T. 1981. *Requirement for A Tissue Culture Facility*. Plant Tiss. New York: Academic Press.
- Dwiyani, Rindang. 2013. Induksi Kalus Pada Tanaman Anggrek Vanda tricolor Lindl. Var. Suavis, Upaya Penyediaan Target Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens*. *Jurnal Agrotropika*, 18(02), 73–76.
- Habibah, N. A., Rahayu, S. E., & Anggraito, Y. U. 2021 *Kultur Jaringan Tumbuhan*. 1st edn. Edited by Mira Muarifah. Yogyakarta: CV. Budi Utama.
- Hapsoro, D., & Yusnita. 2018. *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik*. Yogyakarta: PT. ANDI.
- Harahap, F., dkk. 2019. *Kultur Jaringan Nanas*. Surabaya: Media Sahabat Cendekia.
- Lestari, Endang. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakan Tanaman Melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 7(01), 63-68. [https://doi: 10.21082/jbio.v7n1.2011](https://doi.org/10.21082/jbio.v7n1.2011).
- Mastuti, Retno. 2017. *Dasar-Dasar Kultur Jaringan Tumbuhan*. I. Edited by UB Press. Malang: UB. Press.
- Msogoya, T., dkk. 2012. Identification And Management of Microbial Contaminants of Banana In-vitro Cultures. *Journal of Applied Biosciences*, 55, 3987–3994.
- Pullaiah, T., Subba Rao, M., & Sreedevi, E. 2017. *Plant Tissue Culture (Theory and Practicals)*. 2nd edn. India: Scientific Publisher India.
- Putri, A., dkk. 2021. Teknik Kultur Jaringan Untuk Perbanyakan Dan Konservasi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Secara In-vitro. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 1(02), 69–76. [https://doi: 10.24252/filogeni.v1i2.23801](https://doi.org/10.24252/filogeni.v1i2.23801).

- Rahmat, A., dkk. 2023. *Pengantar Kultur Jaringan Tanaman*. I. Bandung: Widina Media Utama.
- Wahyuni, H., Wulandari, R. S., & Muflihati, M. 2020. Konsentrasi IAA (Indole Acetic Acid) Dan BAP (Benzyl Amino Purine) Pada Kultur Jaringan Ulin (*Eusideroxylon zwageri*). *Jurnal Hutan Lestari*, 7(04), 1660–1667. <https://doi:10.26418/jhl.v7i4.38399>.
- Widyastuti, N., & Deviyanti, J. 2018. *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik Perbanyakan Tanaman Secara In-vitro*. I. Yogyakarta: PT. Andy.
- Ziraluo, Y. 2021. Metode Perbanyakan Tanaman Ubi Jalar Ungu (*Ipomea batatas* Poirot) Dengan Teknik Kultur Jaringan Atau Stek Planlet. *Jurnal Inovasi Penelitian*, 2(03), 1037–1046.
- Zulkarnain. 2022. *Kultur Jaringan Tanaman Solusi Perbanyakan Tanaman Budidaya*. 6th edn. Jakarta: Bumi Aksara.

BAB 2

PRINSIP DASAR KULTUR JARINGAN

Oleh Mar'atus Sholihah

2.1 Definisi

Kultur jaringan merupakan salah satu metode yang dilakukan untuk memisahkan organ, jaringan maupun sel tanaman yang kemudian menumbuhkannya pada media kultur buatan yang kaya akan nutrisi dan hormon serta dalam kondisi aseptik (M, Oratmangun, Pandingana, E, & Kandou, 2017). Kultur jaringan tanaman juga dapat diartikan sebagai metode memperbanyak tanaman berbasis teknologi in-vitro yang bertujuan untuk mengembangbiakkan tanaman dari sel atau dari jaringan tanaman. Tujuannya adalah untuk menciptakan tanaman dengan proses perkembangbiakan yang cepat (M, Oratmangun, Pandingana, E, & Kandou, 2017).



Gambar 2.1. Kultur Jaringan Tumbuhan
Sumber: (Mega & Putri, 2022)

Kultur jaringan merupakan salah satu teknik budidaya yang sulit dipelajari, sebab di dalamnya terdapat beberapa cabang ilmu

pengetahuan lain yang harus dikuasai seperti fisiologi tumbuhan, morfologi tumbuhan, anatomi tumbuhan, genetika, dan teknik laboratorium. Kultur jaringan adalah ilmu pengetahuan yang berasal dari penerapan bidang ilmu lain (Harahap, et al., 2022).

Kultur jaringan tumbuhan (KJT) merupakan suatu cara untuk mengambil salah satu bagian tanaman seperti protoplas, sel, sekelompok sel, jaringan, dan organ yang kemudian ditumbuhkan pada lingkungan dan media kultur yang sesuai dan berada pada kondisi yang steril/aseptis. Berdasarkan definisi dari kultur jaringan tumbuhan, ada beberapa hal penting yang perlu menjadi perhatian, yaitu:

1. Komponen tanaman yang akan digunakan untuk kultur baik yang berasal dari sel maupun dari jaringan disebut eksplan. Eksplan bisa didapatkan melalui seluruh bagian tumbuhan seperti akar, batang, daun, polen, endosperm, mesofil, kotildeon dan hipokotil. Ukuran pengambilan eksplan yang relatif kecil tidak akan mengganggu keberadaannya, sehingga bagi tumbuhan langka hal tersebut sangat berarti untuk menjaga kelestariannya.
2. Kondisi lingkungan seperti temperatur, intensitas cahaya dan kelembaban ruang kultur serta medium buatan harus dikelola sesuai dengan kebutuhan pertumbuhan jaringan. Media kultur memiliki fungsi sebagai sumber tenaga bagi eksplan sekaligus mengandung senyawa garam anorganik untuk menyokong kebutuhan pertumbuhan suatu sel dan zat pengatur tumbuh seperti sitokinin serta auksin.

2.2 Prinsip Kultur Jaringan

Teori totipotensi merupakan salah satu prinsip dasar dari kultur jaringan. Teori totipotensi yaitu kemampuan dari sel untuk tumbuh jika ditempatkan pada kondisi yang sesuai. Prinsip yang kedua adalah aseptis, yang berarti bebas kontaminasi karena seluruh area kerja, peralatan serta eksplan harus dalam keadaan yang steril (Dewanti, 2018).

2.2.1 Totipotensi

Prinsip dasar dari kultur jaringan tanaman adalah teori totipotensi, yaitu suatu kemampuan dari sel atau jaringan tanaman untuk membentuk individu baru yang lengkap apabila diberikan kondisi yang tepat dan mendukung. Totipotensi menjadi dasar karena eksplan, merupakan potongan dari suatu jaringan atau sel yang berasal dari tanaman induk, dapat berkembang menjadi tanaman yang utuh (Ernita, et al., 2025)

Teori totipotensi pertama kali dicetuskan oleh Schleiden dan Schwann, yang menyampaikan bahwa setiap komponen hidup dari tanaman memiliki sifat autonom serta mempunyai totipotensi. Sel bersifat autonom artinya mampu mengatur metabolisme, proses tumbuh, dan berkembang apabila dipisahkan dari jaringan induknya. Totipotensi dapat didefinisikan sebagai keterampilan dari sel atau jaringan tumbuhan apabila dibudidayakan pada media kultur yang sesuai dan akan mengalami pertumbuhan dan berkembang menjadi suatu tanaman yang sempurna (Widyastuti & Deviyanti, 2018).

Sifat totipotensi merupakan kebutuhan esensial pada proses regenerasi tanaman secara in-vitro. Setiap sel pada suatu kondisi kultur in-vitro akan mampu mengekspresikan sifat totipotensinya. Kemampuan ini diwariskan dan akan tetap ada meskipun sel telah mengalami diferensiasi final. Sel yang telah terdiferensiasi dapat kembali menunjukkan sifat totipotensinya dengan mengalami dediferensiasi, yaitu perubahan morfologi dan sitologi sel dewasa menjadi muda yang aktif membelah yang lebih dahulu diikuti oleh rediferensiasi (Mastuti, 2017). Rediferensiasi adalah kemampuan sel yang telah matang (*mature*) kembali ke kondisi meristematik. Diferensiasi sel adalah transformasi dari suatu sel yang telah memperoleh ukuran maksimal sehingga menjadi terspesialisasi sebanding dengan fungsinya sehingga mampu memproduksi jenis jaringan, organ atau organisme baru. Proses suatu sel untuk melakukan perkembangan diawali dari suatu titik pertumbuhan baru yang diikuti oleh rediferensiasi sehingga dapat melakukan penyusunan kembali menjadi organ yang baru (Widyastuti & Deviyanti, 2018).

Kompetensi adalah kemampuan sel atau sekelompok sel dalam memberikan respon terhadap stimulus yang diinduksikan untuk suatu proses perkembangan. Status kompeten mewakili

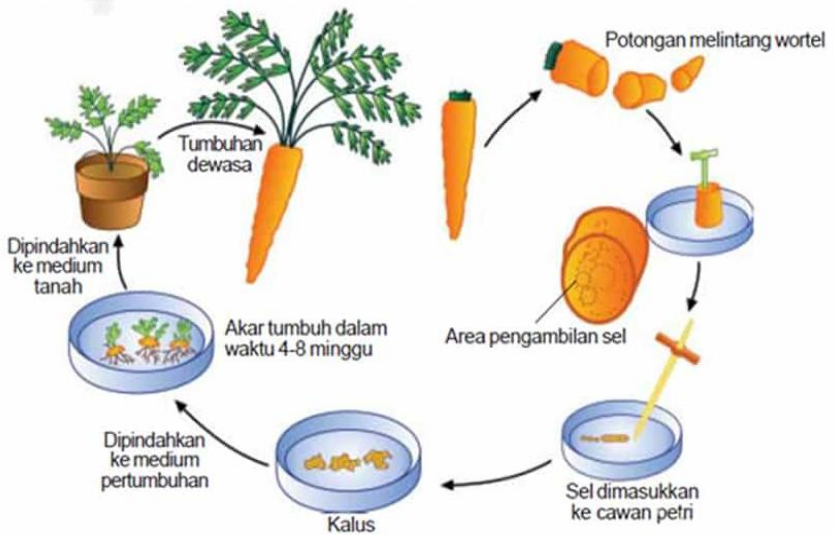
karakteristik genetik, epigenetik dan fisiologis yang unik dari sel yang merespon proses perkembangan tertentu. Suatu sel yang totipoten pada kondisi eksperimental tertentu yang induktif adalah mungkin menjadi tidak kompeten untuk mengekspresikan totipotensinya. Hal ini diduga disebabkan karena setelah kultur dipelihara pada kondisi terdediferensiasi pada periode yang lama, aberasi kromosom seringkali terjadi sehingga mengakibatkan sel tidak dapat mengekspresikan totipotensinya walaupun mampu berproliferasi (Widyastuti & Deviyanti, 2018)

Totipotensi sel terbentuk selama fase reproduksi seksual maupun aseksual, termasuk melalui pembentukan spora serta zygot. Zygot merupakan hasil dari peleburan dua gamet. Pada sejumlah organisme, sel yang telah terdiferensiasi bisa kembali menunjukkan sifat totipotensinya. Salah satu contoh, perkembangan manusia diawali apabila sebuah sperma membuahi sebuah sel telur sehingga menghasilkan sel yang bersifat totipotent yaitu zygot. Pada hari pertama setelah proses pembuahan, zygot membelah menjadi sel-sel identik yang mempertahankan sifat totipotensi. Sekitar empat hari setelah proses pembuahan, sel-sel ini akan mulai mengalami spesialisasi. Pada tumbuhan, kemampuan totipotensi dapat ditemukan pada sel meristem yang ada pada titik tumbuh.

Totipotensi sel mempunyai kemampuan total, yaitu mereka dapat berubah menjadi sel pluripotent. Sel pluripotent dapat menyebabkan banyak sel turunan tetapi tidak seluruhnya diperlukan untuk pembentukan organisme. Spesialisasi sel terjadi dari pluripotent menjadi sel multipotent yang berkembang untuk menjadi sel-sel yang memiliki fungsi tertentu. Contohnya, sel punca hematopoietik menjadi sel merah, putih dan sel-sel di dalam keping darah.

Lingkungan hidup sel dapat mempengaruhi kemampuan sifat totipotensi. Faktor-faktor seperti tekanan osmotik, hormon, nutrisi, atau sumber energi yang dipaparkan pada suatu sel dapat mengubah potensi sel menjadi memiliki banyak potensi (pluripoten), berbagai potensi (multipoten), atau tunggal potensi (unipoten). Sel pluripoten mempunyai keterampilan berubah yang luas, multipoten terbatas pada beberapa jenis sel, dan unipoten adalah bentuk dari sel yang telah terspesifikasi penuh (AAcial, 2022).

Sebagai contoh, sel yang diambil dari daun atau akar tanaman yang tidak dapat berkembang menjadi tanaman secara alami dapat ditumbuhkan dalam kondisi kultur jaringan yang sesuai, membentuk kalus, dan kemudian mengalami regenerasi menjadi tanaman baru. Oleh karena itu, kemampuan sel tanaman untuk mengembalikan sifat totipotensinya menjadikan kultur jaringan sebagai teknik yang sangat efektif untuk memperbanyak dan pemuliaan tanaman (Ernita, et al., 2025).



Gambar 2.2. Totipotensi
[sumber: (AAcial, 2022)]

2.2.2 Prinsip Budidaya Terkendali

Keberhasilan kultur jaringan tidak hanya ditentukan oleh adanya Sifat bahan yang totipotensi. Faktor lain yang harus diperhatikan yaitu keadaan media tempat tumbuh eskplan, lingkungan yang mempengaruhi seperti kelembapan, temperatur, dan cahaya serta terjaminnya sterilitas adalah hal wajib yang harus dikendalikan. Prinsip ini meliputi:

1. Keadaan media tempat tumbuh

Media kultur jaringan adalah media yang dipergunakan untuk menumbuhkan suatu sel, jaringan, ataupun eksplan sehingga dapat tumbuh dan melakukan perkembangan menjadi suatu tanaman yang baru. Media

kultur harus mempunyai kandungan nutrisi yang bisa digunakan untuk menyokong pertumbuhan dan perkembangan dari eksplan. Dengan demikian, kesuksesan proses pembiakan eksplan sangat dipengaruhi oleh jenis media yang dipergunakan. Kebutuhan nutrisi untuk jenis tanaman berbeda-beda, baik untuk bagian tanaman atau antar spesies tanaman. Secara harfiah media dari kultur mengandung zat pengatur tumbuh, media pematat (agar), unsur hara makro, unsur hara mikro, dan vitamin. Beberapa jenis jaringan seperti kalus bisa bertumbuh dengan baik melalui media kultur yang sederhana berupa media yang mengandung garam anorganik yang mudah larut (Ashar, et al., 2023).



Gambar 2.3. Media Kultur
Sumber: (Tamam, 2011)

2. Lingkungan yang mempengaruhi

Proses kultur jaringan harus dilakukan pada kondisi yang aseptis. Apabila terjadi kontaminasi, maka kultur akan beresiko mati atau mengalami kerusakan. Komponen kultur paling sensitif terhadap masuknya mikroba adalah media tumbuh dan eksplan. Mikroba dapat berkembangbiak dengan cepat dan akan menutupi area dari media kultur dan eksplan yang sudah ditanam. Selain itu, mikroba juga akan mengontaminasi eksplan dengan melalui luka yang ada akibat dari proses pemotongan pada saat sterilisasi sehingga dapat membuat jaringan eksplan mengalami kerusakan.

Eksplan yang telah terkontaminasi biasanya memperlihatkan gejala perubahan warna seperti krem, biru, ataupun putih yang timbul akibat serangan jamur atau bakteri. Oleh karena itu, kultur jaringan membutuhkan ketelitian yang sangat tinggi dan keadaan yang steril baik pada tempat kerja, peralatan, bahan kultur serta kebersihan pekerja. Kontaminasi mikroorganisme seperti bakteri dan jamur akan terlihat dalam bentuk koloni-koloni yang muncul di permukaan medium (M, Oratmangun, Pandingana, E, & Kandou, 2017).

3. Keharusan sterilisasi

Salah satu aspek penting dalam proses kultur jaringan adalah pencegahan terjadinya kontaminasi. Pada kultur jaringan tanaman, kontaminasi adalah adanya zat berbahaya yang dikenali dengan masuknya mikroba yang tidak diinginkan seperti bakteri dan jamur sehingga mengganggu jaringan tanaman yang sedang dikulturkan. Kontaminasi dari bakteri dan jamur dapat menjadi suatu penyebab kegagalan pada saat proses kultur jaringan. Oleh karena itu, diperlukan upaya pencegahan kontaminasi yang dilakukan dengan sebaik mungkin. Salah satu cara untuk mengantisipasi adanya kontaminasi pada saat melakukan kultur yaitu dengan menerapkan prinsip aseptik. Sebuah laboratorium yang digunakan untuk melakukan penelitian atau menumbuhkan kultur jaringan tanaman, sebaiknya menyediakan fasilitas dasar berupa:

- a. Ruang khusus untuk membasuh dan menempatkan alat-alat laboratorium yang steril.
- b. Ruang khusus untuk mempersiapkan alat, melakukan sterilisasi, serta menyimpan media kultur.



Gambar 2.4. Alat Sterilisasi Media Kultur

Sumber: (Sterilisasi Media Kultur (Difco), 2022)

- c. Ruang untuk melakukan manipulasi tanaman secara aseptik sehingga terhindar dari kontaminasi.
- d. Ruang pemeliharaan kultur dengan kondisi yang sesuai, seperti suhu, cahaya, dan kelembaban.



Gambar 2.5. Contoh tempat menyimpan kultur jaringan

[Sumber: (Andriansyah, 2013)]

- e. Ruang/fasilitas untuk mengamati perkembangan kultur (Ashar, et al., 2023).

DAFTAR PUSTAKA

- AAcial. (2022). *Pengertian Totipotensi: Kulltur Jaringan, Manfaat, Contoh*. Retrieved from AAcialsn: <https://aacialisn.com/pengertian-totipotensi-kultur-jaringan-manfaat-contoh-aacial/>
- Andriansyah. (2013, Juni 7). *Penataan Ruang Laboratorium Kultur Jaringan*. Retrieved from Detik Tani: <https://detiktani.blogspot.com/2013/06/penataan-ruang-laboratorium-kultur.html>
- Ashar, J. R., Farhanah, A., Hamzah, P., Ismayanti, R., Tuhuteru, S., Yusuf, R., Mardaleni. (2023). *Pengantar Kultur Jaringan Tanaman*. Bandung: Penerbit Widina Media Utama.
- Dewanti, P. (2018). *Teknik Kultur Jaringan Tanaman: Prinsip Umum dan Metode Aplikasi di Bidang Bioteknologi Pertanian*. Jember: UPT Percetakan & Penerbitan Universitas Jember.
- Ernita, M., Sembiring, E. R., Nurwendah, A. S., Abbas, S., Rahim, S., Irsyadi, M. B., Saraswati. (2025). *Bioteknologi Perlindungan Tanaman*. Padang: CV HB Publishing Indonesia.
- Harahap, F., Manungso, M. S., Harahap, S., Azzahra, Y. P., Suriani, C., Edi, S., Nusyirwan. (2022). *Buku Ajar Kultur Jaringan Berbasis Project Based Learning*. Pekanbaru: CV Angkasa Media Lestari.
- Oratmangun, M, K, Pandingana, D., E, F., & Kandou. (2017). Deskripsi Jenis-jenis Kontaminan Dari Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Jurnal Mipa Unsrat*, 47-52.
- Mastuti, R. (2017). *Dasar-Dasar Kultur Jaringan*. Malang: UB Press.
- Mega, B., & Putri, V. K. (2022, April 7). 3 Permasalahan Utama pada Kultur Jaringan Tanaman dan Solusinya. Indonesia.
- Nanlohy, F. N., Yalindua, A., & Kamagi, D. D. (2023). *Kultur Jaringan Tanaman*. Sleman: CV Bintang Semesta Media.
- Sterilisasi Media Kultur (Difco)*. (2022, Desember 7). Retrieved from Bluesky pharmacy: <http://blueskypharmacy.wordpress.com/2022/12/07/sterilisasi-media-kultur-difco/>
- Tamam, B. (2011, Agustus 15). *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Retrieved from Generasi Biologi: <https://generasibiologi.com/kultur-jaringan-tumbuhan/>

Widyastuti, N., & Deviyanti, J. (2018). *Kultur Jaringan- Teori dan Praktik Perbanyak Tanaman Secara In-Vitro*. Yogyakarta: Penerbit Andi.

BAB 3

FASILITAS LABORATORIUM KULTUR JARINGAN TANAMAN DAN PRINSIP STERILISASI

Oleh Nouke Lenda Mawikere

3.1 Pendahuluan Tentang Kultur Jaringan Tanaman

Kultur jaringan tanaman merupakan salah satu teknik bioteknologi modern yang sangat penting dalam bidang pertanian dan agroteknologi. Teknik ini memungkinkan perbanyakan tanaman secara cepat, seragam, dan bebas penyakit, dengan memanfaatkan kemampuan sel tanaman untuk tumbuh menjadi individu utuh melalui proses totipotensi (Karakas, 2023; Sharma, 2015; Laimer & Rucker, 2003).

Adanya pemahaman tentang totipotensi (total potensial genetik) menjadi awal terjadinya perkembangan kultur jaringan. Totipotensi adalah kemampuan sel tumbuhan yang hidup dan belum terdiferensiasi (biasanya sel meristematik atau sel parenkim muda) untuk berkembang menjadi tanaman utuh yang lengkap dengan akar, batang, daun, dan organ reproduksi (Karakas, 2023; George *et al.*, 2008; Thorpe, 2007).

Dalam teknik kultur jaringan, eksplan (potongan kecil jaringan tanaman) ditanam pada media nutrisi steril dan diberi hormon pertumbuhan (auksin dan sitokinin). Di bawah kondisi yang sesuai, sel-sel tersebut akan membelah aktif membentuk kalus (jaringan tidak terdiferensiasi). Kalus bisa diarahkan untuk pembentukan akar atau tunas (organogenesis) atau pembentukan embrio dari sel somatik (embriogenesis somatik). Selanjutnya akan terbentuk tanaman lengkap yang identik secara genetik dengan induknya (Desai *et al.*, 2022).

Kultur jaringan sangat berperan dalam pengembangan varietas unggul, pelestarian plasma nutfah, dan produksi bibit

tanaman dalam skala besar secara efisien (Anis & Ahmad, 2016; Bettoni *et al.*, 2024).

Keberhasilan kultur jaringan tanaman ini sangat ditentukan oleh jenis tanaman, media tanam, serta kondisi lingkungan yang digunakan. Selain itu keberhasilan kultur jaringan juga sangat bergantung pada fasilitas laboratorium yang memadai dan penerapan prinsip-prinsip sterilisasi yang ketat. Kultur jaringan bekerja dalam kondisi *in vitro*, yaitu di luar lingkungan alami, yang sangat rentan terhadap kontaminasi oleh mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. Kontaminasi sekecil apa pun dapat menyebabkan kegagalan kultur dan kerugian besar, terutama dalam produksi skala industri (Herman, 2017; Cassells, 2001). Oleh karena itu, penataan ruang laboratorium yang terpisah sesuai fungsi (seperti ruang persiapan media, ruang sterilisasi, ruang inokulasi, hingga ruang inkubasi) menjadi krusial untuk mencegah pencemaran silang. Setiap ruang harus dilengkapi dengan alat dan peralatan yang sesuai standar, seperti autoklaf, laminar air flow, oven, dan alat gelas steril.

Prosedur sterilisasi terhadap bahan tanam (eksplan), alat, media, serta lingkungan kerja perlu juga dilakukan dengan metode yang tepat dan efisien. Hal ini mencakup penggunaan panas, bahan kimia, filtrasi, atau radiasi sebagai metode sterilisasi yang disesuaikan dengan objek yang akan disterilkan (Wulandari *et al.*, 2022; Sivanesan *et al.*, 2021).

Dengan memahami hubungan antara fasilitas laboratorium, metode sterilisasi, dan prinsip kerja kultur jaringan, kita akan mampu merancang dan melaksanakan kegiatan kultur jaringan secara profesional dan sesuai dengan standar laboratorium yang baik (*Good Laboratory Practices*).

3.2 Fasilitas Laboratorium Kultur Jaringan

Laboratorium adalah tempat atau ruang yang dirancang dan dilengkapi dengan peralatan tertentu untuk melakukan kegiatan ilmiah, penelitian, percobaan, pengujian, atau praktik, terutama dalam bidang ilmu pengetahuan, teknologi, dan pendidikan. Depdiknas (2008) menyatakan bahwa laboratorium adalah tempat untuk melakukan kegiatan ilmiah secara sistematis, terkendali, dan terencana guna memperoleh data atau informasi ilmiah.

Laboratorium kultur jaringan harus memenuhi persyaratan tertentu agar proses kultur jaringan berjalan optimal dan bebas kontaminasi. Untuk itu laboratorium harus dilengkapi dengan fasilitas yang memadai dan sesuai, dengan penataan yang baik untuk menunjang kegiatan ilmiah yang akan dilakukan.

Penataan ruang dalam laboratorium kultur jaringan bertujuan untuk: 1) Menjaga kondisi aseptik (bebas kontaminasi), 2) Memisahkan aktivitas berdasarkan tahapan proses kultur jaringan, 3) Mencegah kontaminasi silang antar tahapan, dan 4) Meningkatkan efisiensi kerja dan kenyamanan operator.

Fasilitas laboratorium merujuk pada semua sarana dan prasarana yang mendukung pelaksanaan kegiatan di laboratorium. Fungsi fasilitas laboratorium dalam kultur jaringan adalah: 1) Menyediakan lingkungan steril agar eksplan bebas kontaminasi, 2) Menjamin keamanan dan efisiensi kerja, 3) Mendukung kegiatan penelitian, pengembangan, dan produksi tanaman, dan 4) Menyediakan ruang kerja terpisah agar tidak terjadi pencemaran silang antar tahap proses (media, inokulasi, inkubasi). Fasilitas laboratorium mencakup bangunan dan ruang, serta peralatan dan sarana penunjang.

1. Bangunan dan Ruang

Beberapa persyaratan untuk bangunan laboratorium, antara lain: 1) Terpisah dari aktivitas umum (misalnya dari kebun, hewan ternak, dll.), 2) Memiliki ventilasi yang baik, mudah dibersihkan, dan memiliki pencahayaan yang memadai, 3) Tahan terhadap kelembaban dan mudah disterilkan (lantai & dinding dari bahan halus seperti keramik atau epoxy), serta 4) Memiliki sistem listrik yang stabil (untuk autoklaf, laminar flow, inkubator, dll.).

Laboratorium kultur jaringan idealnya terdiri atas beberapa ruang dengan fungsi yang spesifik, seperti:

- a. Ruang persiapan media digunakan untuk menyiapkan dan mensterilkan media tanam.
- b. Ruang sterilisasi digunakan untuk sterilisasi alat, media, dan bahan tanaman.
- c. Ruang inokulasi (aseptik), merupakan ruang paling steril untuk melakukan pemotongan dan penanaman eksplan. Ruang ini harus bebas debu dan ventilasi terbatas, yang

dilengkapi dengan *Laminar Air Flow* (LAF) untuk menghindari kontaminasi.

- d. Ruang kultur atau inkubasi digunakan untuk menyimpan botol kultur dalam kondisi lingkungan terkendali. Kondisi ideal dari ruang ini adalah memiliki suhu 24–27°C, cahaya 16 jam terang /8 jam gelap (*photoperiod*), dan kelembaban $\pm$ 60–70%.
- e. Ruang pencucian alat digunakan khusus untuk membersihkan, membilas, dan menyiapkan kembali peralatan laboratorium (terutama alat gelas dan logam) sebelum disterilisasi dan digunakan ulang. Ruang ini termasuk kategori ruang kotor, sehingga harus dipisahkan dari ruang aseptik (seperti ruang inokulasi) untuk mencegah kontaminasi silang.
- f. Ruang aklimatisasi merupakan tempat atau area khusus yang digunakan untuk menyesuaikan tanaman hasil kultur jaringan (*plantlet*) dengan kondisi lingkungan eksternal (lingkungan non-steril), sebelum dipindahkan ke rumah kaca atau lapangan. Tanaman hasil kultur jaringan sebelumnya tumbuh di lingkungan *in vitro* yang steril, lembab, dan kaya nutrisi. Saat dikeluarkan dari botol atau tabung kultur, tanaman sangat rentan terhadap stres lingkungan, serangan patogen, serta fluktuasi suhu, cahaya, dan kelembaban. Oleh karena itu dibutuhkan fase transisi yang dilakukan di ruang aklimatisasi.

2. Peralatan dan Sarana Penunjang

Laboratorium harus dilengkapi dengan peralatan sesuai standar untuk kultur jaringan, yang meliputi:

- a. Peralatan utama, yaitu:
 - 1) Autoklaf (untuk sterilisasi media dan alat)
 - 2) *Laminar Air Flow Cabinet* (untuk inokulasi aseptik)
 - 3) Oven (sterilisasi kering)
 - 4) Timbangan analitik, pH meter
 - 5) Alat gelas: Erlenmeyer, tabung kultur, petri dish, dll.
 - 6)

- b. Perlengkapan penunjang, yaitu:
 - 1) Rak kultur/rak inkubasi
 - 2) Ruang penyimpanan media
 - 3) Sistem pencahayaan dan pengatur suhu
 - 4) Wastafel dan fasilitas sanitasi

Peralatan dan sarana penunjang yang terdapat dalam laboratorium kultur jaringan harus memenuhi persyaratan tertentu agar proses kultur jaringan berjalan optimal dan bebas kontaminasi. Secara umum, peralatan dan sarana penunjang dalam laboratorium kultur jaringan berdasarkan pembagian ruang yang spesifik dengan fungsinya masing-masing diuraikan sebagai berikut:

1. Peralatan dan sarana penunjang dalam ruang persiapan media, seperti:

a. Timbangan digital

Timbangan digital adalah alat esensial dalam ruang persiapan media kultur jaringan karena menjamin akurasi, presisi, dan konsistensi dalam menyiapkan media tanam steril yang sesuai kebutuhan eksplan. Fungsi timbangan digital dalam ruang persiapan media kultur jaringan tanaman sangat penting dan krusial karena berhubungan langsung dengan ketepatan dan konsistensi media yang digunakan untuk pertumbuhan eksplan. Berikut fungsi-fungsi utamanya: 1) Menimbang bahan kimia secara akurat; 2) Menjamin konsistensi media kultur; 3) Mendukung standarisasi laboratorium dalam hal validasi protokol laboratorium dan reproduksibilitas data eksperimen; dan 4) Efisiensi dan kemudahan penggunaan, karena cepat menunjukkan hasil, mudah dikalibrasi, dan minim kesalahan baca dibanding timbangan manual.

b. Hot plate /*magnetic stirrer*

Fungsi hot plate/*magnetic stirrer* dalam persiapan media kultur jaringan tanaman sangat penting untuk memastikan pencampuran bahan kimia secara merata dan efisien, serta mempercepat proses pelarutan.

Fungsi utama alat ini adalah: 1) Melarutkan bahan media; 2) Mencampur larutan secara homogen; serta 3) Memastikan media siap untuk proses sterilisasi dan penanaman eksplan.

c. pH meter

pH meter dalam persiapan media kultur jaringan tanaman sangat penting, karena pH media secara langsung mempengaruhi ketersediaan nutrisi, aktivitas enzim, dan pertumbuhan eksplan. Kesalahan dalam pengaturan pH dapat menyebabkan media tidak optimal, bahkan gagal mendukung pertumbuhan tanaman. Secara rinci, fungsi pH meter dalam kultur jaringan tanaman adalah: 1) Mengukur keasaman atau kebasaan media (5,6 – 5,8 tergantung jenis tanaman dan media); 2) Menyesuaikan pH media dengan tepat menggunakan NaOH (larutan basa) untuk menaikkan pH dan HCl (larutan asam) untuk menurunkan pH; 3) menjamin ketersediaan nutrisi dan ZPT, karena pH mempengaruhi kelarutan dan ketersediaan unsur hara seperti Fe, Mn, Zn, P, dan lain-lain (pH yang salah bisa membuat nutrisi mengendap atau tidak terserap oleh eksplan); dan 4) Menjamin reproduksibilitas eksperimen, karena dengan pH yang konsisten maka hasil kultur jaringan bisa diulang untuk mendapatkan hasil yang seragam.

d. Alat gelas (*beaker*, *erlenmeyer*, tabung reaksi)

Dalam persiapan media kultur jaringan tanaman, alat gelas seperti beaker (gelas kimia), erlenmeyer, dan tabung reaksi memiliki peran sangat penting untuk penakaran, pencampuran, sterilisasi, hingga kultur tanaman itu sendiri. *Beaker* (gelas kimia) berfungsi untuk menampung dan mencampur larutan media, serta memudahkan pemanasan di atas *hot plate/magnetic stirrer*. Bentuknya silinder dengan dasar datar dan bibir tuang, serta tersedia dalam berbagai ukuran (50 ml – 1000 ml).

Erlenmeyer Flask (Labu Erlenmeyer) berfungsi sebagai tempat mencampur dan menyimpan media yang sudah disiapkan, sering juga digunakan untuk menampung media yang akan disterilisasi dalam autoklaf, dan dapat digunakan untuk menumbuhkan kultur cair (suspensi) jika dibutuhkan. Bentuknya kerucut dengan leher sempit dan mudah ditutup dengan kapas/foil untuk menjaga sterilitas.

Tabung reaksi (*Test Tube*) berfungsi sebagai wadah media padat tempat eksplan ditanam, yang digunakan sebagai unit

kultur individual untuk setiap sampel tanaman. Bentuknya silinder kecil panjang, tersedia dalam berbagai ukuran (10 ml – 50 ml), dan dapat ditutup dengan kapas, aluminium foil, atau tutup plastik khusus.

e. Autoklaf (untuk sterilisasi media)

Fungsi autoklaf dalam persiapan media kultur jaringan tanaman sangat vital, karena berkaitan langsung dengan sterilisasi, yang merupakan proses penting untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme (bakteri, jamur, dll.) dalam media maupun alat yang digunakan. Secara rinci fungsinya adalah: 1) Mensterilkan media kultur (misalnya media MS) yang telah dicampur dan disesuaikan pH-nya dari semua bentuk mikroorganisme (termasuk spora), dengan tekanan ± 15 psi, suhu $\pm 121^\circ\text{C}$, dan durasi ± 15 –30 menit (tergantung volume); 2) Mensterilkan alat gelas dan peralatan kultur seperti tabung reaksi, *erlenmeyer*, pinset, dan scalpel (yang tahan panas); 3) Mensterilkan air dan larutan tambahan, seperti air suling (yang akan digunakan dalam media) dan larutan stok (jika tidak rusak oleh panas, seperti beberapa vitamin dan nutrisi); dan 4) Menjaga sterilitas selama proses kultur, karena dengan menggunakan media dan alat yang disterilkan dalam autoklaf maka kemungkinan kontaminasi saat penanaman eksplan dapat dikurangi secara signifikan.

f. Kompor/*microwave*

Dalam ruang persiapan media kultur jaringan tanaman, alat seperti kompor atau *microwave* memiliki fungsi penting sebagai alat bantu pemanasan dan pelarutan, terutama saat tidak tersedia *hot plate* atau untuk kebutuhan cepat. Secara rinci fungsi alat ini adalah: 1) Melarutkan agar (agen pemat) yang sulit larut dalam air biasa pada suhu ruang; 2) *Microwave* sangat efisien untuk pemanasan cepat larutan dengan volume kecil media (misalnya <250 ml), sedangkan kompor sering digunakan jika perlu memanaskan dalam wadah besar atau tidak ada *microwave*; 3) Mengurangi waktu persiapan atau mempercepat proses dibanding menunggu media larut dengan stirrer saja, serta efisien dalam laboratorium kecil atau saat hanya membuat media dalam

jumlah sedikit; dan 4) Pengganti *hot plate* (jika tidak tersedia) untuk memanaskan media sebelum autoklaf.

g. Botol kultur/tabung kultur

Dalam ruang persiapan media kultur jaringan tanaman, botol kultur dan tabung kultur berfungsi sebagai wadah utama media dan eksplan selama proses pertumbuhan aseptik di dalam laboratorium. Alat ini sangat penting untuk menyediakan lingkungan steril dan tertutup yang mendukung regenerasi tanaman. Secara rinci fungsi alat ini adalah: 1) Wadah penanaman eksplan, untuk menampung media steril (padat atau cair) dan menanam eksplan (bagian tanaman seperti tunas, daun, atau batang) dalam jangka waktu tertentu; 2) Menyediakan lingkungan tumbuh yang steril dalam pertumbuhan eksplan, sehingga alat ini dirancang bisa ditutup rapat (dengan kapas, aluminium foil, atau tutup khusus) untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme dari luar, dan tetap memungkinkan pertukaran gas (O_2/CO_2) dalam jumlah kecil agar eksplan tetap hidup; 3) Mengisolasi setiap kultur secara individual, dimana setiap botol/tabung digunakan untuk satu atau beberapa eksplan, tergantung jenis tanaman dan tujuan kultur sehingga memudahkan dalam identifikasi perlakuan berbeda pada setiap kultur, serta deteksi dan pengelolaan kontaminasi.

2. Peralatan dan sarana penunjang dalam ruang sterilisasi, seperti:

a. Autoklaf

Fungsinya untuk mensterilkan larutan media (MS, B5, WPM, dll.) yang telah dicampur dan disesuaikan pH-nya. Sterilisasi dilakukan pada suhu $121^\circ C$, tekanan 15 psi, dan waktu 15–30 menit, tergantung volume. Tujuannya adalah untuk membunuh semua mikroorganisme yang dapat merusak eksplan atau mengganggu pertumbuhan tanaman.

b. Oven ($160^\circ C$ – $180^\circ C$, 2 jam)

Oven dalam ruang sterilisasi laboratorium kultur jaringan tanaman berfungsi sebagai alat untuk sterilisasi kering atau

pengeringan bahan dan alat. Fungsinya berbeda dengan autoklaf yang menggunakan sterilisasi basah (uap panas bertekanan). Secara rinci fungsi alat ini adalah: 1) Sterilisasi kering untuk mensterilkan alat-alat yang tidak tahan air atau uap panas seperti alat logam kecil (pinset, gunting, pisau scalpel), kaca gelas yang tidak dapat dimasukkan autoklaf, dan alat-alat yang harus steril tanpa menggunakan kelembaban; 2) Pengeringan alat dan media setelah pencucian atau proses sterilisasi dan menghilangkan kelembaban yang dapat memicu pertumbuhan mikroorganisme; 3) Sterilisasi media padat yang sensitif terhadap uap, pada suhu tinggi (misal 160–180°C selama 1–2 jam); dan 4) Persiapan alat sebelum autoklaf, untuk mengeringkan alat setelah dicuci sebelum masuk ke autoklaf.

c. *Laminar air flow* (LAF)

Laminar air flow (LAF) atau *laminar flow cabinet* adalah alat utama di laboratorium kultur jaringan tanaman yang digunakan untuk menciptakan ruang kerja steril saat menangani eksplan dan media. Fungsi utamanya adalah melindungi bahan kultur dari kontaminasi mikroba selama proses inokulasi atau subkultur. Secara rinci fungsi alat ini adalah: 1) Menciptakan area kerja aseptik, karena LAF menghasilkan aliran udara bertekanan positif dan bersih yang disaring melalui HEPA filter (*High Efficiency Particulate Air*) yang mengalir secara horizontal atau vertikal dan menghalangi partikel/kontaminan dari lingkungan masuk ke area kerja; 2) Melindungi media dan eksplan dari kontaminasi udara, karena selama proses inokulasi, eksplan dan media harus dibuka dan LAF menjaga area tersebut tetap steril agar tidak terpapar bakteri atau jamur dari udara; 3) Mendukung prosedur inokulasi dan subkultur seperti penanaman eksplan ke media, pemotongan jaringan tanaman, dan pemindahan kultur ke media baru; dan 4) Melindungi sampel dari kontaminasi silang dengan menjaga aliran udara bersih yang konstan, karena LAF dapat mencegah debu, spora, dan mikroorganisme berpindah antar sampel saat pekerjaan berlangsung (Meyer, 1986).

d. Alkohol (70% dan 95%)

Alkohol (biasanya etanol 70%) merupakan salah satu bahan paling penting dalam ruang sterilisasi laboratorium kultur jaringan tanaman. Alkohol 70% lebih efektif daripada alkohol 100% karena air membantu membuka pori-pori membran mikroorganisme sehingga alkohol dapat masuk dan membunuh sel mikroba secara menyeluruh. Alkohol murni (100%) justru membuat protein mikroba menggumpal di permukaan dan bisa melindungi bagian dalamnya (Taghavi *et al.*, 2022; Kuswanto, 2019). Fungsi alkohol adalah sebagai agen disinfektan yang cepat, efektif, dan mudah digunakan untuk membunuh mikroorganisme di permukaan alat, bahan, dan tangan operator. Secara rinci fungsi alkohol adalah: 1) Mensterilkan permukaan tempat dan alat kerja seperti meja kerja (terutama di dalam *laminar air flow*), permukaan alat dan botol kultur, gagang pintu, alat timbangan, dll. dari bakteri, virus, jamur, dan spora yang mungkin menempel; 2) Mensterilkan alat sebelum digunakan, seperti pinset, gunting, pisau scalpel biasanya dicelupkan ke dalam alkohol sebelum digunakan; 3) Mensterilkan sarung tangan/tangan operator dengan cara menyemprot atau menyeka sarung tangan operator sebelum dan selama proses inokulasi; dan 4) Sterilisasi luar botol atau tabung kultur sebelum dimasukkan ke dalam *laminar air flow* untuk menghindari membawa kontaminan dari luar ke area kerja steril.

e. Lampu UV

Lampu UV (ultraviolet), khususnya UV-C (panjang gelombang sekitar 254 nm), berfungsi sebagai alat sterilisasi non-kontak di ruang sterilisasi laboratorium kultur jaringan tanaman. Lampu ini digunakan untuk membunuh mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan virus di udara serta permukaan alat dan ruang kerja. Secara rinci fungsi lampu UV adalah: 1) Mensterilkan ruang *Laminar Air Flow* (LAF) dengan membunuh mikroorganisme di udara dan permukaan meja LAF; 2) Mensterilkan alat dan wadah sebelum inokulasi; 3) Mensterilkan udara di dalam ruangan tertutup; dan 4) Meningkatkan efektivitas sterilisasi bersama alkohol, karena

setelah permukaan meja dilap dengan alkohol 70% maka penggunaan lampu UV akan memberikan lapisan tambahan sterilisasi melalui radiasi.

3. Peralatan dan sarana penunjang dalam ruang inokulasi, seperti:

a. Pinset, scalpel, cutter

Pinset, scalpel, dan cutter adalah alat penting dalam ruang inokulasi di laboratorium kultur jaringan tanaman. Ketiga alat ini digunakan untuk manipulasi eksplan secara aseptik. Ketiga alat ini digunakan untuk melakukan pemotongan, pemindahan, dan penanaman jaringan tanaman ke media kultur dengan kondisi steril, tanpa menyebabkan kontaminasi (Ikenganyia *et al.*, 2017). Pinset (*Forceps*) berfungsi untuk memegang, mengambil, dan memindahkan eksplan (jaringan tanaman) ke dan dari media kultur. Scalpel (Pisau Bedah) berfungsi untuk memotong jaringan tanaman (eksplan) dengan presisi, misalnya meruncingkan ujung batang dan memotong daun, tunas, atau akar kecil. Cutter (pisau cutter/*utility knife*) berfungsi untuk pemotongan kasar atau pemotongan awal sebelum disempurnakan dengan scalpel.

b. Alkohol 70%

Alkohol 70% (biasanya etanol atau isopropanol) adalah disinfektan utama yang digunakan dalam ruang inokulasi di laboratorium kultur jaringan tanaman. Fungsinya adalah untuk menjaga kondisi aseptik, yaitu bebas dari mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan virus, selama proses penanaman eksplan ke media kultur.

c. Spiritus burner atau bunsen

Fungsi spiritus burner atau *bunsen burner* dalam ruang inokulasi di laboratorium kultur jaringan tanaman sangat penting untuk menjaga kondisi steril dan aseptik selama proses inokulasi. Secara rinci fungsinya adalah: 1) Membuat zona steril di sekitar tempat kerja, karena api dari burner menciptakan aliran udara naik yang menghalangi masuknya

debu dan mikroorganisme ke area kerja; 2) Sterilisasi alat manipulasi menggunakan api burner sebelum dan sesudah digunakan untuk membakar mikroorganisme yang menempel pada alat agar tetap steril; 3) Sterilisasi ujung wadah atau tutup botol kultur dengan api burner sebelum memasukkan atau mengeluarkan eksplan untuk mencegah mikroba dari udara masuk ke media kultur; dan 4) Membantu proses aseptik secara umum, yaitu menjaga kebersihan ruang inokulasi dengan menciptakan lingkungan yang lebih steril untuk meminimalkan risiko kontaminasi selama pemindahan jaringan tanaman.

d. Tisu steril

Tissue steril (sering disebut juga *tissue paper steril* atau kain steril) dalam ruang inokulasi di laboratorium kultur jaringan berfungsi sebagai bahan pendukung untuk menjaga kebersihan dan sterilisasi selama proses inokulasi. Biasanya digunakan untuk membersihkan dan menyeka alat dan permukaan, serta menyerap tetesan alkohol atau cairan steril.

e. LAF dengan filter HEPA

Laminar Air Flow (LAF) dengan HEPA filter (*High-Efficiency Particulate Air filter*) adalah alat krusial dalam ruang inokulasi laboratorium kultur jaringan tanaman. Fungsinya adalah untuk menyediakan lingkungan kerja steril dan bebas kontaminasi saat memanipulasi eksplan atau media kultur.

4. Peralatan dan sarana penunjang dalam ruang inkubasi/kultur, seperti:

a. Rak kultur

Rak kultur dalam ruang inkubasi/kultur di laboratorium kultur jaringan tanaman berfungsi sebagai tempat penyimpanan dan inkubasi media kultur yang sudah diinokulasi dengan eksplan. Rak ini dirancang agar kondisi lingkungan mendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan secara optimal. Secara rinci fungsinya adalah: 1) Tempat menyusun botol/tabung kultur secara efisien dan dapat menampung ratusan botol kultur dalam satu ruang

inkubasi tanpa menumpuknya secara acak; 2) Mendukung pencahayaan yang merata karena biasanya dilengkapi lampu fluoresen atau LED di tiap tingkat rak, sehingga dipastikan eksplan menerima cahaya buatan yang cukup dan merata untuk fotosintesis (terutama untuk fase pertumbuhan tunas dan daun); 3) Menjaga sirkulasi udara dan suhu stabil karena dirancang agar udara dapat bersirkulasi di antara rak-rak, sehingga menjaga suhu dan kelembaban tetap konsisten (penting agar tidak terjadi pertumbuhan jamur atau stres pada tanaman akibat suhu tidak merata); dan 4) Memfasilitasi observasi dan pemantauan karena susunan rak yang terbuka dan bertingkat memudahkan peneliti atau teknisi untuk memantau perkembangan eksplan secara berkala, sehingga mempermudah tindakan jika ditemukan kontaminasi atau anomali pertumbuhan (Bhojwani & Razdan, 2004).

b. Lampu neon/LED putih

Lampu neon atau LED putih dalam ruang inkubasi/kultur di laboratorium kultur jaringan tanaman berfungsi untuk menyediakan cahaya buatan yang dibutuhkan oleh eksplan (jaringan tanaman) untuk proses fotosintesis, pertumbuhan, dan perkembangan selama tahap kultur *in vitro*. Secara rinci fungsinya yang disarikan dari Fan *et al.* (2022) dan Szewczyk-Taranek *et al.* (2017) adalah: 1) Mensimulasikan cahaya matahari untuk fotosintesis, karena eksplan yang sudah tumbuh daun atau tunas membutuhkan cahaya untuk berfotosintesis. Lampu neon atau LED putih memberikan spektrum cahaya yang mendekati sinar matahari (terutama dalam kisaran PAR– *Photosynthetically Active Radiation*); 2) Mendukung pertumbuhan tunas, daun, dan akar, karena cahaya buatan sangat penting selama fase multiplikasi (perbanyak tunas) dan fase regenerasi (pembentukan tanaman utuh). Intensitas dan durasi pencahayaan mempengaruhi kecepatan pertumbuhan tunas, jumlah tunas/daun yang muncul, dan aktivasi hormon dalam media (auxin-sitokinin); 3) Mengatur fotoperiode (lama penyinaran), karena lampu neon/LED bisa diatur durasi

nyalanya (fotoperiode) misalnya 16 jam terang : 8 jam gelap (16/8) untuk meniru siklus siang-malam alami. Fotoperiode yang tepat mempengaruhi sintesis klorofil, aktivasi metabolisme sekunder, dan perkembangan morfologi normal tanaman; dan 4) Menghindari ketergantungan pada cahaya alami, ruang kultur sering kali tertutup rapat tanpa akses cahaya matahari. Lampu neon atau LED putih memungkinkan kontrol penuh terhadap intensitas dan durasi pencahayaan menjadi lebih stabil dan efisien.

c. AC/pengatur suhu

AC (*Air Conditioner*) atau pengatur suhu dalam ruang inkubasi/kultur di laboratorium kultur jaringan tanaman memiliki peran vital dalam menciptakan kondisi lingkungan yang konsisten dan optimal untuk pertumbuhan eksplan (jaringan tanaman yang dikultur). Secara rinci fungsinya yang disarikan dari Bailey & Nicholson (1990); Bhojwani & Razdan (2004) adalah: 1) Menjaga suhu stabil (suhu ideal untuk kultur jaringan tanaman umumnya berkisar antara 22–27°C, tergantung jenis tanaman dan tahap pertumbuhannya), karena tanpa pengatur suhu eksplan bisa mengalami stres suhu yang berdampak negatif pada pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kontaminasi. AC membantu menghindari fluktuasi suhu harian akibat cuaca luar (terlalu panas atau dingin); 2) Mendukung proses metabolisme dan fotosintesis, karena suhu yang terlalu tinggi/rendah bisa memperlambat atau menghentikan pertumbuhan jaringan; 3) Mengontrol kelembaban secara tidak langsung, yang biasanya dijaga sekitar 50–70% dalam ruang kultur. Kelembaban yang terlalu tinggi bisa mendorong pertumbuhan jamur dan bakteri, sedangkan terlalu rendah bisa menyebabkan media cepat kering; dan 4) Meningkatkan keberhasilan kultur dengan menjaga suhu inkubasi optimal dan stabil.

5. Peralatan dan sarana penunjang dalam ruang aklimatisasi

a. *Greenhouse*/rumah kaca

Greenhouse (rumah kaca) adalah sebuah struktur bangunan yang dirancang khusus untuk menumbuhkan dan melindungi tanaman dengan mengendalikan kondisi lingkungan di dalamnya, seperti suhu, kelembaban, cahaya, dan sirkulasi udara. Dalam konteks kultur jaringan tanaman, *greenhouse* digunakan sebagai tempat aklimatisasi, yaitu tempat di mana tanaman hasil kultur jaringan dapat beradaptasi secara bertahap dari kondisi steril di laboratorium ke lingkungan luar yang lebih kompleks dan tidak steril. Secara rinci fungsi *greenhouse* atau rumah kaca dalam ruang aklimatisasi kultur jaringan tanaman menurut George *et al.* (2008) dan Pierik (1997), yaitu: 1) Mengontrol kondisi lingkungan, karena *greenhouse* memungkinkan pengaturan suhu, kelembaban, dan intensitas cahaya secara optimal sehingga tanaman hasil kultur jaringan dapat beradaptasi dengan lingkungan eksternal secara bertahap; 2) Melindungi tanaman dari stres lingkungan, karena rumah kaca melindungi tanaman dari perubahan cuaca ekstrem, serangan hama, dan patogen selama masa aklimatisasi yang merupakan fase rentan bagi tanaman; 3) Meningkatkan keberhasilan aklimatisasi, karena dengan lingkungan yang stabil dan terkontrol tanaman kultur jaringan dapat tumbuh lebih baik dan memperkuat sistem akar sebelum dipindahkan ke lapangan terbuka; dan 4) Mengurangi kehilangan air, karena *greenhouse* menjaga kelembaban udara sehingga tanaman tidak mudah mengalami dehidrasi saat transisi dari media kultur ke media tanah.

b. Tray semai

Fungsi tray semai dalam ruang aklimatisasi kultur jaringan tanaman sangat penting karena berkaitan langsung dengan proses adaptasi awal tanaman setelah keluar dari media kultur. Secara keseluruhan, tray semai berperan penting sebagai alat bantu dalam transisi planlet dari lingkungan steril ke lingkungan alami, dengan tetap menjaga kondisi yang terkontrol.

Berikut ini fungsi-fungsinya: 1) Media penanaman sementara, karena tray semai berfungsi sebagai wadah awal untuk menanam planlet (tanaman hasil kultur jaringan) sebelum dipindahkan ke lahan atau pot yang lebih besar; 2) Mempermudah pengaturan jarak tanam, karena dengan menggunakan tray semai penempatan planlet bisa diatur dengan jarak yang seragam sehingga mempermudah pengelolaan dan menghindari kompetisi antar tanaman; 3) Menyediakan drainase yang baik, karena tray semai biasanya memiliki lubang di bagian bawah yang membantu mencegah genangan air dan menjaga kelembaban media tanam agar tidak berlebihan, sehingga akar tidak membusuk; 4) Memudahkan pemantauan & pemeliharaan termasuk pertumbuhan akar, gejala stres, atau serangan penyakit; 5) Efisiensi ruang dan mobilitas, karena tray bisa disusun atau dipindahkan dengan mudah sehingga efisien dalam penggunaan ruang di dalam *greenhouse* dan mempermudah perawatan massal; dan 6) Menjaga kebersihan dan sterilisasi, karena tray semai mudah dibersihkan dan disterilkan yang penting untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme selama masa aklimatisasi awal.

c. Media tanam

Media tanam dalam aklimatisasi kultur jaringan tanaman adalah bahan atau campuran bahan yang digunakan sebagai tempat tumbuh planlet (tanaman hasil kultur jaringan) selama proses transisi dari lingkungan steril di laboratorium ke lingkungan alami atau luar ruangan. Media ini berfungsi sebagai penopang fisik dan penyedia kelembaban, aerasi, serta nutrisi awal untuk menunjang pertumbuhan akar dan adaptasi tanaman. Ciri-ciri media tanam yang baik untuk aklimatisasi adalah: 1) Steril atau bebas patogen untuk mencegah infeksi pada planlet yang masih lemah; 2) Mampu menyimpan air dengan baik tanpa menyebabkan genangan; 3) Memiliki porositas tinggi agar akar mendapatkan cukup oksigen; 4) Tekstur halus dan ringan sehingga memudahkan penetrasi akar muda; dan 5) Mudah diperoleh dan ramah lingkungan. Contoh media tanam yang sering digunakan

adalah sekam bakar, cocopeat, pasir, perlit, vermikulit, atau campuran lainnya tergantung jenis tanaman. Tujuan penggunaan media tanam dalam aklimatisasi adalah: 1) Menyediakan kondisi tumbuh yang mendekati lingkungan alami; 2) Membantu perkembangan sistem akar secara optimal, 3) Meminimalkan stres dan risiko kematian planlet, dan 4) Meningkatkan tingkat keberhasilan adaptasi tanaman sebelum dipindah ke lahan.

d. Sprayer

Sprayer (alat semprot) memiliki peran penting dalam ruang aklimatisasi karena digunakan untuk mengatur kelembaban dan menyemprotkan air atau larutan nutrisi pada planlet yang sedang beradaptasi dari kondisi steril ke lingkungan luar. Secara rinci fungsi sprayer adalah: 1) Menjaga kelembaban udara dan media tanam karena planlet hasil kultur jaringan masih lemah dan belum memiliki sistem akar yang sempurna, sehingga sangat rentan terhadap kekeringan; 2) Mengurangi stres transplantasi dengan menjaga kelembaban optimal, sprayer membantu planlet beradaptasi lebih mudah dan mengurangi stres fisiologis akibat perbedaan lingkungan dari kultur *in vitro* ke *eks vitro*; 3) Mendistribusikan larutan nutrisi atau ZPT pada media tanam atau planlet; 4) Meningkatkan tingkat kelangsungan hidup dengan lingkungan mikro yang tetap lembab dan sesuai kebutuhan tanaman, sprayer membantu meningkatkan persentase keberhasilan aklimatisasi dan mengurangi angka kematian planlet; dan 5) Mencuci daun dari debu atau jamur, karena pada kondisi lembab terkadang muncul kontaminasi jamur atau debu. Sprayer bisa digunakan untuk menyemprotkan larutan fungisida ringan atau air bersih untuk menjaga kebersihan tanaman.

Beberapa peralatan dan sarana penunjang di laboratorium kultur jaringan tanaman, ditampilkan dalam Gambar 4.1.



Gambar 3.1. Peralatan dan sarana penunjang yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman (Volk *et al.*, 2022)

3.3 Prinsip dan Metode Sterilisasi dalam Kultur Jaringan Tanaman

Sterilisasi bertujuan menghilangkan mikroorganisme (bakteri, jamur, dll.) agar tidak mengkontaminasi kultur. Tujuan utama sterilisasi adalah menghilangkan atau membunuh semua mikroorganisme yang mungkin ada pada eksplan (bagian tanaman yang dikultur), media kultur, alat dan bahan, serta ruangan kerja.

Sterilisasi sangat penting untuk dilakukan, karena kultur jaringan tanaaman harus dilakukan dalam kondisi aseptik (bebas mikroba). Adanya kontaminasi dapat menghentikan pertumbuhan kultur atau menyebabkan kegagalan total.

Prinsip dasar sterilisasi dalam kultur jaringan tanaman adalah menggunakan panas (basah/kering), bahan kimia, atau penyinaran untuk membunuh mikroorganisme, baik pada alat, media, bahan tanaman (eksplan), dan lingkungan kerja (terutama ruang inokulasi) (Wulandari *et al.*, 2022; Misra & Misra, 2012). Jenis sterilisasi, metode, serta obyek yang disterilkan ditampilkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Jenis sterilisasi, metode, serta obyek yang disterilkan

Jenis Sterilisasi	Metode	Objek yang Disterilkan	Keterangan
Panas Basah	Autoklaf (121°C, 15–30 menit, 15 psi)	Media kultur, alat gelas	Efektif membunuh spora
Panas Kering	Oven (160°C selama 2 jam)	Alat logam, alat gelas	Untuk benda tahan panas
Filtrasi	Filter membran 0.22 µm	Larutan yang tidak tahan panas (vitamin, hormon)	Sterilisasi tanpa panas
Bahan Kimia	Alkohol 70–95%, NaOCl (1–2%), HgCl ₂ (0.1%)	Eksplan, permukaan alat	Waktu perendaman disesuaikan dengan jenis eksplan
Radiasi UV	Lampu UV di LAF	Ruang inokulasi	Dinyalakan sebelum inokulasi (±15–30 menit)

Sterilisasi Eksplan (Bagian tanaman)

Eksplan adalah bagian tanaman yang akan dikultur (daun, tunas, akar, dll). Eksplan berasal dari lingkungan luar (lapangan, rumah kaca), sehingga sangat rentan terhadap kontaminasi mikroorganisme seperti bakteri dan jamur.

Tujuan dari sterilisasi eksplan adalah: 1) Menghilangkan mikroorganisme yang menempel di permukaan eksplan; 2) Mencegah kontaminasi selama proses kultur jaringan, dan 3)

Menjamin pertumbuhan aseptik (tanpa mikroba) dalam media kultur.

Prinsip dasar sterilisasi eksplan, yaitu menggunakan bahan kimia antimikroba (misal: alkohol, NaOCl, HgCl₂, H₂O₂). Lama perendaman dan konsentrasi disesuaikan dengan jenis eksplan (lunak, keras, berkayu, berdaun tipis, dll.) dan tingkat kontaminasi dari lingkungan asal tanaman. Bahan sterilisasi yang biasa digunakan dalam metode umum sterilisasi eksplan, disajikan pada Tabel 3.2 (Wulandari *et al.*, 2022; Misra & Misra, 2012; George *et al.*, 2008).

Tabel 3.2. Bahan yang digunakan dalam sterilisasi eksplan

Bahan Sterilisasi	Konsentrasi	Lama Perendaman	Keterangan
Alkohol 70%	70%	30 detik - 1 menit	Untuk sterilisasi awal permukaan
NaOCl (Bayclin)	10-20% (dari larutan komersial)	10-20 menit	Diberi penambahan surfaktan (misal: Tween-20) agar merata
HgCl ₂ (Merkuri klorida)	0,1-0,2%	5-10 menit	Efektif tapi toksik dan berbahaya bagi lingkungan
H ₂ O ₂ (Hidrogen peroksida)	3-10%	5-10 menit	Alternatif yang lebih ramah lingkungan

Contoh prosedur sterilisasi bahan tanaman (eksplan), sebagai berikut:

1. Cuci eksplan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran.
2. Rendam dalam larutan fungisida atau sabun antibakteri (±10 menit), lalu bilas.
3. Rendam dalam alkohol 70% selama 30 detik (jika perlu).
4. Sterilisasi utama menggunakan larutan NaOCl 1-2% (5-15 menit tergantung jenis eksplan).
5. Bilas eksplan dengan air steril (aqua dest steril) 3-5 kali.
6. Pindahkan ke LAF dan tanam pada media steril.

Sterilisasi Media Kultur

Media kultur adalah campuran nutrisi dan hormon tumbuh buatan yang digunakan untuk mendukung pertumbuhan eksplan (bagian tanaman) dalam kultur jaringan. Contohnya: media MS (Murashige & Skoog), B5, atau lainnya. Media kultur sangat kaya nutrisi (terutama gula), sehingga mudah terkontaminasi mikroorganisme (bakteri, jamur). Oleh karena itu, sterilisasi media adalah langkah penting.

Tujuan sterilisasi media kultur adalah: 1) Membunuh semua mikroorganisme (terutama spora jamur dan bakteri); 2) Menjaga media tetap steril sampai digunakan; dan 3) Mencegah kegagalan pertumbuhan kultur akibat kontaminasi.

Ada beberapa metode yang biasa digunakan, tergantung jenis bahan dalam media seperti:

1. Sterilisasi panas basah (autoklaf), merupakan metode yang paling umum. Prosedurnya dengan menggunakan autoklaf (alat seperti panci bertekanan tinggi) pada kondisi 121°C, 15 psi (1 atm), selama 15–20 menit. Metode ini cocok untuk media kultur lengkap yang tahan panas, seperti media MS + sukrosa + agar dan media dalam botol/tube kultur. Setelah sterilisasi, media harus didinginkan secara perlahan dan digunakan dalam ruang steril. Kelebihan dari metode ini adalah dapat membunuh semua mikroorganisme dan spora, serta efektif dan mudah dilakukan. Kekurangannya adalah tidak cocok untuk zat yang mudah rusak oleh panas (misal: vitamin, hormon tertentu, antibiotik).
2. Sterilisasi filter (filtrasi steril), digunakan untuk komponen yang tidak tahan panas (termolabil), seperti vitamin (thiamin, nicotinic acid, pyridoxine), hormon pertumbuhan (IAA, IBA, NAA, BAP, kinetin), dan antibiotik atau enzim. Prosedurnya yaitu dengan melarutkan bahan, lalu disaring menggunakan filter membran steril 0,22 µm. Selanjutnya ditambahkan larutan hasil filtrasi setelah media utama didinginkan (suhu < 50°C). Kelebihan dari metode ini adalah dapat menjaga stabilitas bahan sensitif panas dan digunakan secara luas dalam laboratorium mikrobiologi & kultur jaringan.

- c. Sterilisasi panas kering (oven), namun jarang digunakan untuk Media. Umumnya digunakan untuk alat, namun kadang digunakan untuk mengeringkan atau mensterilkan komponen padat (sebelum pelarutan), misalnya botol kultur kosong dan garam mineral dalam bentuk padat (jika diperlukan).

Sterilisasi Alat dan Wadah

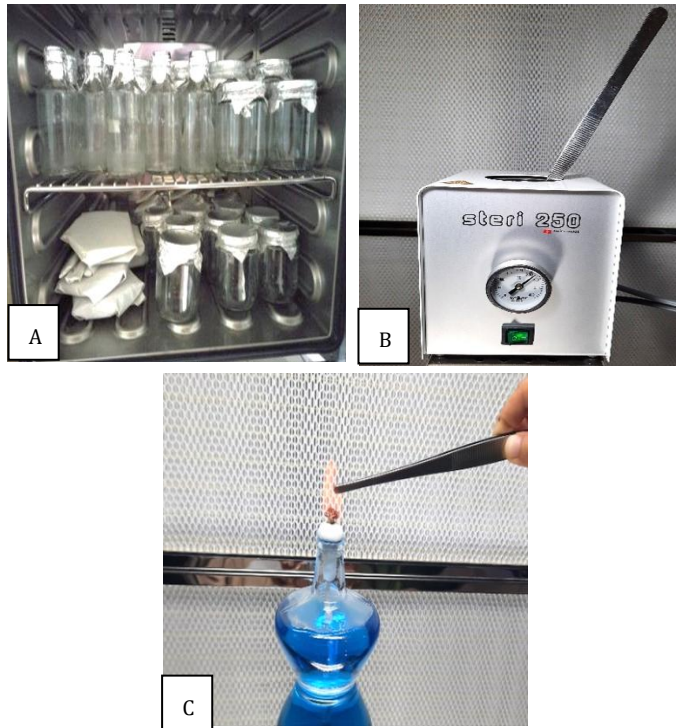
Semua alat dan wadah yang digunakan dalam kultur jaringan harus bebas mikroorganisme, agar proses kultur berlangsung dalam kondisi aseptik (bebas kontaminasi).

Tujuan sterilisasi alat dan wadah adalah: 1) Mencegah kontaminasi mikroorganisme yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan dan menyebabkan kegagalan kultur dan 2) Menjaga kondisi steril selama inokulasi dan kultur berlangsung.

Metode yang biasa digunakan untuk sterilisasi alat dan wadah adalah:

1. Autoklaf: untuk alat tahan panas (gelas kimia, pinset, scalpel).
2. *Flame sterilization*: membakar ujung alat logam dengan bunsen.
3. Ethanol 70%: untuk menyeka permukaan alat sebelum penggunaan.
4. UV sterilization: lampu UV dalam *laminar air flow* selama 15–30 menit sebelum kerja.

Beberapa metode sterilisasi peralatan dalam kultur jaringan tanaman ditampilkan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Beberapa metode sterilisasi peralatan dalam kultur jaringan: A) Menggunakan oven, B) Menggunakan *Glass Bead Sterilizer*, dan C) Menggunakan Api Bunsen (Wulandari *et al.*, 2021).

Sterilisasi Ruang Kerja (*Laminar Air Flow Cabinet*)

Laminar Air Flow Cabinet (LAFC) adalah alat laboratorium berbentuk meja kerja tertutup dengan sistem aliran udara steril satu arah (horizontal atau vertikal), yang digunakan untuk melakukan kegiatan aseptik seperti: Inokulasi eksplan ke media, pemindahan kultur, dan penambahan bahan steril. LAFC menjaga lingkungan kerja bebas dari kontaminasi selama proses berlangsung.

Tujuan sterilisasi ruang kerja (LAFC) adalah: 1) Mencegah masuknya mikroorganisme (bakteri, jamur, virus) dari udara atau permukaan alat; 2) Menjaga sterilitas media, eksplan, dan

alat selama manipulasi; dan 3) Mencegah kontaminasi silang antar kultur.

Metode sterilisasi yang digunakan, adalah: 1) Dibersihkan dengan alkohol 70%; 2) Dinyalakan lampu UV $\pm 15-30$ menit sebelum digunakan; dan 3) Aliran udara laminar harus menyala ± 15 menit sebelum digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anis, M., & Ahmad, N. 2016. *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Springer Singapore. ISBN: 978-981-10-1916-6.
- Bettoni, J.C., Wang, M.R., & Wang, Q.C. 2024. *In Vitro Regeneration, Micropropagation and Germplasm Conservation of Horticultural Plants*. *Horticulturae*, 10(1): 45. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010045>.
- Bhojwani, S.S., & Razdan, M.K. 2004. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, Revised Edition*. Elsevier.
- Cassells, A.C. 2001. *Contamination and Its Impact in Tissue Culture*. *Acta Horticulturae*, 560: IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding.
- Desai, P., Desai, S., & Patil, G.B. 2022. *Plant Tissue Culture: Somatic Embryogenesis and Organogenesis*. In: *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 109-130). Elsevier.
- Departemen Pendidikan Nasional. 2008. *Kamus Besar Bahasa Indonesia. Edisi ke-4*. Jakarta: Gramedia. ISBN 978-979-2238-41-9.
- Fan, C., Manivannan, A., Wei, H., et al. 2022. *Light Quality-Mediated Influence of Morphogenesis in Micropropagated Horticultural Crops: A Comprehensive Overview*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13):10706. DOI:10.3390/ijms241310706.
- George, E.F., Hall, M.A., & De Klerk, G.J. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Volume 1. The Background. Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-5005-3>.
- Herman, E.B. 2017. *Plant Tissue Culture Contamination: Challenges and Opportunities*. *Acta Horticulturae*, 1155.
- Ikenganyia, E.E., Anikwe, M.A.N., Omeje, T.E., & Adinde, J.O. 2017. *Plant Tissue Culture Regeneration and Aseptic Techniques*. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 1(3): 1-6.
- Karakas, I. 2023. *Using the Totipotency Abilities of Plants in Plant Breeding: Tissue Culture Techniques*. *Acta Natura et Scientia*,

- 4(2): 94-113. <https://doi.org/10.29329/actanatsci.2023.354.1>.
- Kuswanto, L. 2019. *Exploration of sterilization method and type of media for in vitro propagation of Bauhinia scandens*. Horticulture International Journal, 3(5): 261-264.
- Laimer, M., & Rucker, W. 2003. *Plant Tissue Culture: 100 Years Since Gottlieb Haberlandt*. Springer.
- Meyer, M.M.Jr. 1986. *Semiportable Laminar Flow Hood for Tissue Culture and Microscope Use for Research and Teaching*. HortScience, **21**(4): 1064-1065.
- Misra, A.N. & Misra, M. 2012. *Sterilisation Techniques in Plant Tissue Culture*. In Plant Tissue Culture: Totipotency to Transgenic (Bab), Agrobios, India.
- Sharma, D.P. 2015. *Plant Tissue Culture in Crop Improvement*. ISHS Acta Horticulturae, 1085, Article 51. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1085.51>.
- Sivanesan, I., Muthu, M., Gopal, J., Tasneem, S., Kim, D.H., & Oh, J.W. 2021. *A Fumigation-Based Surface Sterilization Approach for Plant Tissue Culture*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(5): 2282. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052282>.
- Szewczyk-Taranek, B., Pawłowska, B., Prokopiuk, B., & Żupnik, M. 2017. *Effectiveness of LED and fluorescent light on in vitro shoot proliferation of Staphylea pinnata*. Acta Horticulturae, 1155: 375-380.
- Taghavi, S., et al. (2022). *Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in in vitro cultures Melia azedarach L.* AMB Express, 12, Article 13. DOI:10.1186/s13568-022-01343-8
- Thorpe, T.A. 2007. *History of Plant Tissue Culture*. Molecular Biotechnology, 37: 169-180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>.
- Volk, G.M., Balunek, E., & Chen, K. (Eds.). 2022. *Training in plant genetic resources: Cryopreservation of clonal propagules*. Colorado State University. <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/>

Wulandari, S., Nisa, Y.S., Taryono, T., Indarti, S., & Sayekti, R.S. 2022. *Sterilisasi Peralatan dan Media Kultur Jaringan*. Agrotechnology Innovation (Agrinova), 4(2):16. <https://doi.org/10.22146/a.77010>.

BAB 4

MEDIA KULTUR JARINGAN

Oleh Putri Damayanti

4.1 Pendahuluan

Media merupakan salah satu aspek terpenting dalam keberhasilan kultur jaringan yang memiliki peran sebagai tempat tumbuh dan berkembangnya eksplan. Media kultur jaringan berfungsi sebagai sistem nutrisi buatan yang menyediakan unsur hara, sumber energi, vitamin, zat pengatur tumbuh, serta kondisi fisik kimia yang mendukung viabilitas jaringan. Oleh karena itu, pemahaman tentang media kultur jaringan media hal mendasar dalam studi maupun praktik kultur jaringan.

Secara umum, media kultur jaringan terdiri atas makro dan mikro nutrien, sumber karbon, vitamin, zat pengatur tumbuh (ZPT), serta agen pepadat seperti agar atau gelrite. Komponen-komponen ini dirancang untuk memenuhi kebutuhan metabolik tanaman secara *in vitro*. Peran media tidak hanya sekedar penyedia nutrisi, tetapi juga sebagai pengatur arah perkembangan jaringan, misalnya dalam induksi kalus, organogenesis, embriogenesis somatik, hingga pembentukan akar atau tunas baru. Kombinasi zat pengatur tumbuh tertentu, seperti auksin dan sitokinin, bahkan dapat menentukan jalannya proses diferensiasi jaringan.

Dalam menentukan formulasi media kultur jaringan perlu memperhatikan keseimbangan nutrien, pH, kondisi osmotik, hingga faktor fisik seperti kekuatan gel dan aerasi. Misalnya rasio ion amonium dan nitrat akan mempengaruhi stabilitas pH serta respon fisiologi eksplan. Selain itu, keberhasilan kultur juga sangat dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti jenis eksplan, umur fisiologi jaringan, genotipe tanaman, serta kondisi lingkungan kultur. Dengan demikian pemilihan media harus disesuaikan dengan tujuan kultur dan karakteristik spesifik tanaman yang digunakan menjadi eksplan.

Berbagai formulasi telah dikembangkan, mulai dari media dasar seperti White, Gamborg (B5), Nitch & Nitch, hingga media yang

paling populer yaitu Murashige dan Skoog (MS). Setiap formulasi memiliki ciri khusus dalam komposisi nutrisi dan kandungan zat pengatur tumbuh. Seiring dengan perkembangan ilmu, media kultur jaringan tidak hanya terbatas pada formulasi standar, melainkan juga mengalami modifikasi untuk tujuan khusus, seperti media untuk suspensi sel, produksi metabolit sekunder, atau penggunaan hormon alami seperti air kelapa dan ekstrak pisang.

4.2 Komponen Media Kultur

Media kultur jaringan terdiri atas berbagai komponen yang dirancang untuk memenuhi nutrisi, energi, dan regulasi pertumbuhan jaringan tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro*. Setiap komponen memiliki fungsi spesifik dan keseimbangan antar tiap unsurnya sangat menentukan keberhasilan kultur. Selain menyediakan nutrisi dasar, media kultur juga berperan sebagai sistem pendukung fisiologis yang kompleks. Keberhasilan suatu kultur tidak hanya ditentukan oleh ketersediaan unsur hara, tetapi juga oleh faktor interaksi antara nutrisi, zat pengatur tumbuh, serta kondisi fisik media seperti konsentrasi agar dan pH. Berikut kita akan membahas komponen yang terkandung dalam media kultur.

4.2.1 Makronutrien

Makronutrien adalah unsur hara utama yang diperlukan tanaman dalam jumlah relatif besar untuk mendukung proses pertumbuhan *in vitro*, termasuk sintesis protein, pembelahan sel, serta metabolisme energi. Dalam media kultur jaringan makronutrien umumnya disuplai dalam bentuk senyawa anorganik yang mudah larut dan dapat diserap oleh jaringan tanaman, mencakup nitrogen (N), fosfor (P), kalium (K), kalsium (Ca), magnesium (Mg), dan sulfur (S). Semua komponen ini terlibat dalam berbagai fungsi fisiologis dan struktur penting tanaman.

Nitrogen (N) merupakan unsur hara makro yang esensial dan memiliki peranan untuk memacu pertumbuhan tanaman secara umum terutama pada fase vegetatif, berperan dalam pembentukan klorofil, asam nukleat dan protein. Dalam media kultur jaringan, nitrogen biasanya diberikan dalam bentuk ion nitrat (NO_3^-) ion amonium (NH_4^+). Kedua ion ini saling melengkapi, sehingga

keseimbangan antara NO_3^- dan NH_4^+ sangat penting. Rasio yang terlalu tinggi pada amonium dapat menyebabkan penurunan pH media selama inkubasi karena pelepasan ion H^+ , sehingga akan menghambat penyerapan nutrisi dan pertumbuhan eksplan. Sebaliknya, dominasi nitrat tanpa suplai amonium sering kali menghasilkan pertumbuhan yang lambat karena nitrat harus direduksi terlebih dahulu sebelum digunakan tanaman (Iswiyanto *et al.*, 2022).

Fosfor (F) merupakan salah satu unsur makro esensial yang sangat penting dalam mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Dalam media kultur jaringan fosfor berperan dalam kelangsungan proses pembelahan sel, pembentukan jaringan baru, dan mengatur respon morfogenesis tanaman *in vitro*. Fosfor umumnya diberikan dalam bentuk garam fosfat anorganik yang mudah larut, misalnya K_2HPO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, atau NaH_2PO_4 . Suplai fosfor yang cukup dapat mengoptimalkan jalur metabolik, mendukung biomassa dan meningkatkan efisiensi fotosintesis ketika eksplan sudah mampu mengembangkan jaringan autotrof.

Kalium (K) unsur hara makro yang terlibat dalam berbagai proses fisiologis tanaman. Fungsi utama kalium sebagai ion pengatur yang mengendalikan keseimbangan osmotik, aktivitas enzim serta transportasi ion dalam sel. Kalium umumnya disuplai melalui garam-garam anorganik seperti KNO_3 , KH_2PO_4 , atau K_2SO_4 . Konsentrasi kalium yang tepat membantu menjaga tekanan turgor sel dan berperan dalam aktivasi jenis sel, termasuk enzim yang mengatur sintesis protein dan metabolisme karbohidrat. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ketersediaan kalium dalam jumlah cukup dapat meningkatkan pembentukan akar dan multiplikasi tunas pada berbagai spesies tanaman. Sebaliknya, defisiensi kalium pada media kultur jaringan dapat menyebabkan gejala pertumbuhan abnormal, seperti kalus berwarna pucat, penurunan laju pembelahan sel dan terganggunya regulasi pH sitoplasma (Liu *et al.*, 2024).

Kalsium (Ca), Magnesium (Mg), dan Sulfur (S) merupakan unsur-unsur yang esensial dalam pertumbuhan tanaman. Kalsium (Ca) berperan ganda dalam pertumbuhan jaringan. Secara struktural, Ca^{2+} berfungsi dalam mengikat pektin pada dinding sel sehingga memperkuat jaringan dan stabilitas dinding primer. Dalam media kultur jaringan, sumber kalsium berupa $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ atau

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Magnesium (Mg) berperan langsung dalam proses fotosintesis karena menjadi inti molekul klorofil. Mg sangat penting untuk menjaga pembentukan klorofil dan stabilitas ribosom sehingga eksplan dapat tumbuh dengan warna hijau sehat dan fotosintesis optimal (Ishfaq *et al.*, 2022). Sedangkan untuk unsur sulfur (S) memiliki fungsi sebagai komponen penyusun asam amino seperti sistein dan metionin dan serta senyawa antioksidan seperti glutathione. Kekurangan Sulfur dapat menyebabkan pertumbuhan eksplan menjadi terhambat, ukuran daun mengecil serta berkurangnya kemampuan tanaman dalam menghadapi stres.

4.2.2 Mikronutrien

Mikronutrien adalah unsur hara yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang relatif kecil, namun memiliki peran esensial dalam menunjang berbagai proses fisiologi dan biokimia. Meskipun dalam jumlah kecil, keberadaan mikronutrien sangat menentukan keberhasilan pertumbuhan jaringan tanaman secara *in vitro*. Kekurangan salah satu mikronutrien dapat menghambat pertumbuhan, menimbulkan kelainan morfologi, bahkan menyebabkan kegagalan regenerasi eksplan. Sebaliknya, kelebihan mikronutrien dalam media juga berpotensi menimbulkan toksisitas yang merugikan eksplan. Mikronutrien yang paling umum digunakan dalam media kultur jaringan meliputi besi (Fe), mangan (Mn), seng (Zn), tembaga (Cu), boron (B), Molibdenum (Mo). Beberapa formula media juga menambahkan kobalt (Co), iodine (I) atau Nikel (Ni) dalam jumlah yang sangat kecil untuk mendukung fungsi metabolik tertentu.

Besi (Fe) merupakan unsur hara mikronutrien yang berperan dalam berbagai proses fisiologis, seperti sintesis klorofil, respirasi seluler, dan sistem transfer elektron pada fotosintesis. Selain itu, besi juga merupakan komponen utama dari berbagai enzim, seperti sitokrom, ferredoksin dan peroksidase yang terlibat dalam reaksi oksidasi-reduksi. Pemberian besi pada media kultur jaringan diberikan dalam bentuk kelat, seperti Fe-EDTA atau Fe-DTPA. Penelitian terbaru menegaskan bahwa penambahan besi pada media kultur jaringan memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan dan regenerasi tanaman (Ullah *et al.*, 2024).

Mangan (Mn) berperan dalam proses fisiologis tanaman sebagai kofaktor bagi berbagai enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat, asam amino dan asam lemak. Peran yang paling vital adalah pada fotosintesis dalam proses fotolisis air dan pelepasan oksigen. Penambahan mangan dalam media kultur biasanya dalam bentuk $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Konsentrasi mangan yang seimbang mendukung pertumbuhan normal, sementara defisiensi dapat menyebabkan klorosis antar tulang daun, pertumbuhan terhambat, dan penurunan fotosintesis. Sebaliknya kelebihan mangan menimbulkan toksisitas yang ditandai dengan bercak nekrotik pada jaringan (Messant *et al.*, 2023).

Seng (Zn) dalam media kultur dapat mendukung pembelahan sel, elongasi, serta diferensiasi jaringan. Selain itu, seng juga berperan dalam sintesis auksin yang merupakan hormon yang mengatur pertumbuhan dan morfogenesis tanaman. Pemberian seng dalam media kultur diberikan dalam bentuk $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dengan jumlah yang sedikit. Kekurangan seng dapat menghambat pembentukan daun baru, ukuran daun yang lebih kecil serta pertumbuhan kerdil pada tanaman hasil kultur.

Tembaga (Cu), boron (B) dan molibdenum (Mo) merupakan mikronutrien esensial yang dibutuhkan dalam media kultur. Tembaga berfungsi sebagai kofaktor enzim oksidase dan plastosianin yang berperan dalam redoks, pembentukan dinding sel serta lignifikasi. Namun jika kelebihan Cu dapat menimbulkan toksisitas dan stres oksidatif. Boron (B) memiliki peran penting pada tahap pembentukan kalus dan diferensiasi organ. Kekurangan boron dapat menyebabkan jaringan rapuh, pertumbuhan tunas terhambat dan terjadinya nekrosis pada titik tumbuh. Sementara itu, molibdenum (Mo) dalam media kultur berperan dalam metabolisme nitrogen yang memungkinkan tanaman mengasimilasi nitrat menjadi bentuk amonia yang lebih mudah digunakan dalam sintesis asam amino dan protein. Secara keseluruhan Cu, B dan Mn harus tersedia dalam jumlah yang seimbang pada media kultur jaringan karena meskipun dibutuhkan dalam kadar yang rendah, namun peranannya bersifat vital untuk kelangsungan pertumbuhan *in vitro* (Pasternak and Steinmacher, 2024)

4.2.3 Sumber Karbon

Sukrosa merupakan sumber karbon yang paling umum digunakan dalam berbagai formula media kultur jaringan, seperti pada media Murashige and Skoog (MS) karena mudah diperoleh, larut dan dimetabolisme secara efisien oleh jaringan tumbuhan. Sumber karbon pada media kultur jaringan merupakan komponen yang esensial karena jaringan tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* memiliki keterbatasan dalam melakukan fotosintesis secara optimal sehingga eksplan sangat bergantung pada suplai karbon eksternal.

Selain sukrosa, beberapa karbohidrat lain seperti glukosa, fruktosa, maltosa, dan manitol juga digunakan dengan tujuan tertentu, misalnya untuk mendukung pertumbuhan spesifik, mengurangi stres osmotik, atau meningkatkan produksi metabolit sekunder. Konsentrasi sumber karbon yang digunakan sangat memengaruhi respon eksplan, konsentrasi rendah dapat menimbulkan stres osmotik atau menghambat diferensiasi jaringan. Oleh karena itu, pemilihan jenis dan jumlah sumber karbon harus disesuaikan dengan tujuan kultur, spesies tanaman, serta tahapan pertumbuhan *in vitro* yang diinginkan (Bait *et al.*, 2024).

4.2.4 Vitamin

Vitamin merupakan komponen dalam media kultur jaringan yang berperan sebagai koenzim atau prekursor koenzim dalam berbagai reaksi biokimia seluler. Meskipun dibutuhkan dalam jumlah relatif kecil, vitamin memiliki fungsi penting dalam kelancaran metabolisme sel, sintesis asam amino, asam nukleat, serta senyawa penting lainnya yang menunjang pertumbuhan dan diferensiasi jaringan tanaman. Pada umumnya, jaringan tanaman mampu mensintesis vitamin secara alami, namun dalam kondisi kultur *in vitro* sehingga sering kali kemampuan tersebut berkurang akibat keterbatasan lingkungan sehingga penambahan vitamin ke dalam media sangat diperlukan.

Vitamin yang paling umum digunakan dalam media kultur jaringan adalah tiamin (B1), piridoksin (B6), Myo-Inositol (B8) dan asam nikotinat (B3). Tiamin berperan sebagai koenzim pada siklus kreb yang sangat penting dalam menyediakan energi. Piridoksin berfungsi dalam metabolisme asam amino sehingga dapat

mensintesis protein yang diperlukan untuk pembelahan dan diferensiasi sel. Myo-Inositol memiliki fungsi untuk memperbaiki pertumbuhan dan morfogenesis. Kemudian asam nikotinat sebagai prekursor $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$, berperan dalam transfer elektron dari respirasi sel (Sudheer *et al.*, 2022). Kombinasi jenis dan konsentrasi vitamin dalam media sangat menentukan keberhasilan kultur jaringan. Variasi kebutuhan vitamin dipengaruhi oleh jenis tanaman, jenis eksplan, serta tujuan kultur seperti induksi kalus, organogenesis, atau embriogenesis somatik.

4.2.5 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan komponen krusial dalam media kultur karena berfungsi mengendalikan berbagai proses fisiologis dan morfogenetik tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro*. Berbeda dengan nutrisi lain dan vitamin yang lebih berperan dalam mendukung metabolisme dasar sel, ZPT secara langsung memengaruhi arah perkembangan jaringan, mulai dari pembelahan sel, pembentukan kalus, hingga diferensiasi organ seperti akar dan tunas. Efektivitas ZPT dalam media sangat ditentukan oleh jenis, konsentrasi serta rasio antar hormon. Secara garis besar ZPT terdiri atas auksin, sitokinin, asam absisat dan etilen.

Auksin merupakan kelompok hormon yang berperan dalam merangsang pembelahan sel, pemanjangan sel, dan pembentukan akar. Auksin umum digunakan untuk induksi kalus dan organogenesis akar. Jenis hormon auksin sintetik yang sering digunakan adalah NAA, 2,4-D dan IBA. Sitokinin berfungsi dalam mendorong pembelahan sel dan pembentukan tunas, serta paling sering digunakan bersama auksin untuk mengatur morfogenesis. Misalnya, rasio auksin tinggi terhadap sitokinin cenderung menginduksi pembentukan akar, sedangkan rasio sitokinin lebih tinggi memicu pembentukan tunas, sementara keseimbangan keduanya akan menghasilkan kalus. Sitokinin yang biasa digunakan adalah kinetin, zeatin, BAP dan Thidiazuron (Setiawati *et al.*, 2020).

Giberelin berperan dalam pemanjangan batang, pembentukan daun, serta memecah dormansi biji atau embrio somatik. Sedangkan untuk etilen yang dikenal dengan hormon gas dapat memengaruhi pembelahan sel, penuaan jaringan hingga proses morfogenesis tertentu dalam kondisi *in vitro*. Respon eksplan terhadap masing-

masing ZPT bersifat spesifik tergantung pada jenis tanaman, kondisi fisiologis jaringan, serta interaksi dengan komponen media lainnya. Sehingga penentuan jenis dan kombinasi ZPT yang tepat merupakan salah satu aspek paling penting dalam perancangan media kultur jaringan.

4.2.6 Agen pematat

Agen pematat merupakan komponen dalam formulasi media kultur jaringan yang menyediakan dukungan fisik bagi eksplan, memfasilitasi pertukaran gas, menjaga kelembapan, dan menahan media agar tidak terlalu encer sehingga nutrisi dan zat pengatur tumbuh tetap ada disekitar jaringan tanaman. Pematat memberikan fase semi-padat atau padat pada media, memungkinkan eksplan berdiri atau menempel, serta meminimalkan risiko kontaminasi dan vitrifikasi akibat kelebihan air.

Jenis pematat yang sering digunakan pada media kultur seperti agar, gelrite, phytigel serta guar gum. Agar banyak digunakan karena harganya yang relatif terjangkau, kestabilannya terhadap suhu inkubasi, tidak dicerna oleh enzim tanaman, tidak bereaksi dengan persenyawaan penyusun media dan kemampuannya dalam membentuk gel yang kuat (Mohamed *et al.*, 2021). Konsentrasi agen pematat sangat memengaruhi hasil kultur jaringan. Media dengan pematat terlalu konsisten atau keras bisa menghambat pertumbuhan akar atau tunas karena keterbatasan difusi air dan nutrisi. Sebaliknya jika pematat terlalu rendah dapat menyebabkan media menjadi terlalu lembek, meningkatkan risiko vitrifikasi dan pertumbuhan abnormal karena kelembapan berlebih. Selain itu, pematat dapat memengaruhi ketersediaan beberapa unsur hara mikro dan makro melalui ikatan fisik atau absorpsi. Pemilihan jenis dan konsentrasi agen pematat harus disesuaikan dengan spesies tanaman, tahap kultur misalnya induksi kalus, multiplikasi tunas, pengakaran, serta tujuan akhir seperti regenerasi sempurna atau produksi massal tanaman (Choi *et al.*, 2024)

4.2.7 pH media

pH media merupakan salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan kultur jaringan, karena pH menentukan ketersediaan ion nutrisi, stabilitas senyawa organik, serta aktivitas enzim didalam

sel tanaman. Secara umum, pH media kultur diatur pada kisaran 5,6-5,8 sebelum proses sterilisasi. Pada rentang ini, sebagian unsur hara dapat berada dalam bentuk larut dan mudah diserap eksplan. Apabila pH terlalu rendah, beberapa ion seperti fosfat atau nitrat dapat mengalami presipitasi, sedangkan bila terlalu tinggi dapat menyebabkan penurunan kelarutan ion mikro seperti besi dan mangan yang dapat menghambat pertumbuhan. Stabilitas pH sangat penting karena fluktuasi yang besar dapat menyebabkan stres fisiologis pada jaringan, memengaruhi proses morfogenesis, multiplikasi tunas maupun organogenesis dan embriogenesis (Pasternak and Steinmacher, 2024).

4.2.8 Arang Aktif

Arang aktif (*activated charcoal*) merupakan salah satu bahan tambahan yang memiliki fungsi sebagai adsorben kuat untuk berbagai senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan jaringan. Arang aktif mampu mengikat senyawa fenolik yang dilepaskan oleh eksplan akibat stres luka atau kondisi kultur yang kurang optimal. Senyawa fenolik yang menumpuk dapat mengalami oksidasi dan menghasilkan pigmen berwarna coklat atau hitam yang bersifat toksik, sehingga menghambat pertumbuhan dan menyebabkan kematian jaringan sehingga arang aktif sering digunakan untuk mengurangi pencoklatan (*browning*) pada kultur tanaman. Arang aktif juga berperan dalam meningkatkan morfogenesis terutama dalam pembentukan akar. Hal ini terkait dengan kemampuan arang mengurangi cahaya dalam media dan menciptakan kondisi lebih gelap yang menyerupai lingkungan alami akar didalam tanah. Pada beberapa spesies penambahan arang aktif terbukti meningkatkan regenerasi tunas, diferensiasi akar, serta kualitas planlet yang dihasilkan (Wasiati *et al.*, 2021)

4.3 Jenis-jenis media

Berbagai jenis media telah banyak dikembangkan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi tanaman dalam kultur jaringan. Media-media ini pada umumnya memiliki formula yang berbeda-beda, baik dalam hal komposisi garam mineral, vitamin, maupun zat tambahan lain, sehingga penggunaannya sangat bergantung pada spesies

tanaman dan tujuan kultur. Selain itu, banyak peneliti yang memodifikasi konsentrasi nutrien, vitamin, maupun zat pengatur tumbuh dari media agar sesuai dengan kebutuhan fisiologis spesifik tanaman yang dikultur. Media yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah *Murashige and skoog* (MS), *Gamborg* (B5), *White, Nitch & Nitch*, *Vacin & went*, dan WPM.

4.3.1 *Murashige and skoog* (MS)

Murashige and Skoog (MS) merupakan media kultur jaringan yang paling banyak digunakan di laboratorium tanaman di seluruh dunia. Pertama kali diformulasi oleh Murashige dan Skoog pada tahun 1962 untuk mendukung pertumbuhan jaringan tembakau, kemudian media MS menjadi dasar dari berbagai modifikasi media yang disesuaikan dengan spesies, tahap kultur, atau tujuan aplikasi. Secara komposisi, media MS kaya akan garam mineral yang menyediakan unsur hara makro dan mikro disertai dengan vitamin dan sumber karbon berupa sukrosa. Kelebihan media MS terletak pada penggunaannya yang dapat dimanfaatkan untuk banyak tujuan dan sebagai awal dalam modifikasi dengan mengoptimalkan hormon, karbon ataupun vitamin untuk spesies tertentu. Namun media MS juga memiliki keterbatasan dalam hal kandungan garam yang tinggi dapat tidak sesuai untuk spesies yang sensitif, sehingga banyak peneliti yang menyesuaikan penggunaan MS dengan modifikasi tertentu (Biswas, 2024)

4.3.2 *Gamborg* (B5)

Media gamborg pertama kali dikembangkan oleh Gamborg untuk kultur suspensi soybean (*Gamborg et al.*, 1968). Berbeda dengan media MS yang dirancang untuk pertumbuhan cepat jaringan tembakau, B5 lebih ditujukan untuk mendukung kultur sel dalam suspensi cair. Perbandingan komposisi nitrogen lebih rendah dibanding media MS, dan konsentrasi vitamin khususnya tiamin cukup tinggi. Dalam praktiknya, B5 digunakan secara luas untuk kultur sel, embriogenesis somatik dan produksi metabolit sekunder. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa B5 lebih efektif dibanding MS untuk kultur sel tertentu, misalnya pada *Medicago sativa* dan *Daucus carota*, karena rasio ion yang lebih mendukung metabolisme sekunder dan diferensiasi sel. Selain itu, B5 sering digunakan sebagai

dasar media yang dimodifikasi terutama ketika tujuan kultur adalah produksi senyawa bioaktif dari kultur sel tanaman (Kapoor *et al.*, 2025).

4.3.3 White

Media white adalah media kultur jaringan yang dikembangkan oleh P. R. White untuk kultur akar dan jaringan tanaman. Media ini dikenal karena komposisinya yang lebih sederhana karena hanya mencakup garam anorganik, vitamin dan sumber karbon tanpa ada tambahan zat pengatur tumbuh atau agen pemadat. Komposisi media white mencakup garam-garam seperti potassium nitrate (KNO_3) dan calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) sebagai sumber nitrat, vitamin, dan sukrosa sebagai sumber karbon. Media ini sering dijadikan media dasar untuk eksperimen yang ingin mempelajari respon tanaman terhadap zat pengatur tumbuh, variasi nutrisi atau sumber karbon tanpa pengaruh tambahan hormon bawaan. Kelebihan utama media white adalah kemampuannya memberikan kontrol lebih besar dalam desain eksperimen jika variabel seperti hormon, konsentrasi nutrisi atau kondisi pertumbuhan yang ingin diuji secara independen (Bait *et al.* 2024)

4.3.4 Nitsch & Nitsch (NN)

Media Nitsch & Nitsch dikembangkan khusus untuk mendukung pertumbuhan kultur polen dan embriogenesis pada berbagai tanaman. Karakteristik media ini memiliki kandungan garam anorganik yang relatif lebih rendah dibandingkan media lain. Media NN sering digunakan dalam penelitian androgenesis, embriogenesis somatik, dan kultur gametofit sehingga menjadi salah satu media penting dalam kajian bioteknologi tanaman. Kelebihan utama media ini adalah mampu mengoptimalkan pembentukan embrio dari polen, terutama pada tanaman yang sulit dikultur menggunakan media standar. Beberapa penelitian terbaru memodifikasi media NN, misalnya dengan menambahkan hormon atau sumber karbon tertentu dapat meningkatkan efisiensi regenerasi tanaman melalui embriogenesis. Media ini digunakan sebagai media dasar untuk teknik kultur jaringan modern seperti produksi doubled haploid yang sangat berguna untuk pemuliaan tanaman (Ferrie and Brost, 2024)

4.3.5 Vacin & Went (VW)

Media Vacin & Went dikembangkan pada tahun 1949 oleh Vacint dan Went yang dirancang khusus untuk mendukung pertumbuhan anggrek (*Orchidaceae*) dalam kultur jaringan. Media ini diformulasikan dengan kadar nitrogen yang lebih rendah dibanding media kultur lainnya, namun diperkaya dengan zat besi (Fe) dan fosfor yang berperan dalam metabolisme dan pembentukan jaringan. Komposisi unik ini membuat media VW sangat sesuai dengan pertumbuhan jaringan anggrek, terutama pada fase germinasi biji dan perkembangan protocorm-like bodies (PLBs). Media ini memfasilitasi perkecambahan biji anggrek yang sangat kecil dan tidak memiliki cadangan makanan sehingga berkembang menjadi protocorm dan berdiferensiasi menjadi eksplan (Safitri *et al.*, 2024)

4.3.6 Woody Plant Medium (WPM)

Media WPM dikembangkan pada tahun 1980 khusus untuk kultur jaringan tanaman berkayu yang umumnya sulit untuk dikultur menggunakan media standar seperti media MS. Karakteristik dari media WPM adalah memiliki konsentrasi garam mineral lebih rendah, terutama nitrogen sehingga sesuai dengan kebutuhan fisiologi tanaman berkayu yang sensitif terhadap akumulasi garam tinggi, namun konsentrasi Ca^{2+} dan Mg^{2+} lebih tinggi dibanding media lain untuk menunjang stabilitas dinding sel dan fotosintesis. Media ini lebih banyak digunakan untuk mikropropagasi berbagai spesies tanaman berkayu seperti pohon buah, tanaman hutan seperti jati dan pinus, serta tanaman hias berkayu (Ree *et al.*, 2024). Hingga kini WPN menjadi salah satu media standar dalam mikropropagasi tanaman berkayu dan banyak digunakan dalam penelitian serta kultur jaringan (Yan *et al.*, 2024)

4.4 Pembuatan Media

Proses pembuatan media kultur jaringan merupakan tahapan penting yang harus dilakukan secara cermat dan teliti karena komposisi media yang tidak tepat memengaruhi pertumbuhan eksplan. Oleh karena itu, proses pembuatan media harus dilakukan dengan hati-hati, terstandar dan memenuhi prinsip sterilisasi

Langkah-langkah pembuatan media secara umum meliputi pembuatan larutan stok, pelarutan, penambahan zat pengatur tumbuh, penyesuaian pH dan sterilisasi. Berikut tahapan standar pembuatan media Murashige & Skoog (MS).

4.4.1 Persiapan Larutan Stok

Pada tahapan awal, semua bahan kimia yang diperlukan untuk media dibuat terlebih dahulu dalam bentuk larutan stok dengan konsentrasi tertentu. Misalnya unsur hara makronutrien, mikronutrien, vitamin dan zat pengatur tumbuh. Tujuannya agar mempermudah penimbangan, mempercepat proses pembuatan media serta memastikan media dapat dibuat secara konsisten dalam jumlah banyak. Setiap larutan stok disimpan dalam botol steril pada suhu rendah ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) untuk mencegah degradasi.

4.4.2 Pencampuran Komponen Media

Setelah larutan stok siap, selanjutnya setiap komponen dimasukkan kedalam wadah berisi air suling atau deionisasi. Pada tahapan ini juga dilakukan penambahan sukrosa sebagai sumber energi dengan konsentrasi $\pm 30 \text{ g/L}$. Selain itu, juga penambahan agen pematid berupa agar atau gelrite. Prinsipnya semua komponen harus diaduk hingga larut sempurna. Jika terdapat endapan, kemungkinan ada kesalahan dalam urutan pencampuran .

4.4.3 Pengaturan pH Media

pH sangat penting karena memengaruhi ketersediaan unsur hara serta penyerapan nutrisi oleh jaringan tumbuhan. Penggunaan rentang pH yang umum digunakan yaitu 5,6-5,8 dengan mengatur penggunaan NaOH atau HCl, untuk menaikkan pH dapat menggunakan NaOH atau KOH sedangkan jika ingin menurunkan pH dapat menggunakan HCl. Jika pH terlalu rendah unsur fosfat dapat mengendap, sedangkan jika terlalu tinggi pertumbuhan eksplan bisa terhambat. Oleh karena itu, pengaturan pH pada media kultur jaringan sangat penting untuk menentukan keberhasilan kultur jaringan.

4.4.4 Sterilisasi Media

Sterilisasi salah satu tahap krusial dalam pembuatan media kultur jaringan karena keberhasilan kultur bergantung pada kondisi media yang bebas dari kontaminan. Metode sterilisasi yang paling umum digunakan adalah autoklaf, yaitu proses sterilisasi dengan uap bertekanan tinggi pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15-20 menit. Tahap ini efektif membunuh bakteri, jamur, maupun spora yang resisten terhadap panas. Namun beberapa zat dalam media seperti vitamin dan zat pengatur tumbuh tidak tahan terhadap suhu tinggi. Sterilisasi media bukan sekedar prosedur teknis namun juga sebagai langkah preventif yang menentukan keberhasilan jangka panjang kultur jaringan.

4.4.5 Penambahan zat yang sensitif panas

Beberapa senyawa seperti zat pengatur tumbuh seperti BAP, NAA, IAA, Kinetin dan vitamin tertentu mudah rusak pada suhu tinggi. Oleh karena itu, senyawa tersebut disterilisasi dengan menggunakan filtrasi membran (0,22µm), kemudian ditambahkan ke media setelah media selesai diautoklaf dan suhunya turun ke ±40-50°C. Suhu yang terlalu tinggi dapat menginaktivasi senyawa, sedangkan suhu terlalu rendah menyebabkan media sudah memadat (untuk media agar).

Tahap akhir adalah pendistribusian media ke dalam wadah kultur, seperti botol kaca. Media pada dibiarkan hingga mengeras sedangkan media cair tetap digunakan dalam bentuk larutan. Seluruh proses pendistribusian sebaiknya dilakukan di dalam ruang kerja steril seperti *Laminar Air Flow* untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

4.5 Faktor yang Memengaruhi Keefektifan Media

Keberhasilan kultur jaringan tanaman sangat ditentukan oleh efektivitas media yang digunakan. Media bukan hanya berfungsi sebagai sumber nutrisi, tetapi juga sebagai lingkungan buatan yang menggantikan kondisi alami tempat jaringan tanaman untuk tumbuh dan berkembang. Efektivitas media dipengaruhi oleh berbagai faktor, baik faktor internal yang berasal dari komposisi kimia media itu sendiri maupun dari kondisi fisik dan biologis selama proses kultur.

Faktor-faktor ini saling berinteraksi dan menentukan respon dari eksplan terhadap kultur, dimulai dari tahap inisiasi, proliferasi, hingga diferensiasi jaringan.

Beberapa faktor penting yang perlu diperhatikan antara lain keseimbangan unsur hara makro dan mikro, konsentrasi vitamin, ketersediaan sumber karbon, serta keberadaan zat pengatur tumbuh dengan komposisi dan rasio yang tepat. Perkembangan terbaru dalam penelitian kultur jaringan semakin diarahkan kepada pendekatan spesifik-spesies yang berbasis tujuan aplikasi. Beberapa penelitian terbaru bahkan mengeksplorasi senyawa bioaktif sebagai alternatif ZPT sintetis untuk mendukung pertumbuhan yang rama lingkungan. Sementara itu, untuk sumber karbon banyak peneliti yang mencari variasi gula untuk meningkatkan efisiensi kultur terutama dalam produksi metabolit sekunder (Martins *et al.*, 2024).

Faktor eksternal juga mempengaruhi keefektivitasan media seperti suhu, cahaya, dan kondisi aseptik. Suhu optimal biasanya berkisar antara 34-27°C, dengan pencahayaan yang diatur intensitasnya dan panjang gelombang yang sesuai dengan spesies tanaman. Selain itu, kondisi aseptik tetap menjadi syarat mutlak karena kontaminasi mikroorganisme dapat menggagalkan kultur meskipun media sudah optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Bait, M., S.B, V. and Malik, F. (2024) *Kultur jaringan*.
- Biswas, P., Kumari, A. and Kumar, N. (2024) 'Impact of salt strength on in vitro propagation and rebaudioside A content in *Stevia rebaudiana* under semi-solid and liquid MS media', *Scientific Reports*, 14(1), p. 22148. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70899-1>.
- Choi, M. *et al.* (2024) 'Influence of medium and gelling agents concentration on in vitro rooting of *Polygonum tinctorium*', *Journal of Phytology*, 16(SE-Articles), pp. 8–12. Available at: <https://doi.org/10.25081/jp.2024.v16.8793>.
- Ferrie, A.M.R. and Brost, J.M. (2024) 'Enhancing microspore embryogenesis in diploid potato (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) germplasm', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 157(2). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02768-8>.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) 'Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells', *Experimental Cell Research*, 50(1), pp. 151–158. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5).
- Ishfaq, M. *et al.* (2022) 'Physiological Essence of Magnesium in Plants and Its Widespread Deficiency in the Farming System of China.', *Frontiers in plant science*, 13, p. 802274. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.802274>.
- Iswiyanto, A., Radian, R. and Abdurrahman, T. (2022) 'Pengaruh Nitrogen Dan Fosfor Terhadap Pertumbuhan Dan Hasil Kedelai Edamame Pada Tanah Gambut', *Jurnal Sains Pertanian Equator*, 12(1), p. 95. Available at: <https://doi.org/10.26418/jspe.v12i1.60354>.
- Kapoor, S. *et al.* (2025) 'Light spectral quality-driven guggulsterone production and antioxidant profiling in *Commiphora wightii* (Arnott.) Bhandari callus cultures using LC-MS', *Applied Food Research*, 5(1), p. 101013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101013>.
- Liu, Y. *et al.* (2024) 'Effects of different phosphorus and potassium supply on the root architecture, phosphorus and potassium

- uptake, and utilization efficiency of hydroponic rice', *Scientific Reports*, 14(1), p. 21178. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72287-1>.
- Martins, J.P.R. *et al.* (2024) 'In vitro rooting of *Quercus robur*, activated charcoal vs. exogenous auxin: a morphophysiological approach', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 156(1), pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02656-7>.
- Messant, M. *et al.* (2023) 'Manganese concentration affects chloroplast structure and the photosynthetic apparatus in *Marchantia polymorpha*.' *Plant physiology*, 192(1), pp. 356–369. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad052>.
- Mohamed, G.M. *et al.* (2021) 'Effects of different gelling agents on the different stages of rice regeneration in two rice cultivars.', *Saudi journal of biological sciences*, 28(10), pp. 5738–5744. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.003>.
- Pasternak, T.P. and Steinmacher, D. (2024) 'Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro.', *Plants (Basel, Switzerland)*, 13(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/plants13020327>.
- Ree, J.F. *et al.* (2024) 'Development of a Micropropagation Protocol for the Ex Situ Conservation of Nuttall's Scrub Oak (*Quercus dumosa*).', *Plants (Basel, Switzerland)*, 13(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/plants13081148>.
- Safitri *et al.* (2024) 'Improvement of Growth Rate in In Vitro Culture of *Paphiopedilum primulinum* M. W. Wood & P. Taylor and *Paphiopedilum glaucophyllum* J. J. Smith using Banana Enrichment Media.', *Tropical life sciences research*, 35(3), pp. 109–120. Available at: <https://doi.org/10.21315/tlsr2024.35.3.5>.
- Setiawati, T. *et al.* (2020) 'Analisis Metabolit Sekunder Kultur Pucuk, Kalus, dan Tanaman Lapang *Chrysanthemum morifolium* Ramat', *Jurnal ILMU DASAR*, 21(1), pp. 1–10. Available at: <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/JID>.
- Sudheer, W.N. *et al.* (2022) *Role of plant tissue culture medium components, Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends*. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00012-6>.
- Ullah, J. *et al.* (2024) 'Green synthesized iron oxide nanoparticles as a

potential regulator of callus growth, plant physiology, antioxidative and microbial contamination in *Oryza sativa* L.', *BMC Plant Biology*, 24(1), p. 939. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05627-y>.

Wasiati, A.R., Nugraheni, I.A. and Setiawati, Y. (2021) 'The combination of murashige and skoog (MS) media and activated charcoal on the growth of the *Vanda helvola* orchid plant in vitro', *International Journal of Health Science and Technology*, 3(1 SE-Articles), pp. 159–170. Available at: <https://doi.org/10.31101/ijhst.v3i1.2247>.

Yan, X. *et al.* (2024) 'An efficient in vitro organogenesis protocol for the endangered relic tree species *Bretschneidera sinensis* and genetic fidelity assessment using DNA markers', *Frontiers in Plant Science*, 15(April), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1259925>.

BAB 5

EKSPLAN

Oleh Annisa Nurul Ilmi

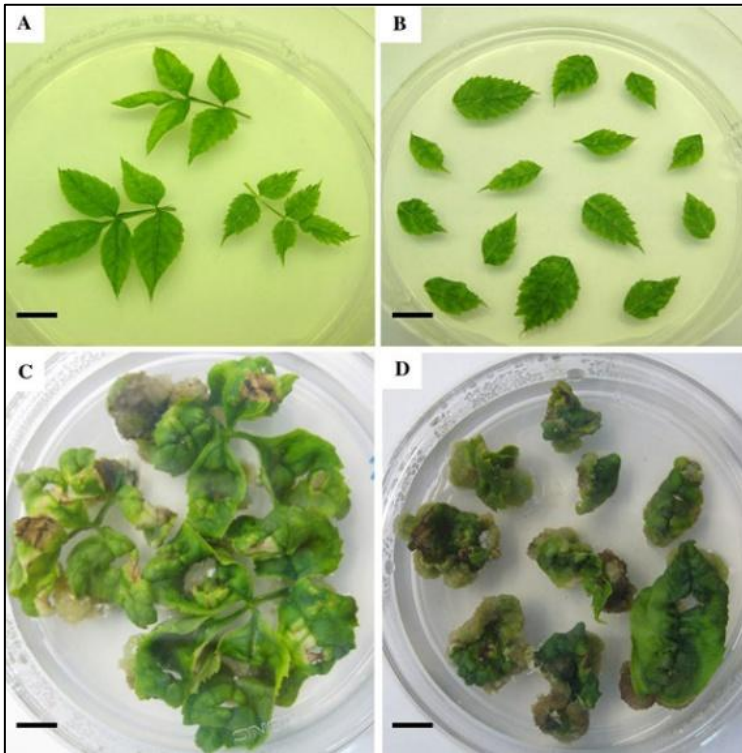
5.1 Pengertian dan Konsep Eksplan

Eksplan dalam kultur jaringan tanaman adalah bagian tanaman, bisa berupa sel, jaringan, organ (misalnya daun, batang, akar, meristem, embrio), yang diambil dari tanaman induk dan ditanam secara aseptik pada medium dengan nutrisi tertentu untuk memulai pertumbuhan *in vitro*. Eksplan merupakan “bahan” awal dalam kultur jaringan karena dari eksplan segala proses dediferensiasi, kalus, organogenesis, atau embriogenesis somatik terjadi, tergantung pada kondisi medium dan zat pengatur tumbuh (Thorpe, 2007).

Konsep eksplan berawal dari teori totipotensi sel yang dikemukakan Gottlieb Haberlandt pada tahun 1902. Ia mengemukakan bahwa setiap sel tanaman memiliki kemampuan untuk tumbuh menjadi individu baru jika dikultur secara terisolasi. Walaupun percobaan awalnya belum menunjukkan keberhasilan penuh, ide tersebut menjadi dasar berkembangnya teknik kultur jaringan. Perkembangan media nutrisi, penemuan zat pengatur tumbuh, dan kemajuan teknik aseptik sejak pertengahan abad ke-20 memungkinkan eksplan digunakan secara luas untuk berbagai tujuan, mulai dari perbanyakan tanaman secara klonal, penyelamatan plasma nutfah, hingga produksi tanaman bebas penyakit. Literatur menunjukkan bahwa sejak pertengahan abad ke-20, terutama dekade 1940-1960, kultur jaringan menggunakan eksplan telah berkembang pesat dan digunakan pada berbagai spesies tanaman (Thorpe, 2007).

Eksplan berperan sangat penting sebagai titik awal dalam kultur jaringan. Keberhasilan regenerasi tanaman bergantung pada jenis eksplan, umur jaringan, kondisi fisiologis tanaman induk, dan lingkungan tempat eksplan diperoleh. Eksplan yang sesuai biasanya memiliki sel yang lebih aktif dan mudah kembali ke keadaan

meristematik, sehingga dapat memicu pembentukan kalus, tunas, akar, maupun embrio somatik. Dapat dikatakan bahwa pemilihan eksplan yang tepat menentukan jalur regenerasi yang akan terjadi, baik melalui organogenesis maupun embriogenesis somatik, yang pada akhirnya akan memengaruhi keberhasilan aplikasi kultur jaringan dalam penelitian dan produksi tanaman (Long *et al.*, 2022).



Gambar 5.1. Pembentukan kalus dari eksplan daun *Fraxinus nigra* (black ash)
(Sumber : Lee and Pijut, 2017)

Pada **Gambar 5.2** merupakan pembentukan kalus yang berhasil diinduksi dari eksplan daun *Fraxinus nigra* (black ash). Daun majemuk dengan lima anak daun yang masih menempel maupun anak daun tunggal dipotong melintang dua hingga tiga kali pada tulang daun utama, kemudian dikulturkan dengan permukaan abaksial bersentuhan dengan medium induksi. Kalus terbentuk dari

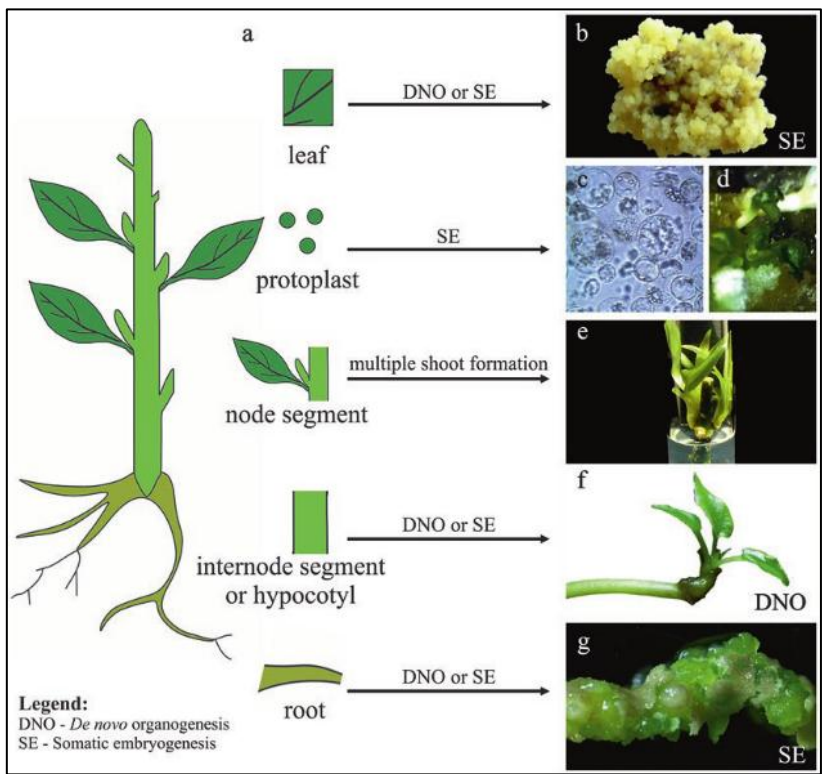
sisi abaksial dan ujung tangkai daun setelah 4 minggu (3 minggu dalam kondisi gelap dan 1 minggu dalam kondisi terang) (Lee and Pijut, 2017). Hasil ini menunjukkan bahwa pemilihan bagian daun dan orientasi penanaman eksplan sangat menentukan keberhasilan pembentukan kalus.

5.2 Sumber dan Jenis Eksplan

Eksplan pada kultur jaringan dapat diperoleh dari berbagai bagian tanaman, antara lain daun, batang, akar, meristem, embrio, maupun endosperma. Setiap jenis organ memiliki karakteristik tersendiri dalam menentukan keberhasilan kultur. Daun dan batang sering dipilih karena mudah diperoleh dan memiliki sel-sel yang masih aktif membelah, sementara akar kadang digunakan untuk membentuk sistem perakaran atau kalus. Meristem banyak dimanfaatkan karena memiliki potensi regenerasi tinggi dan biasanya bebas dari patogen. Embrio biasanya digunakan dalam penelitian embriogenesis somatik, sedangkan endosperma lebih terbatas penggunaannya namun penting dalam kajian genetik maupun kultur tanaman hibrida.

Eksplan dapat dibedakan berdasarkan tingkat kematangan jaringan menjadi eksplan juvenil dan eksplan dewasa. Eksplan juvenil umumnya berasal dari tanaman muda atau bagian yang masih berada pada fase pertumbuhan vegetatif sehingga memiliki kemampuan regenerasi lebih baik, proses dediferensiasi lebih cepat, dan relatif sedikit kendala fisiologis. Sebaliknya, eksplan dewasa berasal dari tanaman yang sudah matang sehingga sering mengalami beberapa hambatan seperti lignifikasi atau pengeluaran senyawa fenolik, yang dapat mengganggu keberhasilan kultur. Selain itu, dikenal pula perbedaan antara eksplan *in vivo* dan *in vitro*. Eksplan *in vivo* adalah jaringan yang diambil langsung dari tanaman di lapangan atau rumah kaca, sedangkan eksplan *in vitro* berasal dari tanaman yang sudah lebih dulu dipelihara dalam kondisi kultur. Selain itu, eksplan dapat diperoleh dari kondisi *in vivo* (langsung dari tanaman asal di lapangan) maupun *in vitro* (tanaman yang sebelumnya telah ditumbuhkan dalam kondisi steril). Eksplan *in vivo* memiliki risiko lebih tinggi terkontaminasi mikroba, sedangkan eksplan *in vitro* relatif lebih mudah disterilkan dan dikendalikan.

Penerapan berbagai jenis eksplan telah banyak dilaporkan pada beberapa penelitian di beragam spesies tanaman. Misalnya, pada kelapa sawit, eksplan berupa daun juvenil digunakan untuk induksi kalus dan embriogenesis somatik (Fki *et al.*, 2017). Pada *Cannabis sativa*, segmen nodal dari bagian basal tanaman menunjukkan tingkat multiplikasi tunas yang lebih tinggi dan pertumbuhan daun yang lebih stabil dibandingkan bagian atas (Hesami *et al.*, 2023). Pada jeruk, eksplan berupa tunas aksiler atau embrio muda banyak digunakan dalam penelitian transformasi genetik dan produksi tanaman transgenik (Orbović and Grosser, 2015). Berbagai contoh tersebut menunjukkan bahwa pemilihan sumber eksplan yang tepat sangat menentukan keberhasilan kultur jaringan tanaman.



Gambar 5.2. Bagian tumbuhan yang digunakan untuk eksplan secara *in vivo*
(Sumber : Rocha *et al.*, 2018)

Gambar 5.2 memperlihatkan berbagai bagian tanaman yang umum digunakan sebagai sumber eksplan, antara lain daun, protoplas, ruas batang, hipokotil, dan akar. Setiap eksplan dapat menghasilkan regenerasi melalui dua jalur utama, yaitu *de novo organogenesis* (DNO) dan embriogenesis somatik (SE). Pada sisi kanan gambar, merupakan hasil nyata dari bagian tumbuhan yang digunakan sebagai eksplan dalam kultur, misalnya terbentuknya kalus, embrio somatik, atau tunas baru. Dengan begitu, pembaca bisa lebih mudah membayangkan bagaimana sebuah potongan kecil tanaman mampu berkembang menjadi individu baru di bawah kondisi kultur jaringan. Berikut adalah Jenis-jenis eksplan yang umum digunakan.

1. Daun: sering dipilih sebagai sumber eksplan karena mudah didapatkan dan memiliki luas permukaan yang cukup untuk induksi kalus maupun pembentukan organ baru. Jaringan daun juga responsif terhadap perubahan fisiologis yang diperlukan dalam kultur.
2. Batang (ruas atau nodus): bagian ini kerap dimanfaatkan untuk memperbanyak tunas secara cepat. Keberadaan tunas aksiler pada ruas batang menjadikannya sangat efektif dalam regenerasi tanaman secara konsisten.
3. Akar: walaupun tidak seumum bagian lain, akar dapat digunakan dalam penelitian yang berfokus pada pembentukan kalus dan perkembangan sistem perakaran. Akar juga membantu memahami proses diferensiasi jaringan bawah tanah.
4. Meristem pucuk dan tunas aksiler: jaringan ini memiliki kemampuan membelah yang tinggi, sehingga banyak digunakan untuk menghasilkan tanaman yang sehat dan bebas patogen. Selain itu, meristem sangat penting untuk menjaga stabilitas genetik dalam kultur.
5. Embrio zigotik: kerap digunakan dalam embriogenesis somatik, penelitian penyelamatan embrio, maupun pengembangan tanaman transgenik. Eksplan embrio sangat bermanfaat bagi spesies yang sulit diperbanyak melalui cara konvensional.
6. Endosperma: meski jarang dipakai, jaringan ini penting dalam penelitian pemuliaan karena dapat menghasilkan tanaman

triploid dengan potensi agronomi yang menarik, misalnya dalam peningkatan kualitas buah.

7. Protoplas atau sel tunggal: dimanfaatkan pada aplikasi bioteknologi tingkat lanjut, seperti fusi sel dan rekayasa genetik. Eksplan jenis ini memungkinkan eksplorasi keragaman genetik dan inovasi dalam perakitan varietas baru.

5.3 Faktor yang Mempengaruhi Pemilihan Eksplan

Keberhasilan kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh kondisi fisiologis dan kualitas eksplan yang digunakan. Tanaman induk yang sehat serta jaringan yang masih muda umumnya lebih responsif terhadap regenerasi dibandingkan jaringan yang lebih tua (Ikeuchi, Sugimoto and Iwase, 2013). Hal ini terkait dengan aktivitas metabolik dan fisiologis yang lebih tinggi pada jaringan muda sehingga mampu merespons perlakuan kultur dengan lebih baik. Beberapa faktor penting yang perlu diperhatikan dalam pemilihan eksplan antara lain:

1. Kondisi fisiologis tanaman induk dan umur jaringan: jaringan yang lebih muda memiliki kapasitas regeneratif lebih tinggi dibandingkan jaringan dewasa (Swamy, Ganguli and Puri, 2004).
2. Faktor genetik dan epigenetik: regulasi genetik serta perubahan epigenetik, seperti metilasi DNA dan modifikasi histon, memengaruhi keberhasilan regenerasi (Lee *et al.*, 2024).
3. Musim dan kondisi lingkungan: faktor eksternal seperti suhu, cahaya, dan ketersediaan nutrisi dapat mengubah respons eksplan dalam kultur (Perveen, Anis and Aref, 2013).
4. Ketersediaan serta kemudahan akses eksplan: pemilihan eksplan juga mempertimbangkan seberapa mudah jaringan diperoleh dari tanaman tanpa menimbulkan kerusakan besar pada induknya (Thorpe, 2007).

Dengan memperhatikan faktor-faktor tersebut, dapat ditentukan jenis eksplan yang paling sesuai untuk kultur jaringan. Pertimbangan ini tidak hanya meningkatkan efisiensi regenerasi,

tetapi juga meminimalkan risiko kegagalan akibat penggunaan eksplan yang tidak tepat.

5.4 Teknik Isolasi dan Sterilisasi Eksplan

Dalam kultur jaringan, prinsip aseptik bertujuan memastikan bahwa hanya jaringan tanaman yang tumbuh dalam medium *in vitro*, bebas dari mikroorganisme yang berasal dari permukaan atau lingkungan sekitar. Beberapa prinsip penting yang diterapkan meliputi: (1) menghilangkan sumber kontaminasi pada eksplan melalui pencucian awal dan desinfeksi kimia, (2) bekerja dalam kondisi steril seperti menggunakan *laminar flow* dan peralatan yang telah disterilkan, (3) memperpendek waktu eksplan terpapar udara setelah proses sterilisasi, serta (4) melakukan monitoring secara rutin untuk mendeteksi kontaminasi sejak dini (George, Hall and Klerk, 2008).

Metode sterilisasi eksplan merupakan langkah krusial dalam kultur jaringan karena menentukan keberhasilan awal pertumbuhan *in vitro*. Beberapa agen kimia umum digunakan dengan prinsip aseptik yang ketat. Etanol 70% berfungsi sebagai desinfektan cepat dan pelarut lapisan lilin, biasanya diaplikasikan dengan perendaman singkat 20–60 detik sebelum bilasan air steril. Natrium hipoklorit (NaOCl) banyak dipilih karena efektif membunuh bakteri, jamur, maupun spora, dengan konsentrasi 0,5–2% selama 10–20 menit diikuti pembilasan berulang. Mercuric chloride (HgCl₂) dikenal sangat efektif untuk kontaminan persisten, tetapi penggunaannya kini terbatas karena toksisitas tinggi terhadap manusia dan lingkungan. Alternatif yang lebih aman adalah hidrogen peroksida (H₂O₂) dengan konsentrasi 1–5% selama 5–15 menit. Selain itu, bahan lain seperti AgNO₃, Ca(OCl)₂, atau penambahan antibiotik dan antifungal dalam medium dapat digunakan bila terdapat indikasi kontaminasi endofit. Kombinasi berurutan, misalnya EtOH singkat diikuti NaOCl dan pembilasan, sering memberikan hasil lebih konsisten dibanding penggunaan tunggal (ANĐELIĆ *et al.*, 2024).

Tantangan utama dalam sterilisasi eksplan adalah kontaminasi dan fitotoksitas. Kontaminasi permukaan dapat diminimalkan melalui pencucian awal dan penggunaan EtOH atau NaOCl, sedangkan kontaminasi internal oleh endofit lebih sulit diatasi

dan memerlukan strategi tambahan seperti pemilihan tanaman donor sehat, penggunaan antibiotik/antifungal selektif, atau isolasi jaringan meristem dan embrio yang lebih aseptik. Paparan berlebihan terhadap bahan kimia yang sering digunakan untuk sterilisasi dapat menyebabkan kerusakan jaringan, sehingga optimasi konsentrasi dan waktu menjadi penting untuk mempertahankan viabilitas eksplan. Selain itu, kontaminasi juga dapat bersumber dari lingkungan dan peralatan, sehingga penerapan teknik aseptik di dalam laminar flow, sterilisasi alat dengan autoklaf atau flambe, serta pelatihan operator merupakan faktor penentu keberhasilan kultur jaringan (Volk *et al.*, 2022).

5.5 Respon Eksplan dalam Kultur Jaringan

Respon eksplan dalam kultur jaringan mencerminkan kemampuan sel untuk kembali ke fase meristematik melalui proses dediferensiasi, yang kemudian diikuti pembelahan dan diferensiasi ulang menjadi organ baru atau embrio somatik. Keberhasilan proses ini sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan, kondisi fisiologis jaringan, serta media dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Eksplan yang masih muda umumnya memiliki aktivitas seluler tinggi, sehingga lebih mudah membentuk kalus, tunas adventif, maupun embrio somatik.

Respon eksplan dalam kultur jaringan pada dasarnya merupakan manifestasi dari kemampuan sel tanaman untuk kembali ke kondisi meristematik atau totipoten. Saat eksplan diletakkan pada medium kultur, sel-sel di sekitar luka umumnya mengalami dediferensiasi, diikuti dengan peningkatan aktivitas pembelahan. Dari proses ini dapat muncul beberapa jalur regenerasi, yaitu pembentukan kalus, organogenesis adventif, atau embriogenesis somatik. Organogenesis adventif mengacu pada pembentukan tunas atau akar baru dari jaringan somatik, sedangkan embriogenesis somatik menghasilkan embrio bipolar yang berkembang dari sel somatik tanpa melalui fusi gamet. Peristiwa ini dikendalikan oleh regulasi molekuler yang kompleks, termasuk aktivasi faktor transkripsi, perubahan pola ekspresi gen, keseimbangan hormon endogen seperti auksin dan sitokinin, serta mekanisme epigenetik yang menentukan arah dan efisiensi regenerasi.

Berbagai studi telah melaporkan bahwa respon regenerasi sangat bergantung pada jenis eksplan yang digunakan. **Tabel 5.1** berikut merangkum perbedaan respon eksplan dari sejumlah spesies tanaman yang telah diuji dalam kultur jaringan.

Tabel 5.1. Respon eksplan berbagai spesies tanaman dalam kultur jaringan

Spesies Tanaman	Jenis Eksplan	Respon dalam Kultur Jaringan	Referensi
<i>Fraxinus nigra</i> (Black ash)	Daun majemuk, anak daun	Pembentukan kalus dari sisi abaksial dan ujung tangkai setelah 4 minggu	(Lee and Pijut, 2017)
<i>Euryodendron excelsum</i>	Daun dan tangkai daun	Induksi kalus, pembentukan tunas adventif, dan embrio somatik	(Xiong <i>et al.</i> , 2022)
<i>Tagetes erecta</i> (Marigold)	Daun	Induksi embriogenesis somatik dari eksplan daun	(Espinoza <i>et al.</i> , 2017)
<i>Berbagai spesies (article review)</i>	Beragam sumber eksplan (daun, batang, kotiledon)	Perbedaan respons regenerasi tergantung jenis eksplan dan kondisi kultur	(Hesami <i>et al.</i> , 2023)
<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomat)	Kotiledon	Induksi kalus dan regenerasi tunas dari eksplan kotiledon	(Yaroshko <i>et al.</i> , 2023)
<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomat)	Kotiledon, hipokotil, daun	Sistem regenerasi dan transformasi dengan efisiensi tinggi, perbedaan respons antar eksplan	(Sandhya <i>et al.</i> , 2022)

Sumber: Penulis

Rangkuman pada **Tabel 5.1** menunjukkan bahwa meskipun prinsip dediferensiasi sel berlaku umum, setiap spesies dan jenis eksplan memiliki respons khas yang menentukan jalur regenerasi.

Eksplan muda atau dengan kapasitas meristematik tinggi cenderung menghasilkan kalus embriogenik atau tunas adventif yang lebih efisien, sedangkan eksplan yang lebih terdiferensiasi sering kali memerlukan kondisi media tertentu untuk mencapai respons serupa. Hal ini menegaskan pentingnya pemilihan eksplan yang tepat untuk meningkatkan keberhasilan kultur jaringan pada berbagai spesies tanaman.

5.6 Aplikasi Eksplan dalam Kultur Jaringan

Eksplan merupakan komponen esensial dalam kultur jaringan tanaman, berperan dalam regenerasi, produksi metabolit sekunder, dan konservasi spesies langka. Efektivitasnya ditentukan oleh jenis eksplan dan tujuan spesifik aplikasi, menjadikannya elemen strategis dalam bioteknologi tanaman modern. Berbagai aplikasi eksplan dalam kultur jaringan dapat dikelompokkan ke dalam sejumlah bidang utama sesuai dengan tujuan penggunaannya. Pemanfaatan ini mencakup sektor pertanian, farmasi, konservasi, hingga penelitian dasar dan bioteknologi. Untuk memperjelas cakupan tersebut, uraian berikut menyajikan aplikasi utama eksplan dalam kultur jaringan berdasarkan bidang penggunaannya.

1. **Penelitian Dasar:** menjadikan eksplan sebagai model untuk mempelajari perkembangan dan diferensiasi sel tanaman.
2. **Pertanian dan Hortikultura:** memanfaatkan eksplan untuk memperbanyak massal tanaman unggul maupun tanaman langka. Kultur jaringan memungkinkan produksi bibit bebas penyakit pada tanaman yang sulit diperbanyak secara konvensional, serta mendukung perbaikan genetik melalui variasi somaklonal
3. **Konservasi Biodiversitas:** mengandalkan eksplan untuk penyimpanan jangka panjang plasma nutfah, khususnya tanaman langka atau terancam punah.
4. **Industri Farmasi dan Kosmetik:** menggunakan kultur jaringan berbasis eksplan untuk produksi metabolit sekunder bernilai tinggi seperti alkaloid, flavonoid, dan terpenoid.
5. **Bioteknologi Tanaman:** memanfaatkan eksplan sebagai titik masuk dalam transformasi genetik untuk

mengembangkan tanaman transgenik. Selain itu, eksplan menjadi alat penting dalam studi fungsional gen dan jalur metabolisme.

6. **Industri Pangan:** mendapatkan manfaat dari kultur jaringan eksplan untuk meningkatkan kualitas nutrisi tanaman melalui biofortifikasi. Selain itu, eksplan digunakan untuk mengembangkan varietas tanaman tahan hama dan penyakit.
7. **Industri Kehutanan:** mengaplikasikan eksplan untuk memperbanyak cepat pohon unggul yang digunakan dalam program reboisasi, sekaligus konservasi spesies pohon langka atau bernilai ekonomi tinggi.
8. **Bioteknologi Lingkungan:** mengandalkan eksplan untuk pengembangan tanaman fitoremediator yang mampu membersihkan lahan tercemar.

DAFTAR PUSTAKA

- ANĐELIĆ, T. *et al.* (2024) 'Comparative study of different surface sterilization treatments and optimal month for establishment of aseptic cultures of raspberry cultivars', *Journal of Central European Agriculture*, 25(2), pp. 470–480. Available at: <https://doi.org/10.5513/JCEA01/25.2.4201>.
- Espinoza, P.E.V. *et al.* (2017) 'Somatic embryogenesis from leaf explants of *Tagetes erecta* L.', *Plant Biotechnology*, 34(4), pp. 187–192. Available at: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.1120a>.
- Fki, L. *et al.* (2017) 'Indirect Somatic Embryogenesis of Date Palm Using Juvenile Leaf Explants and Low 2,4-D Concentration', in, pp. 99–106. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_9.
- George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.-J. De (2008) 'Plant Tissue Culture Procedure - Background', in *Plant Propagation by Tissue Culture*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1–28. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1.
- Hesami, M. *et al.* (2023) 'Effect of Explant Source on Phenotypic Changes of In Vitro Grown Cannabis Plantlets over Multiple Subcultures', *Biology*, 12(3), p. 443. Available at: <https://doi.org/10.3390/biology12030443>.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. (2013) 'Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression', *The Plant Cell*, 25(9), pp. 3159–3173. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>.
- Lee, J.H. and Pijut, P.M. (2017) 'Adventitious shoot regeneration from in vitro leaf explants of *Fraxinus nigra*', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130(2), pp. 335–343. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1228-1>.
- Lee, S. *et al.* (2024) 'Insights into plant regeneration: cellular pathways and DNA methylation dynamics', *Plant Cell Reports*, 43(5), p. 120. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00299-024-03216-9>.
- Long, Y. *et al.* (2022) 'New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms', *Frontiers in Plant Science*, 13.

- Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926752>.
- Orbović, V. and Grosser, J.W. (2015) 'Citrus Transformation Using Juvenile Tissue Explants', in, pp. 245–257. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1658-0_20.
- Perveen, S., Anis, M. and Aref, I.M. (2013) 'In vitro plant regeneration of *Albizia lebbeck* (L.) from seed explants', *Forest Systems*, 22(2), pp. 241–248. Available at: <https://doi.org/10.5424/fs/2013222-03261>.
- Rocha, D.I. *et al.* (2018) 'Cellular and Morpho-histological Foundations of In Vitro Plant Regeneration', in, pp. 47–68. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_3.
- Sandhya, D. *et al.* (2022) 'Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(6), p. 103292. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103292>.
- Swamy, S.L., Ganguli, J.L. and Puri, S. (2004) 'Regeneration and multiplication of *Albizia procera* Benth. through organogenesis', *Agroforestry Systems*, 60(2), pp. 113–121. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:AGFO.0000013265.98101.dc>.
- Thorpe, T.A. (2007) 'History of plant tissue culture', *Molecular Biotechnology*, 37(2), pp. 169–180. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>.
- Volk, G.M. *et al.* (2022) 'Minimizing the deleterious effects of endophytes in plant shoot tip cryopreservation', *Applications in Plant Sciences*, 10(5). Available at: <https://doi.org/10.1002/aps3.11489>.
- Xiong, Y. *et al.* (2022) 'Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of endangered *Euryodendron excelsum*', *Scientific Reports*, 12(1), p. 20506. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24744-y>.
- Yaroshko, O. *et al.* (2023) 'Optimization of Callus Induction and Shoot Regeneration from Tomato Cotyledon Explants', *Plants*, 12(16), p. 2942. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants12162942>.

BAB 6

STERILISASI

Oleh Yudia Azmi

6.1 Pendahuluan

Kultur jaringan, metode perbanyakan tanaman kontemporer, memisahkan komponen-komponen tanaman seperti organ, jaringan, sel, dan protoplasma. Hingga mencapai perkembangan sempurna, bagian-bagian tanaman ini dibudidayakan dalam lingkungan aseptik yang bebas dari hama dan patogen. Eksplan adalah potongan tanaman yang dibudidayakan dalam kultur jaringan. Sterilisasi merupakan salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan kultur jaringan.

Proses sterilisasi mikroorganisme menggunakan panas, bahan kimia, radiasi, dan teknik lainnya dikenal sebagai sterilisasi. Media yang dihasilkan dari prosedur sterilisasi yang tidak memadai, lingkungan kerja, dan praktik budidaya yang ceroboh dan tidak akurat, eksplan, serta serangga atau hewan kecil yang masuk ke dalam botol kultur setelah ditempatkan di ruang kultur merupakan beberapa sumber kontaminasi mikroba dalam sistem kultur jaringan. (Zulkarnain, 2017). Keberhasilan program kultur jaringan sangat bergantung pada sterilitas transplantasi. Dalam kultur jaringan, sterilisasi eksplan sangat penting karena menghambat pertumbuhan bakteri. Jika eksplan tidak cukup steril, kuman yang terkandung di dalamnya akan berkembang biak dengan cepat dan menyebabkan kontaminasi. Akibatnya, mikroorganisme masuk ke dalam eksplan melalui tepi yang telah diiris. Sterilisasi yang tepat dapat menghasilkan eksplan yang steril, atau eksplan yang bebas dari kontaminan.

6.2 Ruang Lingkup Sterilisasi

6.2.1 Sterilisasi Ruangan

Ruang inokulasi/tabur adalah area di laboratorium kultur jaringan yang perlu dijaga steril. Untuk memastikan proses sterilisasi

cepat dan mudah, ruang inokulasi biasanya sengaja dibuat kecil, hanya berukuran 2 x 3 m². Untuk memudahkan pembersihan, dinding ruang tabur dicat dengan cat tahan air atau porselen. Proses sterilisasi ruangan dilakukan dengan menyemprotnya dengan alkohol 90%. Lantai disterilkan dengan kain pel yang telah dibasahi larutan fenol atau alkohol 90%. Sterilisasi ini wajib dilakukan sebelum ruang tabur digunakan. Ruangan dapat disterilkan dengan lampu ultraviolet. Saat tidak digunakan, lampu UV selalu menyala, dan saat memasuki ruang tabur, lampu dimatikan. (Sandra dan Hapsiati, 2007a).

6.2.2 Sterilisasi Alat Penabur

Laminar Air Flow (LAF), alat penabur, dilengkapi filter HEPA untuk menyaring udara. Permukaan LAF dibersihkan dengan etanol 70% dan disinari sinar UV selama 15 hingga 30 menit sebelum digunakan (Smith, 2012). Udara dan permukaan kerja disterilkan dengan lampu UV. Menurut Trigiano dan Gray (2011), disarankan untuk menggunakannya 15 hingga 30 menit sebelum pekerjaan dimulai. Nyalakan lampu UV satu jam sebelum menggunakan bilik laminar, lalu matikan satu jam kemudian. Setelah itu, nyalakan blower dan lampu, lalu diamkan selama sepuluh menit. Setelah itu, gunakan alkohol 70% untuk menyemprot bagian dalam laminar dan gunakan tisu untuk membersihkan dasar laminar. Laminar kemudian dipersiapkan untuk digunakan dengan menambahkan perlengkapan penanaman (pisau bedah, pinset, gunting, pembakar Bunsen, cawan petri), air steril, dan bahan tanam. Enkas adalah alat penaburan dasar yang digunakan sebagai tambahan untuk LAF (Gambar 6.1). Kantong disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 70% ke dalam kantong sehari sebelum digunakan, lalu membersihkan bagian bawah kantong dengan tisu. Setelah itu, masukkan tisu yang diperlukan, media tanam, cawan petri (masih dalam kemasan kertas steril sebelumnya), pisau bedah, pinset, gunting, dan tisu secukupnya. Selanjutnya, letakkan alkohol 70% atau formalin cair/tablet di sudut-sudut kantong. Keesokan harinya, kantong siap digunakan. Selama proses penanaman, botol formalin cair atau alkohol yang ditempatkan di sudut-sudut kantong dapat ditutup sementara. (Sandra dan Hapsiati, 2007b).



Gambar 6.1. Enkas
(Sumber : pribadi)

6.2.3 Sterilisasi Alat dan Bahan

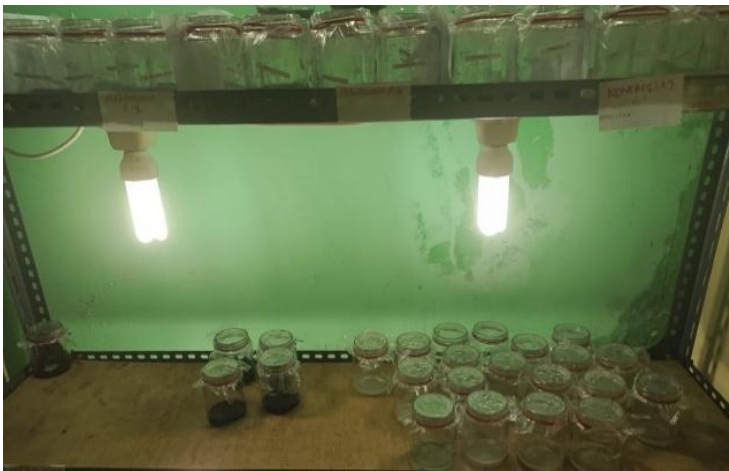
Untuk mencegah kontaminasi, setiap peralatan disterilkan terlebih dahulu. Sebelum digunakan, instrumen dibersihkan dengan deterjen, dibilas, dan dikeringkan. Cawan petri, corong, gelas ukur, skalpel, pinset, gunting, botol, batang pengaduk, dan pipet termasuk di antara peralatan yang dibungkus kertas dengan hati-hati setelah dikeringkan. Setelah itu, setiap alat disterilkan dalam autoklaf selama satu jam pada suhu 121 °C dan tekanan 17,5 psi (Gambar 6.2). Peralatan gelas, larutan tahan panas, dan media kultur semuanya disterilkan menggunakan autoklaf (juga dikenal sebagai moist heat sterilization) (George dkk., 2008). Untuk instrumen logam atau gelas yang tidak berkarat, oven (Dry Heat Sterilization) yang diatur pada suhu 160–180°C selama ± 2 jam sudah sesuai (Smith, 2012). Sterilisasi senyawa yang labil terhadap panas (heat-labile) dalam bentuk larutan dilakukan dengan melewati larutan tersebut melalui filter berpori berukuran 0,20 hingga 0,22 mm. Jumlah larutan yang perlu disterilkan menentukan diameter filter. Filter dipasang pada ujung spuit untuk menampung volume cairan 10 ml. GA3, tiamin-HCl, kalsium pantotenat, dan antibiotik karbenisilin merupakan contoh senyawa yang labil terhadap panas. (Widyastuti dan Deviyanti, 2018).



Gambar 6.2. Autoklaf
(Sumber : pribadi)

6.2.4 Sterilisasi Media

Sebuah botol diisi dengan media kultur jaringan yang telah diproduksi. Setelah itu, botol ditutup rapat menggunakan plastik bening dan aluminium foil. Setelah itu, botol berisi media tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C. Setelah sterilisasi, media tanam disimpan pada suhu antara 25 dan 28°C di dalam inkubator atau rak penyimpanan. (Nasution, 2013). Rak penyimpanan terlihat pada Gambar 6.3.



Gambar 6.3 Rak penyimpanan
(Sumber : pribadi)

Tergantung pada volume wadah dan media, sterilisasi media kultur dengan autoklaf dilakukan selama 20 hingga 25 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi atau 17 atm. Sterilisasi dilakukan selama 20 menit pada tekanan 15 psi untuk 15–50 ml media dalam tabung reaksi atau botol kecil berkapasitas 50–100 ml. Waktu yang dibutuhkan lebih lama untuk dua puluh botol satu liter (34 menit), sepuluh botol dua liter (37 menit), dan lima botol empat liter (52 menit). (Widyastuti dan Deviyanti, 2018).

6.2.5 Sterilisasi Bahan Tanam (Eksplan)

Sebelum dimasukkan ke dalam media tanam, bahan tanaman perlu disterilkan untuk menghilangkan potensi sumber infeksi. Sterilisasi ini tidak mencakup disinfeksi, yang menghilangkan infeksi kontaminan di dalam eksplan, tetapi hanya sterilisasi permukaan atau disinfestasi, yang menghilangkan infestasi kontaminan. Sterilisasi ini menghilangkan bakteri, jamur, dan debu dari eksplan. Ide dasar di balik sterilisasi eksplan adalah untuk membersihkan eksplan dari berbagai mikroba tanpa membunuhnya. Setiap tanaman memiliki kebutuhan yang berbeda, oleh karena itu penting untuk memahami sepenuhnya jenis tanaman dan bahan eksplan, serta karakteristik agen sterilisasi, sebelum kultur, terutama jika tanaman tersebut langka. (Sandra dan Hapsiati, 2007a).

Langkah awal dalam sterilisasi eksplan seringkali adalah mencucinya di bawah air mengalir. Setelah itu, agen sterilisasi bahan tanaman umum seperti alkohol, hipoklorit, deterjen, dan lainnya digunakan. Telah dibuktikan bahwa larutan hipoklorit, baik kalsium maupun natrium, bekerja dengan baik pada sebagian besar bahan tanaman. Misalnya, telah dibuktikan bahwa sebagian besar bahan tanaman merespons dengan baik terhadap perlakuan Na-hipoklorit 0,3-0,6% selama 15–30 menit. Telah dibuktikan bahwa sterilisasi bahan tanaman yang diperoleh dari lapangan dapat dilakukan dengan merkuri klorida (HgCl₂). Sterilisasi bahan tanaman juga dimungkinkan dengan etil dan isopropil alkohol. Secara umum, eksplan dapat langsung disterilkan dengan disinfektan asalkan ukurannya cukup besar dan cukup keras (Zulkarnain, 2017). Sebelum dimasukkan ke dalam ruang tanam laminar atau enkas, eksplan tanaman berkayu juga harus disterilkan dengan

merendamnya sebentar dalam alkohol 70%. Tujuannya adalah untuk menghilangkan gelembung udara, meningkatkan daya penetrasi disinfektan, dan menghilangkan beberapa pengotor pada permukaan eksplan (Sandra dan Hapsiati, 2007a). Untuk menghindari pencoklatan (browning), eksplan juga dapat direndam dalam larutan yang mengandung 150 mg/l asam askorbat dan 50 mg/l asam sitrat sebagai antioksidan. Selanjutnya, fungisida dan bakterisida diberikan selama sekitar setengah jam sambil terus dikocok, terutama untuk benih yang bersumber dari lapangan (Sandra dan Hapsiati, 2007a). Setelah sterilisasi, eksplan dimasukkan ke dalam botol kultur. Berikut adalah beberapa contoh sterilisasi eksplan tanaman.

Sterilisasi Eksplan Biji Jeruk Kasturi

Langkah pertama sterilisasi adalah mencuci eksplan biji kalamondin di bawah air mengalir. Selanjutnya, buat tiga labu kultur dengan 100 mililiter air suling steril, 100 mililiter larutan deterjen (1 g/100 ml), dan 10 persen hipoklorit dalam 100 mililiter air suling. Setelah itu, tempatkan eksplan biji dalam botol kultur dengan air suling dan biarkan terendam selama sekitar tiga menit sambil diaduk. Setelah itu, eksplan dipindahkan ke botol kultur dengan larutan deterjen, tempat mereka direndam selama sepuluh menit sambil diaduk. Benih kemudian direndam sekali lagi selama tiga menit sambil diaduk dengan air suling steril. Setelah itu, mereka dipindahkan ke botol dengan larutan hipoklorit, tempat mereka direndam selama sepuluh menit sambil diaduk, dan kemudian mereka dibilas tiga kali selama tiga menit setiap kali menggunakan air suling steril. Setelah membuang kulit biji, pinset steril digunakan untuk mengekstrak biji jeruk nipis (Gambar 6.4), dan eksplan steril kemudian dipindahkan ke dalam botol kultur steril yang segar. (Corina, dkk, 2014).



Gambar 6.4. Sterilisasi Eksplan Biji Jeruk Kasturi
(Sumber : pribadi)

Sterilisasi Eksplan protokrom anggrek

Dengan menggunakan pinset, eksplan protokrom anggrek dipindahkan ke cawan petri, dan batang tunas yang masih bergerombol kemudian dibagi menjadi dua bagian. Setelah itu, protokrom dikulturkan pada media yang sesuai. Untuk menghindari kontaminasi, bibir botol dibakar terlebih dahulu selama dua hingga tiga detik di atas pembakar Bunsen, lalu ditutup dengan plastik tahan panas sebelum botol ditutup kembali. Setelah ditempatkan di ruang kultur, botol-botol berisi tanaman diletakkan di rak kultur pemeliharaan. (Sinaga, 2024).

Sterilisasi Eksplan Daun Muda Kelapa Sawit

Mencuci daun kelapa sawit muda di bawah air mengalir merupakan langkah pertama dalam sanitasi. Selanjutnya, eksplan berukuran 1×1 cm diambil dari daun kelapa sawit yang belum matang (Jambak, 2011). Eksplan direndam selama 15 menit dalam botol kultur berisi 100 mililiter larutan alkohol 70% (Lukmana dan Rahmawati, 2018). Setelah itu, bilas tiga kali selama tiga menit dengan air bersih. Selanjutnya, buat larutan HgCl_2 0,01%. Rendam eksplan selama sepuluh menit (Gunawan, 2007). Setelah itu, bilas eksplan tiga kali selama tiga menit masing-masing menggunakan air

bersih. Setelah itu, eksplan dibiarkan mengering di udara dalam cawan Petri steril.

Kita dapat menetapkan berbagai macam konsentrasi dan jangka waktu sterilisasi agar percobaan sterilisasi dapat berhasil. Konsentrasi perlu dikurangi jika belum tercemar namun eksplan mati. Di sisi lain, jika masih terdapat banyak polutan, konsentrasi material perlu ditingkatkan untuk mencegah kontaminasi lebih lanjut. Lama waktu sterilisasi juga akan terdampak. Prosedur sterilisasi akan membutuhkan waktu lebih lama jika masih terdapat kontaminasi yang signifikan. Kita dapat mereplikasi prosedur ini dalam jumlah besar jika kita berhasil memastikan satu kultur saja bebas dari kontaminan. (Sandra dan Hapsiati, 2007a).

6.3 Metode Sterilisasi

Berdasarkan cara kerjanya, tiga teknik sterilisasi: mekanis (filter), fisik, dan kimia dapat diterapkan.

6.3.1 Sterilisasi Mekanik atau Filtrasi

Selama sterilisasi mekanis atau penyaringan, bakteri dihilangkan menggunakan kertas saring berpori sangat tipis. Sterilisasi jenis ini paling efektif untuk cairan dan tidak tahan terhadap tekanan tinggi atau panas.

6.3.2 Sterilisasi Fisik

Sterilisasi fisik dapat dilakukan dengan sejumlah cara, termasuk pijaran, uap air panas, panas kering, uap air panas bertekanan, dan penyinaran UV, tergantung pada peralatan dan teknik yang digunakan.

1. Sterilisasi Pemijaran

Peralatan dipanaskan di atas pembakar Bunsen hingga berpijar untuk mencapai sterilisasi penyalaan. Mulut tabung reaksi, tepi cawan petri, ujung pinset, dan ujung jarum suntik sering disterilkan menggunakan teknik ini untuk menghindari kontaminasi. Peralatan yang digunakan dalam sterilisasi jenis ini harus mampu menahan panas dan kerusakan akibat nyala api. (Akbar, 2021).

2. Sterilisasi Uap Air Panas

Nama lain untuk metode sterilisasi ini adalah tyndallization. Teknik sterilisasi ini bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme berbahaya dengan menggunakan uap air panas yang dihasilkan dari pemanasan air. Pendekatan ini melibatkan pemanasan uap sebanyak tiga kali. Proses penguapan dijalankan dengan interval 24 jam. Dengan mencegah pembentukan spora, interval waktu tersebut bertujuan untuk membasmi bakteri yang terkontaminasi. Metode sterilisasi uap air panas dapat digunakan untuk mensterilkan benda-benda yang rentan terhadap kerusakan pada suhu tinggi, seperti senyawa protein dan obat-obatan. Karena uap air panas yang dihasilkan oleh metode ini hanya 80–100°C, metode ini memiliki kekurangan yaitu tidak dapat mensterilkan spora mikroorganisme dalam satu sesi. (Akbar, 2021).

3. Sterilisasi Uap Air Panas Bertekanan

Proses sterilisasi ini menggunakan uap bertekanan tinggi. Autoklaf adalah peralatan yang digunakan dalam prosedur sterilisasi ini. Uap bertekanan lebih baik untuk sterilisasi karena dua faktor: tekanan dan uap. Partikel uap yang terkompresi cukup untuk membunuh spora bakteri, dan panas dari uap tersebut diyakini lebih efisien daripada panas oven dalam memanaskan seluruh permukaan instrumen.

Sterilisasi media, cairan, dan peralatan laboratorium merupakan penggunaan utama metode sterilisasi uap bertekanan ini. Jenis peralatan laboratorium berikut dapat didisinfeksi menggunakan metode ini:

- a. Peralatan yang terbuat dari plastik premium, termasuk Tefzel, polipropilena, politetrafluoroetilena (PTFE), polimetilpentena, dan polialloy.
- b. Peralatan gelas, seperti botol kultur, gelas kimia, dan pipet. (Bhojwani dan Dantu, 2013).

Lebih baik menggunakan autoklaf pada suhu tinggi untuk waktu yang singkat daripada pada suhu rendah untuk waktu yang lama untuk mencapai suhu dan tekanan standar yang dibutuhkan untuk sterilisasi. Suhu dan tekanan yang sering digunakan adalah 121°C/15 psi, 132°C/27 psi, dan 115°C/10 psi

(psi = pon per inci persegi). Namun, suhu dan tekanan yang paling banyak digunakan adalah 121°C/15 psi (Gupta dan Shukshith, 2016).

Terdapat jenis autoklaf dasar dan elektrik. Uap dari air hangat yang dialirkan ke autoklaf memberi daya pada autoklaf sederhana. Kompor atau pembakar Bunsen dapat digunakan untuk memanaskan air. Kuantitas panas dari pembakar mengatur suhu dan tekanan dalam autoklaf dasar ini. Keharusan untuk menjaga dan mengontrol panas secara manual selama sterilisasi merupakan kelemahan dari autoklaf ini. Namun, autoklaf ini memiliki keunggulan mudah digunakan, harga terjangkau, dan tidak bergantung pada listrik—fitur yang terkadang bermasalah di negara-negara terbelakang. Autoklaf yang lebih canggih membutuhkan listrik dan sumber daya. Autoklaf ini dilengkapi pengatur waktu. Autoklaf dapat digunakan saat proses lain sedang dilakukan jika kontrol otomatis ini berfungsi dengan benar. Kekurangannya adalah persiapan media terbuang sia-sia dan autoklaf dapat mengalami kerusakan total jika salah satu kontrol mengalami malfungsi. Uap dari ketel uap sentral biasanya digunakan dalam autoklaf besar di laboratorium bisnis. Air yang telah ditambahkan ke dalam autoklaf dan dididihkan berfungsi sebagai sumber uap. Autoklaf berkapasitas lebih besar, biasanya digerakkan oleh ketel uap terpisah, diperlukan untuk laboratorium komersial. Durasi sterilisasi dan pendinginan autoklaf ini dapat disesuaikan, dan beroperasi dengan sangat cepat. Setelah sterilisasi bahan atau instrumen selesai, suhu dan tekanan autoklaf diturunkan secara bertahap selama 15 hingga 20 menit. Penurunan tekanan yang cepat dapat menyebabkan cairan mendidih di dalamnya tumpah keluar. Panas ini dikontrol secara otomatis dalam autoklaf yang dapat diprogram. (Widyastuti dan Deviyanti, 2018).

4. Sterilisasi Panas Kering

Ide dasar di balik metode sterilisasi panas kering adalah mensterilkan benda-benda pada suhu tinggi menggunakan alat pemanas, seperti oven. Oven menghasilkan panas pada suhu 160 hingga 180°C selama proses sterilisasi. Sel bakteri, jamur, dan virus kehilangan cairan, mengalami dehidrasi, atau proteinnya

rusak saat terpapar suhu tinggi (Akbar, 2021). Peralatan yang tidak boleh basah dan terbuat dari bahan yang sulit meleleh, terbakar, atau berubah bentuk pada suhu tinggi disterilkan menggunakan panas kering.

Oven dapat digunakan untuk mensterilkan benda-benda berikut:

- a. Peralatan gelas (termasuk tabung reaksi, pipet, gelas kimia, gelas ukur, dan cawan petri)
- b. Serbuk (seperti sulfadiazin, seng oksida, dan pati)
- c. Bahan yang mengandung minyak
- d. Peralatan logam (seperti pisau, skalpel, dan gunting)

Sterilisasi panas kering dalam oven membunuh bakteri dan spora dengan menggunakan suhu yang sangat tinggi selama beberapa jam. Oven menggunakan konduksi untuk mensterilkan benda dengan memanaskan bagian luarnya, yang kemudian menyerap panas dan memindahkannya ke pusat benda. Untuk sterilisasi oven, suhu dan durasi yang sering digunakan adalah 170°C selama 30 menit, 160°C selama 60 menit, dan 150°C selama 150 menit (Alkadhim, 2018). Botol yang telah dibersihkan dimasukkan ke dalam oven dan dipanaskan hingga 160°C selama empat jam. Botol tersebut dapat disimpan atau digunakan segera setelah sterilisasi (Widyastuti dan Deviyanti, 2018). Karena sterilisasi peralatan dalam oven membutuhkan waktu yang lama, sebaiknya rencanakan terlebih dahulu dan pilih peralatan mana yang akan disanitasi dan kapan akan digunakan.

5. Sterilisasi Penyinaran UV

Memanfaatkan kemampuan sinar UV untuk membasmi kuman merupakan tujuan dari teknik sterilisasi iradiasi UV. Panjang gelombang antara 185 dan 254 nanometer (nm) merupakan panjang gelombang sinar UV yang paling efektif membunuh bakteri, jamur, dan virus. Karena radiasi UV dapat menembus membran sel dan memecah DNA serta RNA, ia membunuh mikroba. Ikatan hidrogen dalam DNA/RNA mikroorganisme terputus, yang mengganggu sintesis protein dalam sel. (Akbar, 2021).

6.3.3 Sterilisasi Kimia

Penggunaan bahan kimia yang bersifat mikrobisida, yaitu mampu membunuh mikroorganisme, merupakan dasar sterilisasi kimia. Tergantung pada tujuannya, bahan kimia yang digunakan dapat berupa disinfektan atau antiseptik. Ada banyak jenis disinfektan dan antiseptik, seperti triklosan, alkohol, formalin, asam karbol, hidrogen peroksida, dan yodium. Hanya permukaan dan peralatan laboratorium yang dapat disterilkan dengan sterilisasi kimia; bahan atau media tidak dapat disterilkan menggunakan metode ini. (Akbar, 2021).

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, R. A. (2021). Microbeholic. [Online] Available at: <https://www.microbeholic.com/2021/01/macam-macam-sterilisasi-dan-alat-yang-digunakan.html>.
- Alkadhim, S. A. S. (2018). Hot Air Oven for Sterilization: Definition & Working Principle. *SSRN Electronic Journal*. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3340325>
- Bhojwani, S.S., & Dantu, P.K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. 1 ed. India: Springer New Delhi.
- Gupta, N.V., & Shukshith K.S. (2016). Qualification of Autoclave. *International Journal of PharmTech Research*, 9(4), pp. 220-226. [https://sphinxsai.com/2016/ph_vol9_no4/1/\(220-226\)V9N4PT.pdf](https://sphinxsai.com/2016/ph_vol9_no4/1/(220-226)V9N4PT.pdf).
- Corina, I. P., Mukarlina & Linda, R. (2014). Respon Pertumbuhan Biji Jeruk Siam Seed (*Citrus nobilis* var microcarpa) dengan Penambahan Ekstrak Tauge dan Benzilaminopurine (BAP). *Jurnal Biologi Fakultas MIPA*, 3(2),120-124. <https://doi.org/10.26418/protobiont.v3i2.5519>.
- George, E.F., Hall, M.A., & De Klerk, G.J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer.
- Gunawan, I. (2007). *Perlakuan Sterilisasi Eksplan Anggrek Kuping Gajah (Bulbophyllum beccarii Rchb.F) Dalam Kultur In Vitro*. [Skripsi]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Jambak, M. N. A. (2011). *Metode Perbanyak Bahan Tanaman Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.) Secara Konvensional Dan Kultur Jaringan Di Unit Usaha Marihat Pusat Penelitian Kelapa Sawit Sumatra Utara*. [Skripsi]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Lukmana, M. dan Rahmawati, L. (2018). Sterilization Effectiveness of Rubber Leaf Explant (*Hevea brasiliensis*) In-Vitro Culture. *Bioprospek*, 13 (1), 19-25. <https://doi.org/10.30872/bp.v13i1.201>

- Nasution, S.S. (2013). *Pengaruh Teknik Sterilisasi terhadap Keberhasilan Inisiasi Eksplan Paulownia (Paulonia elongata SY. Hu) secara In Vitro*. [Skripsi]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Sandra, E., & Hapsiati. (2007a). *Panduan Materi Kultur Jaringan*. Bogor : Eshaflora.
- Sandra, E., & Hapsiati. (2007b). *Pengantar Praktikum Pelatihan Kultur Jaringan*. Bogor : Eshaflora.
- Sinaga E.I. (2024). *Pengaruh Konsentrasi Zeatin dan NAA terhadap Regenerasi Anggrek (Dendrobium sp) secara In-Vitro*. [Skripsi]. Pekanbaru: Universitas Islam Riau
- Smith, R.H. (2012). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. Academic Press.
- Trigiano, R.N., & Gray, D.J. (2011). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press.
- Widyastuti, N., & Deviyanti, J. (2018). *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik Perbanyakan Tanaman Secara In-Vitro*. Yogyakarta: Andi Yogyakarta.
- Zulkarnain. (2017). *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta : Bumi Aksara.

BAB 7

INDUKSI KALUS

Oleh Jamilatus Sa'diyah

7.1 Konsep dan Mekanisme Induksi Kalus

Berdasarkan konsep perkembangan tumbuhan, kalus merupakan massa sel tumbuhan yang tidak terorganisir, terbentuk melalui dediferensiasi sel somatik yang merespon luka, stres lingkungan, atau perlakuan hormon eksogenik. Sel-sel dalam kalus bersifat *pluripotent* yang memiliki potensi untuk berkembang menjadi berbagai jenis jaringan atau organ baru dalam kondisi kultur *in vitro* (Ikeuchi *et.al*, 2013). Ada berbagai tipe kalus, misalnya yang kompak atau longgar (*friable*), dan yang menunjukkan kemampuan regeneratif seperti "*shooty*", "*rooty*", atau "*embryonic*" tergantung jenis eksplan dan komposisi medium kultur. Perbedaan morfologi ini biasanya berkorelasi dengan profil ekspresi genetik dan molekuler yang berbeda antara satu kalus dengan kalus lainnya (Ikeuchi *et al.*, 2013).

Induksi kalus merupakan proses pembentukan massa sel tidak terdiferensiasi dari jaringan tanaman melalui teknik kultur *in vitro* (Vincent & Najini, 2024). Kalus ini berfungsi sebagai bahan dasar dalam regenerasi tanaman, produksi metabolit sekunder, dan transformasi genetik (Yulianti & Bustaman, 2019). Proses ini memanfaatkan totipotensi sel tanaman, yaitu kemampuan sel untuk berkembang menjadi individu baru (Azharia *et al.*, 2019). Dalam konteks bioteknologi tanaman, induksi kalus menjadi tahap awal yang krusial untuk berbagai aplikasi lanjutan seperti embriogenesis somatik dan mikropropagasi (Vincent & Najini, 2024). Kalus juga digunakan sebagai sistem model untuk studi fisiologi dan biokimia tanaman (Yulianti & Bustaman, 2019).

Salah satu aspek paling mendasar dalam induksi kalus adalah penggunaan *plant growth regulators* (PGRs) atau juga dikenal dengan zat pengatur tumbuh (ZPT) terutama auksin dan sitokinin, dalam rasio tertentu. Umumnya, medium dengan rasio *intermediate* antara

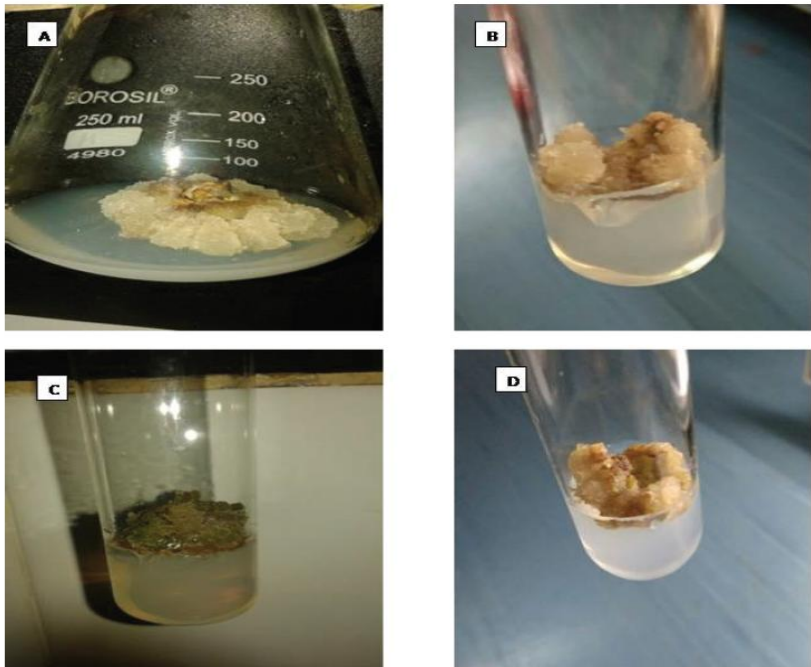
auksin dan sitokinin akan mendorong pembentukan kalus, sementara rasio auksin tinggi ke sitokinin mendorong pembentukan akar, dan rasio sitokinin tinggi ke auksin mendorong pembentukan tunas (Ikeuchi *et.al*, 2013). Auksin adalah hormon utama yang memicu dediferensiasi sel dan pembentukan kalus. Di dalam Arabidopsis, level auksin yang tinggi pada medium kultur menginduksi ekspresi faktor-respon seperti ARF7 dan ARF19, yang selanjutnya mengaktifkan gen-LBD (*Lateral Organ Boundaries Domain*) seperti LBD16, LBD17, LBD18, dan LBD29, yang penting untuk memulai proliferasi sel dan pembentukan kalus (Ma et al., 2022).

Interaksi antara auksin dan sitokinin sangat berpengaruh terhadap jenis jaringan yang dihasilkan dari kalus dan efisiensi induksinya. Sitokinin membantu dalam mempertahankan proliferasi sel setelah induksi awal oleh auksin dan dapat mengatur diferensiasi sel ke tunas atau organ lain jika rasio antara hormon berubah (Liu, Li & Xie, 2016). Sebaliknya, sitokinin yang terlalu tinggi atau dalam kondisi rasio yang tidak seimbang terhadap auksin akan menghambat atau merubah arah regenerasi dari sekadar proliferasi sel menjadi diferensiasi. Oleh karena itu, medium yang optimal biasanya mengandung kombinasi auksin: sitokinin yang telah dioptimalkan untuk spesies dan tipe eksplan tertentu.

Kombinasi spesifik seperti 2,4-D (auksin sintetis) dan BA atau BAP (*benzylaminopurine*, sitokinin) sering digunakan dalam kultur untuk jenis-eksplan tertentu agar induksi kalus efisien. Pengaturan kondisi kultur hormon ini juga mempengaruhi fase dediferensiasi, proliferasi sel, dan kemudian diferensiasi lanjutan. Berbagai penelitian terkait kombinasi PGRs telah banyak dilaporkan, salah satu contohnya adalah hasil penelitian pada tanaman *Vernonia anthelmintica* yang menunjukkan bahwa kombinasi IAA dan BA lebih cocok untuk induksi kalus pada tanaman ini (Gambar 7.1). Eksplan batang menghasilkan kalus berwarna krem kecokelatan yang longgar. Selain itu, ketika daun digunakan sebagai eksplan, pertumbuhan kalus lebih cepat dibandingkan dengan eksplan lain, yaitu batang, kotiledon, hipokotil, dan akar.

Pada tingkat molekuler, induksi kalus melibatkan aktivasi ulang gen-gen yang terkait dengan meristem akar dan "*stem cell niche*", sebagaimana terjadi pada pembentukan akar lateral, meskipun kalus

bukan akar secara normal (Ikeuchi et al., 2013). Contohnya, gen *WOX* (*Wuschel-Related Homeobox*), *PLT* (*Plethora*), *SCR* (*Scarecrow*), dan gen *ARF* (*Auxin Response Factor*) memainkan peran kunci dalam menandai sel pendiri akar (*root founder cells*) dalam membangun primordium akar dari kalus *pluripotent*. Selain itu, gen *LBD* juga diaktifkan dalam respons ke auksin dan berkontribusi dalam pembentukan struktur kalus yang mendekati identitas akar (Ikeuchi et al., 2013).



Gambar 7.1. Induksi kalus pada *V. anthelmintica*. (a) Pembentukan kalus dari eksplan daun pada medium yang mengandung IAA (1,5 mg) dan BA (1,5 mg). (b) Pembentukan kalus dari eksplan daun pada medium MS yang mengandung IAA (4 mg) dan Kn (0,5 mg). (c) Pembentukan kalus dari eksplan batang pada medium MS yang mengandung IAA (1,5 mg) dan BA (1,5 mg). (d) Kalus hijau padat diperoleh dari tunas aksilaris pada medium yang mengandung 3 mg l⁻¹ IBA dan 3 mg l⁻¹ BA. (Sumber : Rajan et.al., 2020)

7.2 Karakteristik Morfologi dan Potensi Regenerasi Kalus

Secara morfologis kalus dapat dikenali dari warna (putih, kuning, hijau), tekstur (kompak, friabel/longgar), dan jumlah ruang antar sel. Tipe friabel biasanya transparan atau pucat, sel-selnya longgar sehingga mudah pecah, sedangkan tipe kompak bersel rapat, lebih padat dan sering berwarna krem atau gelap; kedua tipe ini sering dikaitkan dengan perbedaan kemampuan regenerasi. Observasi pada berbagai spesies modern menunjukkan klasifikasi morfologi ini tetap relevan untuk menilai kualitas materi reseptor dalam prosedur transformasi dan regenerasi *in vitro* (Long et al., 2022).

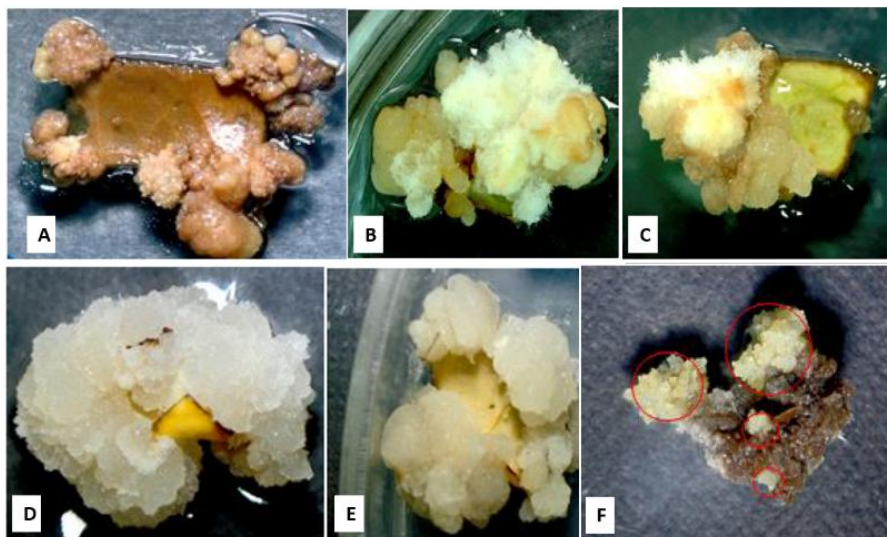
Penampilan permukaan kalus, misalnya kalus dengan permukaan granuler dengan halus halus, atau kalus dengan permukaan *glossy* dengan kusam, serta tonalitas warnanya seringkali berkorelasi dengan kemampuan membentuk tunas atau embrio somatik. Studi kuantitatif pada beberapa tanaman budidaya menunjukkan bahwa kalus yang lebih granular, terang, dan friabel cenderung memberi respon regeneratif lebih tinggi untuk *somatic embryogenesis*; sebaliknya kalus yang lebih gelap dan kompak lebih sering menunjukkan organogenesis terbatas atau regenerasi lebih lambat. Temuan klasik pada kopi Arabika juga memperlihatkan bahwa kalus dengan morfologi friabel berwarna kekuningan memiliki peluang lebih besar membentuk embrio somatik dibanding kalus yang keras dan kecoklatan (Arimarsetiowati, 2010; Ratjens et al., 2018).

Potensi regeneratif kalus tidak selalu stabil; banyak kultur embriogenik menunjukkan penurunan kemampuan membentuk embrio atau tunas setelah subkultur berulang, fenomena ini terkait perubahan fisiologi, akumulasi metametabolit, dan kadang perubahan epigenetik. Namun studi modern juga menunjukkan bahwa dengan medium dan siklus subkultur terkontrol misalnya dengan pemilihan ZPT dan siklus peremajaan, beberapa garis kalus dapat mempertahankan sifat friabel dan embriogenik dalam jangka menahun, sehingga memungkinkan pemeliharaan lini rekayasa genetik atau bioteknologi (Long et al., 2022).

Berdasarkan hasil penelitian Arimarsetiowati (2010) dilaporkan bahwa karakteristik morfologi kalus kopi arabika dapat dibedakan menjadi dua jenis yaitu;

1. Kalus yang tidak berpotensi menjadi embrio somatik meliputi kalus nodular dan nekrotik dengan ciri tekstur keras, berwarna coklat gelap, dan berbentuk bulat menggerombol. Kalus kompak dengan ciri tekstur yang kompak dan pada bagian permukaan berwarna putih, kadang disertai dengan serabut-serabut seperti kapas, dan kalus Aqueous yang hampir sama dengan tipe kalus kompak namun teksturnya lebih lembut, basah, dan berair,
2. Kalus embrionik yang berpotensi menjadi embrio somatik dengan ciri tekstur remah, *friable*, berpasir, berbutir-butir, dan biasanya berwarna kekuningan (Gambar 9.2).

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa salah satu faktor penentu keberhasilan dalam perbanyakan embrio somatik adalah pemilihan kalus embriogenik yang tepat. Jika seorang peneliti salah dalam memilih kalus embriogenik maka akan berakibat fatal untuk tahapan embrio somatik selanjutnya. Pemilihan kalus embriogenik yang tidak tepat akan mengakibatkan embrio yang dihasilkan tidak sempurna dan pertumbuhan planlet tidak akan optimal.



Gambar 7.2. Ragam keragaan kalus kopi arabika. (A) Kalus nodular dan nekrotik. (B-C) Kalus Kompak. (D-E) Kalus Aqueous. (F) Kalus Embriionik ditandai lingkaran merah. (Sumber : Arimarsetiowati, 2010)

Dalam aplikasi praktis seperti transformasi genetik, propagasi massal, dan konservasi *germplasm*, karakter morfologi kalus dijadikan indikator awal untuk memilih target kultur. Kalus friabel dan embriogenik umumnya menjadi pilihan utama untuk tujuan transformasi karena kemudahan penanganan dan frekuensi regenerasi yang tinggi; laporan terbaru pada teh dan spesies obat juga menegaskan bahwa optimasi ZPT dan pemilihan eksplan meningkatkan efisiensi regenerasi hingga signifikan. Dengan demikian, integrasi penilaian morfologi, analisis histologis, dan pengalaman terdahulu dari studi kopi Arabika hingga tanaman modern lain, membentuk strategi yang paling efektif untuk mencapai regenerasi yang dapat dipakai dalam program perbaikan tanaman modern (Ratjens *et al.*, 2018; Arimarsetiowati, 2010).

7.3 Faktor yang Mempengaruhi Induksi Kalus

Induksi kalus merupakan salah satu tahap penting dalam kultur jaringan tanaman, karena dari proses inilah sel-sel somatik dapat mengalami dediferensiasi dan berkembang menjadi sumber

utama regenerasi maupun produksi metabolit sekunder. Pemahaman mengenai faktor-faktor yang memengaruhi keberhasilan induksi kalus sangat diperlukan agar proses kultur dapat berlangsung optimal dan sesuai dengan tujuan penelitian atau aplikasi praktis. Faktor-faktor yang memengaruhi induksi kalus antara lain;

1. Jenis dan kondisi fisiologis eksplan

Faktor ini merupakan faktor fundamental dalam keberhasilan induksi kalus. Eksplan daun, batang, akar, tunas, hipokotil, kotiledon, dan embrio muda atau matang digunakan dalam berbagai penelitian, akan tetapi eksplan embrionik muda akan lebih responsif untuk kalus embriogenik jika dibanding eksplan dewasa. Hal ini terjadi karena tingkat dediferensiasi dan aktivitas selnya lebih tinggi. Studi pada *Peucedanum praeruptorum* menunjukkan bahwa penggunaan daun muda memberikan frekuensi induksi kalus yang lebih besar dibanding jaringan yang lebih tua (Pan et al., 2024). Dengan demikian, pemilihan eksplan yang tepat akan sangat menentukan arah perkembangan kalus, baik menuju sifat morfogenik maupun non-morfogenik.

2. Medium kultur

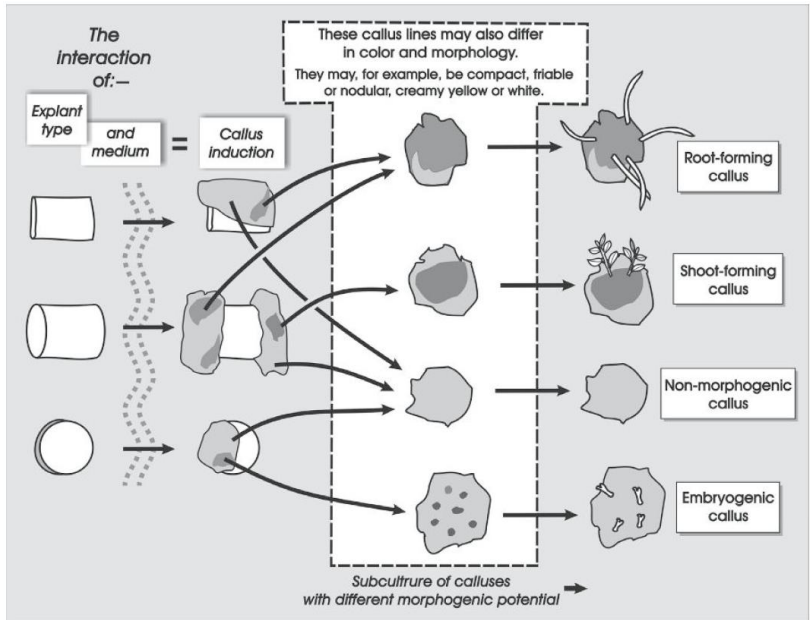
Komposisi medium dasar serta kombinasi ZPT, menjadi faktor penentu dalam pembentukan dan diferensiasi kalus. Umumnya, auksin (misalnya 2,4-D) dikombinasikan dengan sitokinin (misalnya BAP atau kinetin) untuk memicu dediferensiasi sel dan pembentukan kalus. Penelitian terbaru pada teh (*Camellia sinensis*) menunjukkan bahwa rasio auksin-sitokinin yang seimbang menghasilkan kalus friabel dengan kemampuan regenerasi lebih baik (Zhang et al., 2021). Artinya, pengaturan konsentrasi dan interaksi ZPT merupakan kunci dalam menentukan kualitas kalus.

3. Genotipe atau Varietas

latar belakang genetik tanaman donor juga memengaruhi keberhasilan induksi kalus. Genotipe tertentu cenderung lebih responsif terhadap kultur jaringan dibanding yang lain, bahkan

dalam kondisi media dan perlakuan yang sama. Misalnya, penelitian pada larix hibrida menunjukkan perbedaan signifikan pada frekuensi kalus embriogenik antar genotipe, yang berimplikasi pada keberhasilan regenerasi (Zhang et al., 2021). Faktor genetik ini menegaskan pentingnya seleksi varietas dalam penelitian dan aplikasi kultur in vitro. Kondisi lingkungan kultur seperti cahaya, suhu, dan kelembapan relatif juga sangat memengaruhi induksi kalus. Cahaya rendah atau gelap biasanya mendukung pembentukan kalus awal, sementara paparan cahaya dapat mengarahkan diferensiasi lebih lanjut. Studi pada *Cyclamen persicum* memperlihatkan bahwa kondisi cahaya memengaruhi pembentukan kalus embriogenik yang selanjutnya menjadi target transformasi genetik (Ratjens et al., 2018). Oleh karena itu, pengendalian lingkungan kultur perlu disesuaikan dengan tujuan akhir regenerasi.

George, Hall & De Klerk (2008) menegaskan bahwa interaksi antara jenis eksplan dan medium kultur tidak hanya memicu pembentukan kalus, tetapi juga menentukan potensi morfogeniknya. Seperti tergambar dalam skema mereka, satu jenis eksplan dapat menghasilkan berbagai tipe kalus—baik yang membentuk akar, tunas, non-morfogenik, maupun embriogenik—bergantung pada kondisi medium dan subkultur. Perbedaan morfologi (kompak, friabel, nodular, warna krem hingga putih) merupakan indikator penting yang dapat dipakai untuk memprediksi arah perkembangan kalus. Konsep ini menempatkan faktor eksplan dan medium sebagai kunci utama dalam pengendalian induksi kalus.



Gambar 7.3. Kalus dengan potensi morfogenik yang berbeda seringkali diisolasi dari satu eksplan. (Sumber : George et.al., 2008)

4. Stabilitas kalus

Dalam kondisi subkultur berulang, stabilitas kondisi kalus sangat penting untuk diperhatikan. Stabilitas ini dipengaruhi oleh kombinasi faktor eksplan, medium, genotipe, dan lingkungan. Beberapa kalus dapat kehilangan sifat morfogeniknya seiring waktu, sementara yang lain mampu dipertahankan dengan optimasi kondisi kultur. Penelitian pada berbagai spesies menunjukkan bahwa strategi pemilihan eksplan muda, penggunaan rasio ZPT tepat, dan pengendalian lingkungan kultur dapat mempertahankan potensi regeneratif kalus lebih lama (Long et al., 2022; Pan et al., 2024). Hal ini memiliki implikasi penting dalam aplikasi bioteknologi tanaman, baik untuk transformasi genetik maupun produksi metabolit sekunder.

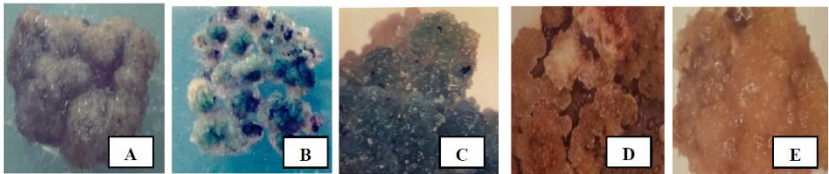
7.4 Aplikasi Induksi Kalus

Perkembangan teknik kultur jaringan telah menempatkan induksi kalus sebagai salah satu fondasi utama dalam bioteknologi tanaman. Kalus yang terbentuk tidak hanya berfungsi sebagai hasil dediferensiasi sel, tetapi juga memiliki berbagai potensi pemanfaatan yang dapat menunjang perbanyakan, perbaikan, hingga konservasi tanaman. Induksi kalus menjadi dasar bagi sistem perbanyakan klonal untuk spesies yang sulit diperbanyak secara generatif atau vegetatif konvensional. Dengan mengoptimalkan eksplan dan kombinasi ZPT, kalus embriogenik dapat dikembangkan menjadi embrio somatik yang selanjutnya diregenerasi menjadi tanaman utuh, metode ini memungkinkan produksi massal tanaman seragam dalam waktu singkat. Penerapan protokol kalus-embriogenesis telah berhasil meningkatkan efisiensi perbanyakan komersial pada beberapa tanaman kehutanan dan hortikultura, menunjukkan peran strategis kalus dalam skala produksi tanaman unggul. (Zhang S. et al., 2021).

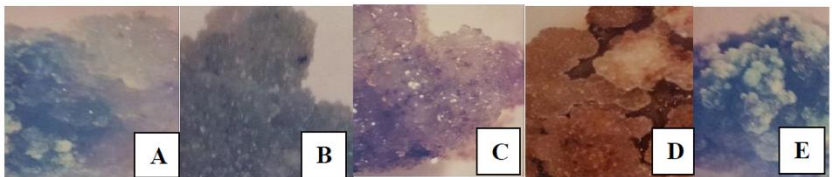
Kalus friabel dan embriogenik juga seringkali dipilih sebagai target utama untuk transformasi genetik karena sel-sel yang relatif mudah diakses dan dapat diregenerasi kembali menjadi tanaman lengkap setelah integrasi gen asing. Banyak protokol *Agrobacterium-mediated transformation* memanfaatkan kalus tertentu untuk meningkatkan frekuensi transformasi dan regenerasi setelah seleksi. Perbaikan kondisi induksi kalus dan subkultur juga berdampak langsung pada keberhasilan transformasi, sehingga riset terkini menekankan penyesuaian protokol kalus untuk setiap genotipe tanaman target (Ratjens et al., 2018; Zhang S. et al., 2021).

Kalus dapat dimanfaatkan untuk produksi metabolit sekunder dalam skala besar, seperti alkaloid, flavonoid, dan senyawa obat lainnya yang bernilai ekonomi. Kultur kalus dalam sistem suspensi sel atau bioreaktor memungkinkan skala produksi yang terkontrol dan bebas musim. Kultur suspensi sel merupakan salah satu teknik kultur *in vitro* dengan menumbuhkan sel atau agregat sel yang disuspensikan dalam media cair yang mengandung nutrisi dan hormon tertentu. Sel-sel tersebut umumnya diinisiasi dari kalus yang remah dan diberi aerasi dengan menggunakan *shaker* (Zulkarnain, 2009). Salah satu penelitian yang dilakukan Mahdi dkk. (2021)

terkait kultur suspensi sel tanaman gajah beranak (*Goniiothalamus Tapis* Miq) terhadap kandungan zat goniotalamin menunjukkan bahwa terdapat lima jenis media terbaik yang digunakan dalam kultur suspensi sel dari kalus yaitu D5B0,5; D5B1; D5B2; D10B0,5; dan D10B1, kombinasi media tersebut mampu menghasilkan pertumbuhan sel yang cepat, bertekstur padat, tidak berair, serta mudah dipisahkan (Gambar 7.4). Perlakuan elicitor atau modifikasi medium dapat meningkatkan akumulasi metabolit target. Literatur terbaru melaporkan protokol induksi dan pemeliharaan kalus yang memaksimalkan hasil metabolit pada spesies obat dan tanaman komersial memperlihatkan potensi bioteknologi komersial dari kalus. (Long et al., 2022).



Tekstur kalus yang dibentuk pada setiap perlakuan: A. Tektur padat (*Kompak*) berwarna kehijauan perlakuan D₃B₀, D₃B_{0,5}, D₅B₀, B. Tektur semi remah (*Intermediet*) berwarna kehijauan perlakuan D₅B₁, D₃B₂ C. Tektur remah (*friable*) berwarna hijau muda perlakuan D₅B_{0,5}, D₅B₁, D₅B₂, D₁₀B₁, D. Tektur remah (*friable*) kuning kecoklatan perlakuan D₁₀B_{0,5}, E. Kalus lembek berair (*fleshy*) pada D₁₀B₂.



Kalus yang bertekstur Remah (*Friable*) yang digunakan pada kultur suspensi sel. Perlakuan D₅B_{0,5}, B. Perlakuan D₅B₁, C. Perlakuan D₅B₂, D. Perlakuan D₁₀B_{0,5}, dan E. Perlakuan D₁₀B₁

Gambar 7.4. Kalus tanaman *Goniiothalamus Tapis* Miq.
(Sumber : Mahadi dkk., 2021)

Kalus yang mengandung embrio somatik dapat dikembangkan menjadi *synthetic seeds* yang merupakan unit dorman yang dapat disimpan, ditransportasikan, dan dikecambahkan menjadi tanaman sehingga menawarkan strategi konservasi dan penyebaran genetik untuk spesies langka atau belum dapat ditangani

oleh metode konvensional. Selain itu, kalus embriogenik yang distabilkan sebelum kriopreservasi menjadi strategi konservasi jangka panjang yang praktis untuk koleksi genetik tanaman. Studi-studi terbaru menguatkan bahwa optimasi kondisi induksi kalus mempengaruhi kelangsungan hidup setelah penyimpanan dan kemampuan regenerasi pasca-kriopreservasi (Pan et al., 2024).

Induksi kalus dapat menunjukkan sistem eksperimen yang fleksibel untuk mempelajari mekanisme dediferensiasi, regulasi gen meristem, dan interaksi hormon pada tingkatan seluler dan molekuler. Karena kalus dapat dihasilkan dalam jumlah besar dan distandarisasi, ia memfasilitasi analisis transcriptomics, epigenomics, dan pengujian *small molecules* yang memodulasi pluripotensi. Beberapa penelitian baru telah menggunakan kalus untuk mengidentifikasi gen dan jalur yang mengatur regenerasi, sehingga berdasarkan hal tersebut, induksi kalus juga dapat berkontribusi pada desain strategi perbaikan tanaman berbasis molekuler (Long et al., 2022; Zhang S. et al., 2021).

Dalam konteks pemuliaan modern, induksi kalus mempercepat proses pengembangan varietas melalui kombinasi dengan teknik seperti seleksi somaklonal, transformasi gen target, dan regenerasi cepat dari material hasil *gen editing*. Kalus juga memungkinkan pengujian fenotipik dan metabolik awal untuk *strain* yang telah dimodifikasi, sehingga memperpendek siklus seleksi. Laporan terbaru mendokumentasikan aplikasi kalus dalam pengembangan varietas teh dan tanaman obat, dengan cara optimalisasi induksi dan regenerasi meningkatkan perbaikan varietas secara signifikan. (Zhang X.-L. et al., 2025; Pan et al., 2024).

7.5 Tantangan dan Prospek Penelitian Induksi Kalus

Tantangan utama dalam penelitian induksi kalus berkaitan dengan perbedaan respon genotipe terhadap media kultur. Setiap spesies bahkan kultivar dalam satu jenis tanaman dapat menunjukkan variasi signifikan dalam frekuensi dan kualitas kalus yang terbentuk, sehingga sulit membuat protokol yang seragam. Penelitian pada padi menunjukkan bahwa variabilitas genotipe memengaruhi laju dediferensiasi dan pembentukan embrio somatik (Saharan et al., 2017). Hal ini menegaskan perlunya optimasi spesifik

untuk setiap varietas agar efektivitas kultur jaringan lebih terjamin (Bairu et al., 2016). Faktor hormonal juga menjadi tantangan besar dalam induksi kalus. Perbedaan konsentrasi dan kombinasi auksin serta sitokinin sering kali menghasilkan tipe kalus yang bervariasi, mulai dari embrionik hingga non-embriogenik.

Penelitian pada tomat menunjukkan bahwa keseimbangan hormon menentukan kemampuan regeneratif kalus (Zhang et al., 2018). Selain itu, dinamika sensitivitas jaringan terhadap hormon eksogen menambah kompleksitas dalam menentukan komposisi media yang optimal (Xu et al., 2020). Aspek kontaminasi dan kondisi kultur in vitro turut menjadi kendala serius. Kalus rentan terhadap serangan mikroorganisme, baik bakteri maupun fungi, yang dapat menghambat pertumbuhan atau menyebabkan kematian jaringan. Studi pada kultur jahe menekankan bahwa keberhasilan induksi kalus sangat dipengaruhi oleh tingkat kebersihan eksplan dan media (Sinha et al., 2019). Oleh karena itu, pengembangan teknik sterilisasi yang lebih efisien dan ramah jaringan sangat dibutuhkan (Patel et al., 2021).

Meskipun banyak tantangan dalam melakukan induksi kalus, akan tetapi prospek penelitian induksi kalus sangat menjanjikan terutama dalam produksi metabolit sekunder yang bernilai ekonomi. Kalus dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan aktif farmasi, misalnya produksi alkaloid pada *Catharanthus roseus* (Roy et al., 2020). Pendekatan ini berpotensi mengurangi ketergantungan pada tanaman lapangan yang sering menghadapi masalah lingkungan dan ketersediaan sumber daya (Ali et al., 2022). Selain itu, induksi kalus menawarkan prospek dalam konservasi dan perbaikan genetik tanaman. Kalus embriogenik dapat digunakan dalam transformasi genetik untuk menciptakan varietas unggul dengan ketahanan biotik maupun abiotik. Studi terbaru pada gandum menunjukkan bahwa kultur kalus membuka peluang bagi perakitan varietas tahan cekaman kekeringan (Wang et al., 2019). Dengan demikian, teknologi ini mendukung agenda ketahanan pangan global (Nawaz et al., 2022).

Integrasi teknologi molekuler dan kultur kalus menjadi arah prospektif penelitian di masa depan. Pendekatan omics (genomik, transkriptomik, dan metabolomik) dapat membantu memahami mekanisme molekuler induksi kalus serta meningkatkan efisiensi regenerasi (Chen et al., 2021). Penggabungan dengan teknologi

CRISPR-Cas juga memberi peluang manipulasi gen yang lebih presisi untuk mempercepat regenerasi dan memperluas aplikasi bioteknologi tanaman (Li et al., 2020). Dengan arah ini, induksi kalus diproyeksikan bukan hanya sebagai teknik kultur jaringan, tetapi juga platform utama inovasi bioteknologi tanaman modern.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A., Khan, M. and Rehman, R. (2022) 'Secondary metabolite production through callus cultures: a sustainable approach for pharmaceuticals', *Plant Cell Reports*, 41(5), pp. 1121–1134.
- Arimarsetiowati, R. (2010) Keragaan kalus dalam pembentukan embrio somatik pada kopi Arabika. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Tersedia di: <https://warta.iccri.net/wp-content/uploads/2023/06/2.-Rina-Arimarsetiowati-Keragaan-Kalus-dalam-Pembentukan-Embrio-Somatik-pada-Kopi-Arabika.pdf>
- Azharia, N., et al. (2019). Induksi Kalus Anggrek Lilin dengan Kombinasi ZPT. *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 10(1), 33–41.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O. and Van Staden, J. (2016) 'Somaclonal variation in plants: causes and applications', *Plant Growth Regulation*, 84(2), pp. 153–173.
- Chen, J., Li, Y. and Xu, L. (2021) 'Omics approaches to study callus induction and plant regeneration', *Frontiers in Plant Science*, 12, 678452.
- George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.-J. (2008) *Plant propagation by tissue culture: Volume 1. The background*. 3rd edn. Dordrecht: Springer.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. & Iwase, A., 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9), pp.3159-3173.
- Li, H., Wang, Y. and Zhao, X. (2020) 'CRISPR-Cas-mediated genome editing in plant tissue culture: progress and prospects', *Plant Biotechnology Journal*, 18(9), pp. 1772–1788.
- Liu, Y., Li, Z. & Xie, Q., 2016. Repression of callus initiation by the miRNA-directed interaction of auxin –cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 85(1), pp.62-75.
- Long, Y., Yang, Y., Pan, G. & Shen, Y., 2022. *New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms*. *Frontiers in Plant Science*, 13, article 926752.
- Ma, Y., Wang, Y., Chen, X., Xu, Y., Sun, H., & Qian, W., 2022. High auxin stimulates callus through SDG8-mediated histone H3K36 methylation in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*.

- Mahadi, I., Wulandari, S., Safii, W., & Sayuti, I. (2021). Kultur suspensi sel tanaman gajah beranak (*Goniotalamus tapis* Miq) terhadap kandungan zat goniotalamin. *Jurnal Agro*, 8(2), 247-261. <https://doi.org/10.15575/14710>
- Nawaz, M.A., Lin, X. and Chung, G. (2022) 'Callus-mediated plant transformation: an update on recent advances and future prospects', *Biotechnology Advances*, 58, 107908.
- Pan, H., Liao, R., Zhang, Y., Arif, M., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, Y., Zhao, P., Wang, Z., Han, B., Song, C. & Cheng, S., 2024. Establishment of callus induction and plantlet regeneration systems of *Peucedanum praeruptorum* Dunn based on the tissue culture method. *Plant Methods*, 20, article 174.
- Patel, D., Singh, A. and Sharma, R. (2021) 'Minimizing microbial contamination in plant tissue culture: strategies and challenges', *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(1), pp. 42–51.
- Rajan Maya, Shahena Soororbhavan, Vinaya Chandran, Linu Mathew. 2020. Callus induction, Indirect Organogenesis and Plantlet Regeneration from different explants of *Vernonia anthelmintica* (L.) Willd. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* Vol. 8(03), pp. 17-22. Available online at <http://www.jabonline.in> DOI: 10.7324/JABB.2020.80304
- Ratjens, S., Mortensen, S., Kumpf, A., Bartsch, M. & Winkelmann, T., 2018. *Embryogenic callus as target for efficient transformation of Cyclamen persicum enabling gene function studies*. *Frontiers in Plant Science*, 9, article 1035.
- Roy, S., Ghosh, P. and Jha, S. (2020) 'Enhancing alkaloid production through callus cultures of *Catharanthus roseus*', *Industrial Crops and Products*, 154, 112668.
- Saharan, V., Yadav, R.C. and Singh, N. (2017) 'Genotypic variation for callus induction and plant regeneration in indica rice', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3), pp. 657–668.
- Sinha, P., Kumari, P. and Singh, A.K. (2019) 'Influence of sterilization methods on callus induction in ginger (*Zingiber officinale*)', *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7(2), pp. 36–42.
- Vincent, A., & Najini, R. (2024). Pengaruh Variasi Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) dalam Induksi Kalus Embriogenik. *Journal Pharmacy of Tanjungpura*.

- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2019) 'Plant responses to drought stress and the role of tissue culture in developing tolerant cultivars', *Plant Biotechnology Journal*, 17(6), pp. 1183–1198.
- Xu, L., Zhang, S. and Chen, J. (2020) 'Hormonal regulation of callus formation and regeneration in plants', *Plant Science*, 293, 110406.
- Yulianti, S., & Bustaman, M. (2019). Efektivitas 2,4-D dan BAP dalam Induksi Kalus Daun Cengkeh. *Jurnal Bioteknologi Tropika*, 7(2), 45–52.
- Zhang, S., Yan, S., An, P., Cao, Q., Wang, C., Wang, J., Zhang, H. & Zhang, L., 2021. Embryogenic callus induction from immature zygotic embryos and genetic transformation of *Larix kaempferi* × *Larix gmelinii*. *PLoS ONE*, 16(10), e0258654.
- Zhang, Y., Li, X. and Xu, B. (2018) 'Effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration in tomato', *Horticultural Plant Journal*, 4(2), pp. 85–90.
- Zulkarnain. 2014. *Solusi perbanyak Tanaman Budi Daya Kultur Jaringan Tanaman*. Bumi Aksara: Jakarta

BAB 8

EMBRYOGENESIS SOMATIC

Oleh Sri Nopitasari

8.1 Pendahuluan

Embriogenesis somatik (ES) adalah proses pembentukan embrio tanaman dari sel somatik atau sel vegetatif tanpa melalui fertilisasi. Embrio yang terbentuk dapat berkembang menjadi tanaman lengkap (plantlet) yang identik secara genetik dengan induknya (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016). Proses ini dapat terjadi secara **langsung** (*direct somatic embryogenesis*) dari jaringan tanpa fase kalus, maupun **tidak langsung** (*indirect somatic embryogenesis*) melalui fase kalus embriogenik (Ikeuchi et al., 2013).

Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik kultur in vitro yang memungkinkan sel somatik atau jaringan tanaman berdiferensiasi membentuk struktur mirip embrio zigotik tanpa melalui proses fertilisasi. Teknologi ini menjadi salah satu pendekatan penting dalam bioteknologi tanaman untuk mempercepat perbanyakan massal klon unggul, produksi benih sintesis (*synthetic seeds*), konservasi plasma nutfah melalui kriopreservasi dan transformasi genetik atau rekayasa genetika (Thorpe, 2000; Fehér, 2015).

Saat ini, ES banyak dimanfaatkan untuk komoditas perkebunan (kelapa sawit, kakao, kopi), tanaman pangan (padi, jagung, pisang), serta tanaman hortikultura dan kehutanan (Xu & Huang, 2014; Martínez, 2024). Selain nilai aplikatif, ES juga memiliki nilai ilmiah yang tinggi. Proses ini membuka pemahaman baru tentang totipotensi sel tumbuhan, regulasi hormonal, serta mekanisme epigenetik yang memungkinkan diferensiasi sel somatik kembali ke jalur embrionik (Singla et al., 2019).

8.2 Sejarah Dan Dasar Teori Embriogenesis Somatik

8.2.1 Sejarah

Embriogenesis somatik (ES) pertama kali dilaporkan pada awal 1950-an melalui penelitian pada *Daucus carota* (wortel), bahwa sel somatik memiliki kemampuan totipotensi untuk berdiferensiasi kembali menjadi embrio bipolar lengkap (Xu & Huang, 2014). Hal ini menjadi dasar dalam bioteknologi tanaman. Pada dekade 1970–1990, ES berkembang pesat dan diaplikasikan pada berbagai spesies tanaman, antara lain pohon kehutanan seperti *Picea abies* dan *Pinus taeda*, tanaman perkebunan bernilai ekonomi tinggi seperti kakao (*Theobroma cacao*) dan kelapa sawit (*Elaeis guineensis*), yang menjadikannya alternatif strategis dalam perbanyakan vegetatif skala besar dan program perbaikan genetik (Martínez, 2024).

Fokus penelitian ES bergeser pada tingkat molekuler dan epigenetik pada abad ke-21. Regulasi jalur embriogenik diketahui melibatkan faktor transkripsi utama seperti LEC (*Leafy Cotyledon*), BBM (*Baby Boom*), SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*), dan WUS (WUSCHEL), berperan dalam reprogramming sel somatik menuju fase embrionik (Su et al., 2021). Perubahan epigenetik seperti metilasi DNA dan modifikasi histon berperan mengatur ekspresi gen embriogenik, menunjukkan mekanisme regulasi. Hal ini membuka peluang penerapan ES dalam transformasi genetik, genome editing, produksi benih sintetis, serta konservasi plasma nutfah jangka panjang untuk mendukung ketahanan pangan dan biodiversitas global.

8.2.2 Dasar Teori

Embriogenesis somatik (ES) memiliki dasar teori pendukung yaitu totipotensi sel. Teori ini mendasari bidang ilmu kultur jaringan tumbuhan yang dapat diimplementasikan untuk bidang bioteknologi tanaman. Totipotensi adalah kemampuan sel untuk membentuk organisme lengkap. Konsep ini pertama kali diperkenalkan oleh Haberlandt (1902), yang menjadi dasar kultur jaringan modern.

8.3 Definisi Dan Tahapan Embriogenesis Somatik

8.3.1 Definisi Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik (ES) adalah proses pembentukan embrio bipolar lengkap (memiliki meristem pucuk dan akar) dari sel somatik atau sel vegetatif melalui kultur *in vitro* tanpa melalui proses fertilisasi. ES mencerminkan **totipotensi** sel tumbuhan, yaitu kemampuan sel untuk meregenerasi individu baru yang utuh (Gaj, 2004; Fehér, 2015). Embrio somatik dapat tumbuh menjadi tanaman lengkap (plantlet) yang secara genetik identik dengan tanaman induk. Oleh karena itu, ES menjadi teknik penting dalam perbanyakan vegetatif, konservasi, pemuliaan tanaman, dan rekayasa genetik.

8.3.2 Perbedaan Embriogenesis Somatik dan Zigotik

Tabel 8.1. Perbedaan Embriogenesis Somatik dan Zigotik

Aspek	Embrio Somatik	Embrio Zigotik
Asal Usul	Sel somatik (daun, akar, batang, embrio imatur)	Sel hasil fertilisasi (zigot)
Proses Pembentukan	Induksi melalui kultur jaringan dan zat pengatur tumbuh	Terjadi secara alami melalui pembuahan
Variasi Genetik	Genetik identik dengan induknya (klonal)	Mengandung kombinasi genetik baru dari induk jantan dan betina
Kegunaan	Perbanyakan massal, transformasi genetik, kriopreservasi, produksi benih sintetis	Perkembangbiakan generatif alami
Tahapan Perkembangan	Globular → Heart → Torpedo → Cotyledonary	Globular → Heart → Torpedo → Cotyledonary

(Sumber : Quiroz-Figueroa et al.,2006 ; von Arnold et al., 2002)

8.3.3 Tipe Embriogenesis Somatik

Embrio Somatik dapat dibagi menjadi dua tipe:

1. **Embrio Somatik Langsung (*Direct Somatic Embryogenesis*)**
 - a. Embrio terbentuk langsung dari sel eksplan tanpa melalui fase **callus**.
 - b. Lebih cepat dan mengurangi risiko variasi somaklonal.
 - c. Biasanya terjadi pada eksplan muda atau embrio imatur.
 - d. Contoh: *Coffea arabica*, *Arabidopsis thaliana* (Su et al., 2021; Quiroz-Figueroa et al., 2006).
2. **Embrio Somatik Tidak Langsung (*Indirect Somatic Embryogenesis*)**
 - a. Embrio terbentuk melalui callus embrionik yang mengalami dediferensiasi lalu membentuk *proembryogenic masses* (PEMs).
 - b. Menghasilkan embrio dalam jumlah besar, cocok untuk kultur suspensi.
 - c. Risiko variasi somaklonal tinggi, waktu regenerasi lebih lama
 - d. Contoh: *Daucus carota*, kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) (Singla et al., 2019; von Arnold et al., 2002).

8.3.4 Tahapan Embriogenesis Somatik

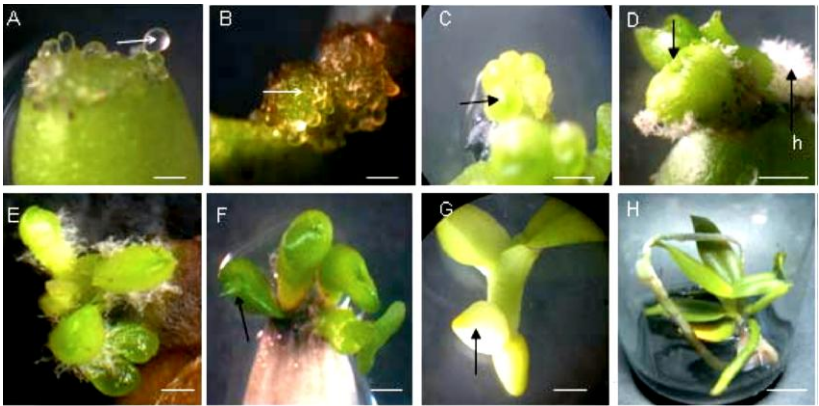
Secara umum, tahapan ES dapat dibagi menjadi empat fase utama:

1. **Induksi Embrio Somatik**
 - a. Eksplan (misalnya daun muda, embrio imatur, atau jaringan meristematik) diletakkan pada medium dengan konsentrasi tinggi auxin (misalnya 2,4-D atau picloram).
 - b. Sel mengalami dediferensiasi, membentuk *callus embrionik* atau langsung berkembang menjadi embrio somatik (*direct somatic embryogenesis*).
 - c. Pada tahap ini, gen *BBM*, *LEC*, dan *SERK* aktif untuk menginisiasi kompetensi embriogenik (Gaj, 2004).
2. **Proliferasi Massa Embrionik**
 - a. Sel-sel embrionik berkembang menjadi *proembryogenic masses* (PEMs).

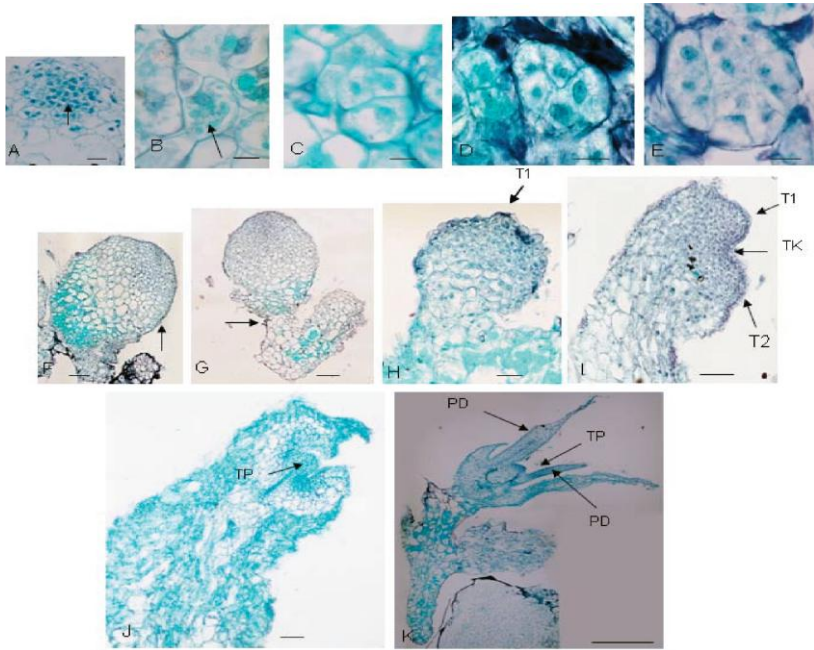
- b. Kultur suspensi sering digunakan pada tahap ini untuk menghasilkan embrio dalam jumlah besar (von Arnold et al., 2002).

3. Maturasi Embrio Somatik

- a. Embrio berkembang melalui fase globular, heart, torpedo, hingga *cotyledonary stage*, mirip dengan embrio zigotik.



Gambar 8.1. Perkembangan embrio somatik anggrek bulan *Phamabilis* (L.) Bl. secara *in vitro*. A. Pembentukan kalus (panah) pada daerah luka bekas irisan 1 minggu setelah dikultur pada MIES (Bar = 2 mm). B. Kalus embriogenik (panah) 4 minggu setelah dikultur pada MIES (Bar = 2 mm). C. Pembentukan embrio globular (panah) pada minggu ke-6 setelah dikultur pada MIES (Bar = 2 mm). D. Embrio dengan takik (panah) di bagian dorsal dan rambut akar (h), 2–3 minggu setelah dikultur pada MME (Bar = 1 mm). E. Embrio memanjang setelah 2 minggu dikultur di dalam MPE (Bar = 3 mm). F. Embrio berkecambah setelah 3 minggu dikultur di dalam MPE, ini ditunjukkan dengan munculnya daun (panah) (Bar = 3 mm). G. Akar (panah) muncul setelah embrio berkecambah dan menghasilkan 2 daun setelah minggu ke-7 kultur (Bar = 2 mm). H. Plantlet hasil regenerasi dari embrio somatik setelah 18 minggu di dalam MPE (Bar = 4 mm) (Sumber: Utami et al., 2010).



Gambar 8.2. Gambaran histologis perkembangan embrio somatik *Ph amabilis* (L.) Bl. A. sel-sel embriogenik berukuran kecil, mempunyai inti yang jelas, menyerap warna kuat, sitoplasma padat (panah) (Bar = 68 μm) B. Proembrio 2 sel, tersusun asimetris, sel basal lebih besar, mengandung butir-butir tepung (panah) (Bar = 20 μm). C. Proembrio 3 sel (Bar = 13 μm). D. Proembrio 5 sel (Bar = 45 μm). E. Fase globular, tersusun dari sel-sel yang relatif sama (Bar = 30 μm). F. Fase globular, tampak di bagian apikal tersusun dari selsel yang berukuran kecil dan di bagian basal tersusun dari sel-sel yang berukuran besar dan di bagian luarnya terdiri dari selapis sel tersusun teratur (panah). (Bar = 36 μm). G. Embrio globular memanjang dengan struktur seperti suspensor (panah) pada bagian basal embrio (Bar = 66 μm). H. Bagian apikal embrio terbentuk tonjolan (T1) (Bar = 41 μm). I. Terbentuk tonjolan ke-dua (T2) dan takik (TK) (Bar = 39 μm). J. Embrio dengan tunas pucuk di antara 2 tonjolan (Bar = 44 μm). K. Embrio berkecambah setelah 4 minggu dikultur pada MPE (Bar = 93 μm). (TP = Tunas pucuk; PD = Primordia Daun; TK= Takik; T1 = Tonjolan pertama; T2 = Tonjolan ke-dua) (Sumber: Utami et al., 2010).

- b. ABA, gula (sukrosa), dan osmotikum (PEG, manitol) diperlukan untuk mendukung akumulasi protein cadangan, mengatur desikasi, serta meningkatkan viabilitas embrio (Ikeda-Iwai et al., 2003).

4. Konversi Embrio Menjadi Plantlet

- a. Embrio matang dipindahkan ke medium bebas hormon atau dengan sitokinin rendah.
- b. Terbentuk plantlet lengkap dengan sistem akar dan pucuk yang berfungsi normal.
- c. Efisiensi tahap ini sering menjadi hambatan, karena embrio somatik kadang gagal berkecambah atau menunjukkan abnormalitas morfologi (Ikeuchi et al., 2019).

8.3.4 Tahapan Perkembangan Embriogenesis Somatik

1. Tahap Globular

- a. Embrio berbentuk bola kecil, tersusun atas sel-sel meristematis yang aktif membelah.
- b. Belum ada diferensiasi jaringan yang jelas.
- c. Fase ini menentukan apakah sel somatik akan benar-benar masuk jalur embriogenesis.
- d. Disebut sebagai tahap “komitmen embrionik”.
(Ikeda-Iwai et al., 2003; Fehér, 2015).

2. Tahap Heart-shaped

- a. Embrio mulai menunjukkan **polaritas** (terbentuk bagian atas dan bawah).
- b. Bakal pucuk (*shoot apical meristem*) dan bakal akar (*root apical meristem*) mulai terlihat.
- c. Terjadi diferensiasi awal jaringan, menandai transisi dari massa sel ke struktur embrio yang terorganisir.
(von Arnold et al., 2002; Gaj, 2004)

3. Tahap Torpedo

- a. Embrio memanjang, menyerupai bentuk torpedo.
- b. Sumbu embrionik (*embryonic axis*) terbentuk jelas.
- c. Jaringan vaskular mulai terdiferensiasi dan menghubungkan pucuk dengan akar.

- d. Embrio semakin mirip dengan embrio zigotik pada tahap pertumbuhan lanjut.

(Quiroz-Figueroa et al., 2006)

4. Tahap Kotiledon (*Cotyledonary stage*)

- a. Embrio sudah mencapai tingkat kematangan morfologis.
- b. Kotiledon berkembang penuh (1 pada monokotil, 2 pada dikotil).
- c. Embrio siap mengalami konversi menjadi plantlet melalui tahap perkecambahan (Fehér, 2015).

Ringkasan Alur Tahapan ES

Globular → massa sel bulat hasil pembelahan.

Heart → muncul polaritas dan bakal meristem.

Torpedo → embrio memanjang pada sumbu embrionik.

Kotiledon → embrio matang tumbuh menjadi plantlet.

8.4 Mekanisme Molekuler dan Regulasi

Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik (ES) merupakan proses kompleks yang dikendalikan oleh interaksi genetik, hormonal, dan epigenetik. Mekanisme ini melibatkan reprogramming sel somatik menuju jalur embriogenik, yang secara fundamental berbeda dari organogenesis biasa karena menghasilkan embrio bipolar dengan meristem akar dan pucuk yang lengkap (Fehér, 2015).

8.4.1 Regulasi Genetik

Beberapa faktor transkripsi berperan sebagai regulator utama ES. Gen LEC1/LEC2 (LEAFY COTYLEDON 1/2) dan FUS3 (FUSCA3) berperan penting dalam mengaktifkan jalur embriogenesis dengan menginduksi ekspresi gen embrio zygotik (Gaj, 2004; Braybrook & Harada, 2008). Faktor BBM (BABY BOOM), anggota keluarga AP2/ERF, dapat memicu pembentukan embrio somatik bahkan tanpa perlakuan hormonal eksternal (Boutilier et al., 2002). Selain itu, WUSCHEL (WUS) berperan dalam mempertahankan identitas sel pluripoten di meristem, sedangkan SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) terlibat dalam tahap awal transisi sel menuju embrio (Zhao et al., 2020).

8.4.2 Regulasi Hormonal

Hormon tumbuhan, khususnya auxin, merupakan pemicu utama induksi embriogenesis. Perlakuan dengan 2,4-D atau picloram mampu menginduksi reprogramming sel somatik ke arah jalur embriogenik dengan memodulasi ekspresi gen LEC2 dan BBM (Fehér, 2015). Selanjutnya, abscisic acid (ABA) berperan dalam tahap maturasi embrio dengan menginduksi akumulasi protein cadangan dan desikasi embrio (Ikeda-Iwai et al., 2003). Sitokinin turut mendukung konversi embrio menjadi plantlet, sedangkan giberelin sering terlibat dalam memecah dormansi embrio (Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016).

8.4.3 Regulasi Epigenetik

Faktor epigenetik juga sangat menentukan dalam ES. Modifikasi kromatin melalui metilasi DNA dan modifikasi histon mengatur ekspresi gen embriogenik. Misalnya, hipometilasi DNA sering dikaitkan dengan peningkatan kompetensi embriogenik (LoSchiavo et al., 1989). Selain itu, protein Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) berfungsi menekan ekspresi gen embriogenik pada jaringan vegetatif, sehingga diperlukan reprogramming epigenetik untuk memicu embriogenesis (Mozgova et al., 2017). Regulasi oleh microRNA (miRNA), seperti miR156 dan miR160, juga diketahui mengontrol transisi sel somatik ke arah embrio (Szyrajew et al., 2017).

8.4.4 Integrasi Sinyal Molekuler

Embriogenesis somatik terjadi melalui integrasi sinyal molekuler dari faktor transkripsi, regulasi epigenetik, dan respons hormonal. Kombinasi ini menentukan apakah sel somatik akan tetap bersifat vegetatif atau masuk ke jalur embriogenik. Studi multi-omics terbaru (transkriptomik, proteomik, dan metabolomik) mengungkap regulasi kompleks yang mendasari mekanisme ini (Li et al., 2022).

8.5 Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan ES

Keberhasilan embriogenesis somatik (ES) dipengaruhi oleh interaksi kompleks antara faktor internal (genetik, fisiologis, dan epigenetik) serta faktor eksternal (lingkungan kultur dan teknik

kultur). Faktor-faktor utama yang berperan dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Jenis Eksplan

Jenis jaringan yang digunakan sebagai sumber eksplan merupakan faktor utama dalam menentukan keberhasilan embriogenesis somatik. Jaringan muda seperti daun muda, embrio imatur, kotiledon/hipokotil, atau suspensi sel umumnya memiliki tingkat totipotensi lebih tinggi dibandingkan jaringan dewasa. Hal ini karena sel muda memiliki aktivitas metabolik yang lebih intensif, dinding sel lebih tipis, dan masih bersifat plastis sehingga lebih mudah terdiferensiasi menjadi embrio somatik (Gaj, 2004).

Tahap fisiologis eksplan berperan penting dalam menentukan keberhasilan inisiasi. Jaringan dengan tingkat diferensiasi rendah dan aktivitas metabolisme tinggi biasanya lebih responsif terhadap perlakuan zat pengatur tumbuh (ZPT) eksogen. Sebaliknya, jaringan yang sudah mengalami lignifikasi atau diferensiasi lanjut cenderung sulit direprogram menjadi jalur embriogenik. Hal ini menunjukkan bahwa keberhasilan ES tidak hanya ditentukan oleh jenis jaringan, tetapi juga oleh kondisi fisiologis pada saat eksplan diisolasi (Gaj, 2004; Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016).

2. Media Kultur

Komposisi media kultur berperan penting dalam mendukung proses embriogenesis. Media dasar yang paling banyak digunakan adalah MS (Murashige & Skoog, 1962) karena kandungan unsur hara makro dan mikronya relatif lengkap. Penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) seperti auksin (misalnya 2,4-D, picloram, atau NAA) serta sitokinin (misalnya BAP atau kinetin) berfungsi menginduksi dediferensiasi sel, pembentukan kalus embriogenik, hingga perkembangan embrio somatik. Kombinasi dan konsentrasi ZPT harus dioptimalkan untuk setiap spesies tanaman. Auksin sintetis seperti 2,4-D dan Picloram merupakan pemicu utama induksi kalus embriogenik, sementara sitokinin (BAP, TDZ) mendukung diferensiasi, asam absisat (ABA) berperan dalam maturasi, dan giberelin (GA_3) mendorong perkecambahan embrio somatik (Xu & Huang, 2014;

Su et al., 2021). Formulasi media seperti MS, B5, atau DKW dengan tambahan sukrosa atau maltosa dapat memengaruhi pembelahan sel serta akumulasi cadangan energi pada embrio. Sumber karbon (sukrosa, maltosa) berperan ganda sebagai energi dan osmoregulator. (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

3. Lingkungan Kultur

Kondisi lingkungan kultur *in vitro* seperti suhu, intensitas cahaya, dan pH media juga sangat mempengaruhi jalannya embriogenesis. Suhu optimal biasanya berkisar antara 25–28 °C. Cahaya berperan dalam tahap pematangan embrio somatik, sementara kondisi gelap lebih sesuai untuk induksi kalus embriogenik pada tahap awal. pH media kultur stabil, umumnya sekitar 5,6–5,8, untuk menjaga keseimbangan ion dan ketersediaan nutrisi (Jiménez, 2001).

Kondisi stres ringan seperti cekaman osmotik atau perlakuan kimia tertentu sering kali meningkatkan kemampuan sel untuk masuk ke jalur embriogenik (Fehér, 2015; Ikeda-Iwai et al., 2003). Stres Lingkungan Terinduksi merupakan salah satu metode dalam meningkatkan induksi embriogenesis somatik (ES). Perlakuan stres ringan seperti cekaman osmotik (misalnya perlakuan manitol atau maltosa konsentrasi tinggi), suhu rendah, maupun aplikasi bahan kimia tertentu seperti 5-azacitidine (inhibitor metilasi DNA) dapat memicu perubahan fisiologis dan epigenetik pada sel somatik sehingga sel lebih mudah memasuki jalur embriogenik. Mekanisme ini dikenal sebagai *stress-induced somatic embryogenesis* (SISE), di mana kondisi stres berfungsi sebagai sinyal yang menginduksi reprogramming seluler melalui aktivasi jalur regulasi perkembangan yang sebelumnya tidak aktif (Ikeda-Iwai et al., 2003; Fehér, 2015).

4. Genotipe Tanaman

Respon embriogenesis somatik juga sangat bergantung pada genotipe atau varietas tanaman yang digunakan. Beberapa spesies atau kultivar memiliki kemampuan tinggi untuk membentuk embrio somatik, sementara yang lain bersifat resisten meskipun diberikan kondisi kultur yang sama. Hal ini menunjukkan adanya kontrol genetik yang kuat terhadap proses

embriogenesis, termasuk peran gen pengatur perkembangan seperti LEC1, BBM, dan WUSCHEL (Basu et al., 2011; Horstman et al., 2017).

5. Faktor Epigenetik dan Regulasi Gen

Mekanisme epigenetik seperti tingkat metilasi DNA, modifikasi histon, serta regulasi microRNA (miRNA) berperan sebagai penentu stabilitas atau fleksibilitas status perkembangan sel. Regulasi ini dapat bertindak sebagai saklar molekuler yang mengaktifkan atau menekan jalur embriogenik. Pada tingkat molekuler, beberapa gen pengatur utama diketahui sangat berperan, di antaranya LEAFY COTYLEDON (LEC1/2), BABY BOOM (BBM), WUSCHEL (WUS), dan SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK). Gen-gen tersebut berfungsi menginisiasi program embriogenesis, mempertahankan identitas embrionik, serta mengarahkan perkembangan embrio somatik menuju maturasi (Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016; Chen et al., 2020).

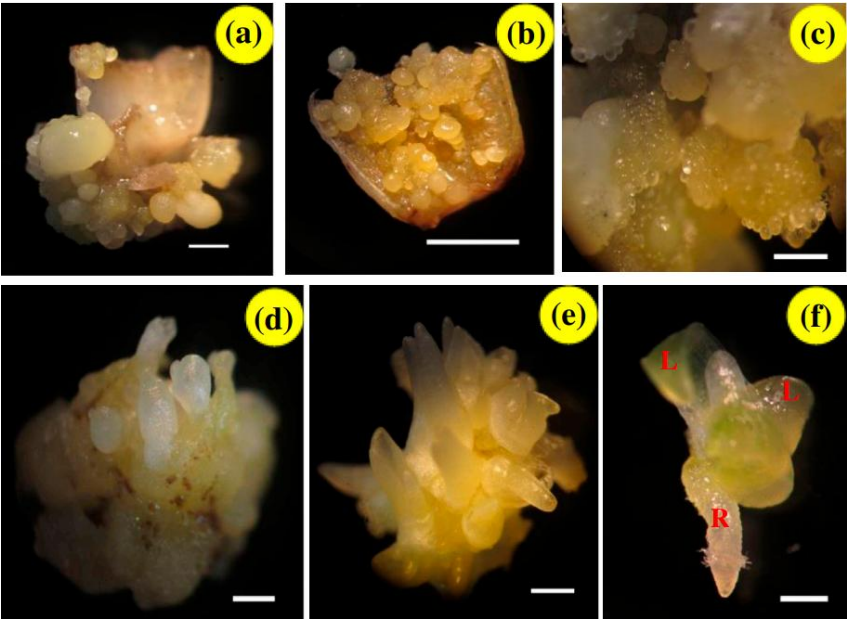
Berkaitan dengan status epigenetik, di mana jaringan muda cenderung memiliki pola metilasi DNA dan modifikasi histon yang lebih permisif sehingga memungkinkan aktivasi gen pengatur embriogenesis, sedangkan jaringan dewasa memerlukan intervensi untuk membuka kembali program perkembangan tersebut (Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016; Chen et al., 2020).

Stres lingkungan dapat menurunkan tingkat metilasi DNA atau mengubah pola modifikasi histon, sehingga membuka kromatin dan memungkinkan ekspresi gen pengatur embriogenesis seperti LEC1, BBM, WUS, dan SERK. Selain itu, stres juga memengaruhi kadar hormon endogen, terutama meningkatkan akumulasi auksin dan ABA, berperan dalam menginisiasi dan mempertahankan kompetensi embriogenik. Penerapan cekaman terkontrol bukan hanya faktor lingkungan, tetapi juga berfungsi sebagai pemicu transisi epigenetik dan transkripsi yang mendasari keberhasilan embriogenesis somatik.

Tabel 8.2. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan dari Embriogenesis Somatik (ES)

Kategori	Faktor	Keterangan	Contoh/Referensi
Internal	Genotipe	Menentukan tingkat kompetensi embriogenik	<i>Daucus carota</i> responsif, <i>Pinus taeda</i> sulit (Gaj, 2004; von Arnold et al., 2002)
	Tahap Fisiologis Eksplan	Jaringan muda/meristematis lebih kompeten dibanding jaringan dewasa	Embrio imatur lebih responsif dibanding embrio matang (Ikeda-Iwai et al., 2003)
	Hormon Endogen	auksin & sitokinin endogen berpengaruh pada respon terhadap ZPT eksogen	Regulasi endogen menentukan induksi ES (Fehér, 2015)
	Faktor Epigenetik	Metilasi DNA, modifikasi histon, dan ekspresi miRNA mengatur ekspresi gen embriogenik (LEC, BBM, WUS, SERK)	Penurunan metilasi meningkatkan ES (Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016; Chen et al., 2020)
Eksternal	Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	Auksin (2,4-D, Picloram) → induksi; Sitokinin (BAP, TDZ) → diferensiasi; ABA → maturasi; GA ₃ → perkecambahan	Xu & Huang, 2014; Su et al., 2021
	Komposisi Media Kultur	Media MS, B5, DKW dengan variasi makro/mikronutrien dan sumber karbon (sukrosa/maltosa) berpengaruh pada pembelahan sel	Quiroz-Figueroa et al., 2006
	Kondisi Lingkungan Kultur	Suhu, cahaya, osmolaritas, pH, dan kelembapan memengaruhi kompetensi embriogenik	De-la-Peña et al., 2015

Kategori	Faktor	Keterangan	Contoh/Referensi
	Stres Lingkungan	Perlakuan cekaman (osmotik, suhu, atau bahan kimia) dapat meningkatkan induksi ES → “stress-induced embryogenesis”	Fehér, 2015; Ikeda-Iwai et al., 2003



Gambar 8.3. Induksi kalus embriogenik (EC) dan perkembangan embrio somatik pada *Lilium pumilum*: (a) Kalus kompak kuning pucat-putih pada medium D5 dengan pikloram tunggal (45 HSK, Bar = 5 mm); (b) Kalus granular dan rapuh berwarna kuning terang pada medium D6 dengan pikloram + NAA (45 HSK, Bar = 10 mm); (c) Partikel transparan pada EC (45 HSK, Bar = 2 mm); (d) Embrio somatik pada medium bebas ZPT (21 HSK, Bar = 5 mm); (e) Embrio kotiledon (28 HSK, Bar = 10 mm); (f) Planlet beregenerasi lengkap dengan daun (L) dan akar (R) (45 HSK, Bar = 50 mm) (Sumber : Zhang et al. 2016)

Tabel 8.3. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) dalam Embriogenesis Somatik

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	Fungsi Utama	Konsentrasi Umum	Contoh Tanaman	Referensi
2,4-D (2,4-Dichloro phenoxyacetic acid)	Induksi kalus embriogenik, dediferensiasi sel	1–5 mg/L	<i>Daucus carota</i> (wortel), <i>Theobroma cacao</i> (kakao), <i>Oryza sativa</i> (padi)	Xu & Huang, 2014; Gaj, 2004
Picloram	Alternatif pengganti 2,4-D; efektif pada tanaman perkebunan	0.5–10 mg/L	<i>Elaeis guineensis</i> (kelapa sawit), <i>Musa acuminata</i> (pisang)	Silva et al., 2014; Solís-Ramos et al., 2012
NAA (Naphthaleneacetic acid)	Pembelahan sel, induksi awal embriogenesis (kadang dikombinasi dengan sitokinin)	0.5–3 mg/L	<i>Medicago truncatula</i> , <i>Capsicum annum</i>	Quiroz-Figueroa et al., 2006
IAA (Indole-3-acetic acid)	Auksin alami; peran lebih kecil dalam ES dibanding 2,4-D	0.1–2 mg/L	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Coffea canephora</i>	Fehér, 2015
BAP (6-Benzyl aminopurine)	Mendukung perkembangan embrio lanjut dan konversi ke plantlet	0.5–3 mg/L	<i>Gossypium hirsutum</i> (kapas), <i>Coffea arabica</i>	von Arnold et al., 2002
TDZ (Thidiazuron)	Sitokinin kuat; mendorong pembentukan embrio sekunder	0.1–1 mg/L	<i>Gossypium hirsutum</i> , <i>Citrus sinensis</i>	Gaj, 2004; Su et al., 2021

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	Fungsi Utama	Konsentrasi Umum	Contoh Tanaman	Referensi
ABA (Absciscic Acid)	Maturasi embrio, menghindari germinasi prematur, akumulasi protein LEA	0.5–10 μ M	<i>Picea abies</i> (cemara), <i>Medicago sativa</i>	Ikeda-Iwai et al., 2003
GA₃ (Gibberellic Acid)	Membantu germinasi embrio somatik	0.5–5 mg/L	<i>Coffea canephora</i> , <i>Zea mays</i>	Gaj, 2004
Kinetin	Diferensiasi jaringan embrio	0.1–2 mg/L	<i>Nicotiana tabacum</i>	Xu & Huang, 2014

8.6 Aplikasi Embrio Somatik

Embriogenesis somatik telah menjadi salah satu teknologi kultur *in vitro* yang memiliki potensi besar dalam bidang bioteknologi tanaman. Seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan, aplikasi embrio somatik tidak hanya terbatas pada perbanyakan bibit, tetapi juga meluas pada konservasi, rekayasa genetik, hingga produksi benih sintetik. Beberapa aplikasi penting antara lain:

1. Perbanyakan Massal (*Clonal Propagation*)

Clonal Propagation melalui embriogenesis somatik (ES) merupakan teknik bioteknologi yang memungkinkan produksi bibit unggul dalam jumlah besar, seragam, dan berkelanjutan. Metode ini telah diaplikasikan secara luas pada tanaman industri seperti kelapa sawit (*Elaeis guineensis*), kopi (*Coffea spp.*), kakao (*Theobroma cacao*), serta tanaman kehutanan seperti pinus dan eucalyptus (Jyanthi & Mandal, 2001), karena lebih efisien dibandingkan kultur tunas konvensional, menghasilkan embrio dalam jumlah sangat banyak, dapat disinkronisasi, dan mendukung kebutuhan perbanyakan skala industri (von Arnold et al., 2002; Gaj, 2004; Silva et al., 2020).

2. Kriopreservasi

Embrio somatik dapat digunakan sebagai bahan untuk konservasi plasma nutfah melalui teknik kriopreservasi, yaitu penyimpanan pada suhu ultra-rendah (-196°C dalam nitrogen cair). Metode ini memungkinkan penyimpanan jangka panjang materi genetik tanaman tanpa mengalami perubahan sifat. Keberhasilan kriopreservasi embrio somatik telah dilaporkan pada berbagai spesies, termasuk kelapa, anggrek, dan beberapa tanaman kehutanan. Dengan cara ini, koleksi plasma nutfah dapat dilestarikan meskipun tanaman induk sudah tidak ada lagi (Engelmann, 2011).

3. Transformasi Genetik

Dalam bidang rekayasa genetik, embrio somatik merupakan target yang ideal untuk transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* atau metode biobalistik. Hal ini karena embrio somatik memiliki kapasitas totipotensi yang tinggi dan mampu berkembang menjadi tanaman lengkap setelah transformasi. Aplikasi ini telah dimanfaatkan pada berbagai komoditas penting, seperti padi, gandum, jagung, dan kapas, untuk memperkenalkan sifat unggul seperti ketahanan terhadap hama, toleransi cekaman abiotik, atau peningkatan kualitas hasil.

4. Benih Sintetik (*Synthetic Seed*)

Embrio somatik juga dapat digunakan dalam produksi benih buatan (*synthetic seed*), yaitu embrio somatik yang dienkapsulasi dalam matriks hidrogel seperti natrium alginat. Teknologi ini memungkinkan embrio somatik diperlakukan layaknya benih konvensional, sehingga dapat memudahkan transportasi, penyimpanan, dan distribusi bibit. Aplikasi benih sintetik telah diuji pada berbagai tanaman, termasuk tanaman pangan (padi, gandum), hortikultura (anggrek, stroberi), hingga tanaman perkebunan (tebu, kopi) (Rai et al., 2009).

8.7 Tantangan dan Prospek Embrio Somatik

Aplikasi benih sintetik telah diuji pada berbagai tanaman, termasuk tanaman pangan (padi, gandum), hortikultura (anggrek, stroberi), hingga tanaman perkebunan (tebu, kopi) (Rai et al., 2009).

Meskipun embriogenesis somatik memiliki potensi besar dalam bioteknologi tanaman, penerapannya masih menghadapi sejumlah tantangan teknis maupun biologis. Salah satu kendala utama adalah adanya variabilitas somaklonal, yaitu munculnya variasi genetik pada tanaman hasil regenerasi. Variasi ini dapat merugikan, terutama jika tujuan utama adalah menghasilkan tanaman klonal yang seragam. Faktor penyebab variabilitas ini diduga terkait dengan ketidakstabilan genom selama fase kultur kalus, perubahan epigenetik, serta tekanan lingkungan *in vitro*.

Tantangan berikutnya adalah rendahnya efisiensi regenerasi, terutama pada beberapa spesies tanaman yang bersifat rekalsitran. Tidak semua eksplan atau genotipe dapat dengan mudah diinduksi untuk membentuk embrio somatik, bahkan dengan kondisi kultur yang telah dioptimalkan. Hal ini menunjukkan adanya regulasi genetik terhadap embriogenik, sehingga perlu pendekatan molekuler untuk memahami dan memodifikasi mekanisme yang mendasarinya. Respon embriogenesis sangat bervariasi antar varietas, sehingga keberhasilan pada satu kultivar belum tentu dapat diaplikasikan pada kultivar lain. Hal ini menjadi masalah serius terutama pada tanaman dengan keanekaragaman genetik tinggi seperti kelapa sawit, kopi, dan pisang.

Dari sisi teknis, skala produksi juga masih menjadi tantangan. Walaupun embrio somatik dapat dihasilkan dalam jumlah besar, prosesnya sering kali tidak sinkron, sehingga sulit dikembangkan untuk produksi massal yang konsisten. Upaya mengatasi hal ini antara lain melalui penggunaan bioreaktor imersi temporer, yang memungkinkan kultur suspensi sel atau embrio somatik tumbuh dalam kondisi lebih terkendali dan seragam.

Namun, di balik tantangan tersebut, prospek pengembangan embrio somatik tetap sangat menjanjikan. Penelitian terkini mengenai regulasi molekuler dan epigenetik telah mengungkap peran penting gen pengatur perkembangan seperti LEC, BBM, dan WUS, serta mekanisme metilasi DNA dalam menentukan jalur embriogenik. Pemanfaatan teknologi baru seperti genome editing (CRISPR/Cas), transkriptomik, dan epigenomik diharapkan dapat mempercepat pemahaman dasar embriogenesis somatik serta memungkinkan manipulasi langsung pada jalur perkembangan sel.

Di samping itu, integrasi embrio somatik dengan teknologi konservasi genetik (kriopreservasi) dan benih sintetis membuka peluang besar untuk pelestarian plasma nutfah dan penyediaan benih unggul secara global. Dengan dukungan penelitian interdisipliner yang melibatkan fisiologi, biologi molekuler, bioinformatika, dan rekayasa kultur jaringan, embrio somatik berpotensi menjadi salah satu teknologi kunci dalam pertanian modern yang mendukung program pemuliaan tanaman, ketahanan pangan, serta konservasi sumber daya genetik di masa depan (Fehér, 2019).

DAFTAR PUSTAKA

- Basu, S., Roychowdhury, R., & Sahoo, S. (2011). Somatic embryogenesis in plants: A review. *International Journal of Bio-Resource and Stress Management*, 2(3), 277–284.
- Boutilier, K., et al. (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14(8), 1737–1749.
- Braybrook, S. A., & Harada, J. J. (2008). LEC genes and development of the embryo and seed in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 51(6), 325–337.
- Chen, Y., et al. (2020). Epigenetic regulation of somatic embryogenesis in plants. *Plant Cell Reports*, 39(6), 693–704.
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47(1), 5–16.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385–402.
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10, 536.
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 43(1), 27–47.
- Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J. M., Angenent, G. C., & Boutilier, K. (2017). The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 175(2), 848–857.
- Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., & Kamada, H. (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34(1), 107–114.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173.
- Jiménez, V. M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista*

- Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13(2), 196–223.
- Li, H., et al. (2022). Multi-omics approaches to study somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1529.
- LoSchiavo, F., et al. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by hormone treatments. *The Plant Cell*, 1(4), 325–332.
- Martínez, M. T. (2024). Recent advances in somatic embryogenesis. *Plants*, 13(1), 45.
- Mozgova, I., et al. (2017). The role of chromatin in somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 173(3), 1610–1620.
- Nic-Can, G. I., & Loyola-Vargas, V. M. (2016). The role of auxins and cytokinins during somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 52(3), 207–219.
- Quiroz-Figueroa, F. R., et al. (2006). Histological analysis of somatic embryogenesis in coffee. *Plant Cell Reports*, 25(9), 967–975.
- Rai, M. K., Asthana, P., Jaiswal, V. S., & Jaiswal, U. (2009). The encapsulation technology in fruit plants – A review. *Biotechnology Advances*, 27(6), 671–679.
- Silva, T. L., et al. (2020). Somatic embryogenesis for clonal propagation and genetic improvement in forest trees: Advances and challenges. *Trees*, 34(2), 319–335.
- Singla, S., et al. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 38(12), 1499–1517.
- Su, Y. H., et al. (2021). Molecular control of somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 652.
- Thorpe, T. A. (2000). Somatic embryogenesis in woody plants: Clonal propagation and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 36(5), 341–351.
- Utami, E. S. W., Soemardi, I., Taryono, & Semiarti, E. (2010). Embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.: Struktur dan pola perkembangan. *Jurnal Sains & Matematika*, 18(2), 65–70.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Plant embryogenesis: Regulation of development in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233–244.
- Xu, L., & Huang, H. (2014). Plant regeneration via somatic embryogenesis. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 137–160.

- Zhang, J., Gai, M. Z., Li, X. Y., Li, T. L., & Sun, H. M. (2016). Somatic embryogenesis and direct as well as indirect organogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch., an endangered ornamental and medicinal plant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(10), 1898–1906. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1194178>
- Zhao, P., et al. (2020). The role of SERK genes in plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–12.

BAB 9

KULTUR EMBRIO

Oleh Natasha Florenika

9.1 Pendahuluan

Kultur embrio merupakan teknologi yang menjadi bagian integral dalam bidang bioteknologi khususnya berkaitan dengan reproduksi dan pengembangan organisme. Teknik ini berfokus pada pengembangan embrio di luar lingkungan aslinya, yang memungkinkan para peneliti untuk mempelajari berbagai aspek perkembangan embrio, mulai dari fertilisasi hingga tahap implantasi dalam kondisi yang terkontrol secara *in vitro*. Adapun tujuan utama dari kultur embrio adalah untuk memahami dan mengoptimalkan proses perkembangan embrio serta meningkatkan hasil reproduksi pada berbagai spesies, termasuk hewan dan tumbuhan.

Dalam konteks kultur embrio, berbagai faktor lingkungan seperti komposisi media kultur, suhu, dan oksigen sangat mempengaruhi keberhasilan perkembangan embrio. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Reddy et al., (2024), faktor-faktor ini tidak hanya mempengaruhi pertumbuhan embrio, tetapi juga dapat berkontribusi terhadap inovasi dalam pemuliaan tanaman dan hewan dengan meningkatkan keragaman genetik melalui teknik penyelamatan embrio. Kualitas media kultur yang digunakan juga memegang peranan penting, di mana media yang secara kimiawi terdefinisi dapat mengoptimalkan perkembangan embrio dan mendekati kondisi fisiologis alami (Summers & Biggers, 2003).

Selain itu, tantangan yang ada dalam kultur embrio termasuk stres oksidatif yang dapat berdampak pada viabilitas embrio. Hasil studi yang dilakukan oleh Orsi & Leese, (2001), menunjukkan bahwa penggunaan bahan seperti EDTA dan *superoxide dismutase* (SOD) memberikan proteksi terhadap radikal bebas selama tahap pre-implantasi yang berpotensi menyebabkan kerusakan. Terlebih lagi, pengembangan sistem kultur inovatif, seperti penggunaan mikrofluidik, juga menunjukkan potensi untuk meningkatkan

pemantauan metabolisme embrio secara *real-time* dan memungkinkan lingkungan yang lebih dinamis, yang mendukung perkembangan embrio yang lebih baik dibandingkan dengan metode kultur tradisional (Heo et al., 2012;Huang et al., 2015)

Kultur embrio tidak hanya memiliki aplikasi dalam pemuliaan hewan dan tumbuhan, tetapi juga dalam bidang kedokteran, khususnya dalam teknologi reproduksi berbantuan. Penelitian yang dilakukan oleh Gombos et al., (2021), mengemukakan pentingnya penilaian genetik non-invasif pada embrio pra-implantasi, yang bertujuan untuk mendeteksi aneuploidi dan meningkatkan hasil fertilisasi. Dengan pemahaman yang lebih baik mengenai kebutuhan spesifik embrio dalam kultur, peluang untuk mengembangkan teknik fertilisasi *in vitro* yang lebih efisien dan efektif meningkat pesat.

Secara keseluruhan, kultur embrio berperan penting dalam memperluas pemahaman kita mengenai proses perkembangan awal organisme, yang pada gilirannya membuka kemungkinan baru dalam penelitian biologi reproduksi, konservasi sumber daya genetik, serta inovasi dalam pertanian dan peternakan.

9.2 Dasar-Dasar Kultur Embrio

9.2.1 Pengertian Kultur Embrio

Kultur embrio adalah suatu teknik bioteknologi tanaman yang memungkinkan perkembangan embrio di luar tubuh induk, dalam kondisi yang terkontrol melalui media kultur yang terstandarisasi. Teknik ini bertujuan untuk memfasilitasi proses reproduksi dan mendapatkan individu baru dari spesies tanaman atau hewan, termasuk tanaman komersial seperti kelapa sawit dan tanaman hias (Kasi & Sumaryono, 2016). Kultur embrio dapat mempercepat proses perbanyakan tanaman, memungkinkan peningkatan keragaman genetik, serta memberikan peluang penelitian lebih lanjut mengenai kondisi perkembangan embrio (Restiani et al., 2024).

9.2.2 Proses Dasar Kultur Embrio

Proses kultur embrio melibatkan beberapa tahap utama, mulai dari pengambilan eksplan, persiapan media kultur, hingga tahap kultur itu sendiri. Dalam konteks kultur jaringan tanaman,

eksplan yang umum digunakan dapat berupa embrio zygotik, kalus, atau bagian tanaman lainnya yang memiliki potensi untuk membentuk embrio (Sasmita et al., 2022; Ajijah & Sri Hartati, 2019). Media kultur yang digunakan seringkali diperkaya dengan nutrisi dan hormon tumbuhan seperti auksin dan sitokinin untuk merangsang pembentukan embrio somatik (Devy et al., 2012). Sebagai contoh, penelitian menunjukkan bahwa penambahan hormon BA (*benzylaminopurine*) dan NAA (*naphthaleneacetic acid*) dalam media dapat meningkatkan pembentukan kalus embriogenik pada tanaman jenis *Dendrobium* (Sasmita et al., 2022).

9.2.3 Faktor yang Mempengaruhi Kultur Embrio

Keberhasilan kultur embrio sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk komposisi media kultur, jenis eksplan, dan kondisi lingkungan seperti suhu dan pH. Media kultur yang optimal dapat berkontribusi pada peningkatan viabilitas dan perkembangan embrio yang lebih baik. Penggunaan hormon yang tepat pada konsentrasi yang sesuai merupakan langkah penting dalam merangsang pertumbuhan embrio dalam kultur *in vitro*. Studi sebelumnya juga menemukan bahwa variasi usia dan kondisi dari eksplan memengaruhi persentase keberhasilan pembentukan embrio dalam proses kultur (Ilham et al., 2024).

9.2.4 Aplikasi Kultur Embrio dalam Pertanian

Kultur embrio memiliki aplikasi luas dalam pertanian, terutama dalam perbanyakan massal tanaman unggul. Teknologi ini memungkinkan penyelamatan embrio somatik dari spesies yang terancam punah atau berpotensi memberi manfaat ekonomi tinggi. Misalnya, dalam penelitian yang dilakukan oleh Devy & Hardiyanto, (2015), teknologi embriogenesis somatik digunakan untuk memproduksi benih jeruk bebas penyakit secara massal, yang diharapkan dapat meningkatkan produksi pertanian dalam kurun waktu normal. Hal ini menunjukkan pentingnya teknik kultur embrio dalam pengembangan pertanian yang berkelanjutan.

9.3 Tujuan dan Aplikasi Kultur Embrio

9.3.1 Tujuan kultur Embrio

Kultur embrio memiliki berbagai tujuan yang penting dalam bidang pertanian, bioteknologi, dan penelitian ilmiah. Pertama, salah satu tujuan utama dari kultur embrio adalah untuk memperoleh individu baru dari tanaman atau hewan dengan cara yang efisien dan cepat. Teknik ini memungkinkan pengembangbiakan spesies dengan karakter unggul tanpa memerlukan proses generasi yang panjang (Meira et al., 2019); Ibrahim & Sulistiyorini, 2021).

Kedua, kultur embrio bertujuan untuk menyelamatkan dan memulihkan spesies tanaman yang terancam punah. Melalui kultur jaringan, embrio dapat diperoleh dari sumber genetik yang terbatas dan digunakan untuk konservasi genetik, mencegah kehilangan keragaman genetik (Yang et al., 2013).

Ketiga, kultur embrio juga digunakan untuk meningkatkan keberhasilan dalam teknik reproduksi berbantuan, seperti pada teknik fertilisasi *in vitro* (IVF) pada hewan, yang mampu memperbaiki peluang kehamilan dan hasil reproduksi (You et al., 2011). Selain itu, kultur embrio digunakan untuk penelitian lebih lanjut mengenai perkembangan embrio, sehingga peneliti dapat mendalami aspek-aspek biologis dari proses embriogenesis (Klimaszewska et al., 2001)

9.3.2 Aplikasi Kultur Embrio

Kultur embrio memiliki aplikasi yang luas yang mencakup berbagai bidang. Dalam pertanian, kultur embrio digunakan untuk memperbanyak tanaman komersial secara *massive*, termasuk tanaman hias dan tanaman buah, melalui teknik embriogenesis somatik. Sebagai contoh, (Devy & Hardiyanto, 2015), menunjukkan bagaimana teknik ini dapat meningkatkan jumlah embrio *calamondin* yang dapat diproduksi secara efisien dalam media kultur, yang bermanfaat untuk industri hortikultura.

Dalam konteks pemuliaan tanaman, pengembangan varietas baru juga sebagai salah satu manfaat dari penerapan kultur embrio. Melalui teknik ini, pemulia tanaman dapat menghasilkan klon dengan karakter yang diinginkan, seperti

ketahanan terhadap penyakit atau peningkatan hasil (Santra et al., 2012). Misalnya, penelitian oleh Scherwinski-Pereira et al. menunjukkan teknik kultur embrio pada kelapa sawit dapat digunakan untuk mempertahankan karakter unggul dan konsisten dalam semua klon yang dihasilkan (Scherwinski-Pereira et al., 2010)

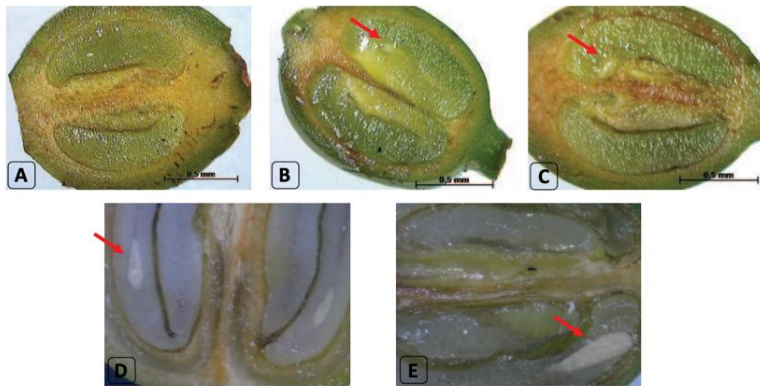
Di sisi lain, dalam bidang penelitian dan kesehatan, kultur embrio telah digunakan untuk mengeksplorasi mekanisme biologis dan genetik yang mendasari perkembangan. Misalnya, identifikasi gen-gen tertentu yang terlibat dalam embriogenesis dapat membuka jalan bagi strategi pemuliaan baru dan inovasi bioteknologi (Triasanto et al., 2006). Dalam bidang farmasi, kultur embrio juga dimanfaatkan untuk penelitian pengembangan obat, meningkatkan efisiensi proses produksi *biopharmaceuticals* melalui sistem kultur yang lebih terstandar (Roostika et al., 2016).

9.4 Metodologi Kultur Embrio

Kultur embrio adalah teknik penting dalam bioteknologi yang memungkinkan pengembangan embrio dari tanaman dan hewan dalam kondisi terkendali. Proses ini melibatkan beberapa tahap metodologis yang krusial untuk mencapai hasil yang optimal dalam kultur embrio, termasuk persiapan eksplan, sterilisasi, pemilihan media, serta perawatan selama kultur. Berikut adalah rincian metodologi kultur embrio:

9.4.1 Persiapan Eksplan

Tahap awal dalam kultur embrio adalah pemilihan dan persiapan eksplan. Eksplan dapat berupa embrio muda, biji, kalus, atau bagian tanaman lainnya yang memiliki potensi untuk tumbuh menjadi individu baru. Bahan eksplan harus diambil dari tanaman yang bebas dari penyakit dan sehat. Penelitian oleh Ibrahim & Sulistiyorini, (2021), mencatat bahwa pemilihan umur buah dan formulasi media yang tepat sangat berpengaruh pada keberhasilan kultur embrio (lihat Gambar 9.1).



Gambar 9.1. Hasil perkembangan buah kopi Arabika. Ket.: (A) dua bulan setelah penyerbukan, (B) empat bulan setelah penyerbukan, (C) enam bulan setelah penyerbukan, (D) tujuh bulan setelah penyerbukan, dan (E) sembilan bulan setelah penyerbukan. Tanda panah merah menunjukkan perkembangan embrio
(Sumber: (Ibrahim & Sulistiyorini, 2021))

9.4.2 Sterilisasi Eksplan

Penting untuk meminimalisir kontaminasi selama proses kultur. Sterilisasi eksplan dilakukan menggunakan larutan disinfektan seperti NaClO atau alkohol. Luri et al., (2021), menekankan bahwa optimalisasi metode sterilisasi eksplan sangat penting untuk mendapatkan eksplan yang steril dan bebas kontaminasi (**Tabel 9.1**). Dalam proses ini, eksplan dicelupkan dalam larutan disinfektan selama waktu tertentu, kemudian dicuci dengan air steril untuk menghilangkan sisa disinfektan.

Tabel 9.1. Metode sterilisasi eksplan daun kopi

Bahan	Konsentrasi	Lama Perendaman (menit)
Detergen	2 mL/L	10
Bilas aquadest steril 3x		1
Dithane	2 gram/L	20
Agrept	2 gram/L	
Erytromycin	4 gram/L	
Bilas aquadest steril 3x		1

Sumber: Luri et al., (2021)

9.4.3 Penyusunan Media Kultur

Seleksi dan komposisi media kultur merupakan langkah krusial dalam kultur embrio. Media yang umum digunakan mulai dari media MS (*Murashige and Skoog*) hingga variasi yang diperkaya dengan hormon pertumbuhan, seperti auksin dan sitokinin. Luri et al., (2021) menunjukkan bahwa pemilihan jenis media yang sesuai sangat berdampak pada pertumbuhan kalus dan embrio. Dalam hal ini, media kultur dibuat dengan tambahan sukrosa dan nutrisi penting untuk mendukung pertumbuhan embrio.

9.4.5 Proses Kultur

Setelah eksplan disiapkan dan media kultur tersedia, tahap selanjutnya adalah proses kultur itu sendiri. Eksplan diletakkan dalam wadah kultur yang steril, baik itu cawan petri atau tabung reaksi, dan dibiarkan dalam kondisi yang sesuai, termasuk suhu dan kelembapan yang dikontrol. (Agustin et al., 2020), mempelajari penerapan teknik kultur yang tepat untuk menilai pertumbuhan embrio angrek pada medium kultur dengan variasi konsentrasi ekstrak.

9.4.6 Aklimatisasi

Setelah periode kultur yang optimum, bibit yang dihasilkan perlu diaklimatisasi sebelum diperkenalkan ke lingkungan luar. Proses ini melibatkan perlahan-lahan mengurangi kondisi yang terkendali untuk memperkenalkan bibit pada kondisi lingkungan yang lebih nyata. Pengamatan dilakukan untuk memastikan kesiapan pertumbuhan individu baru. Penelitian oleh Sumaryono & Riyadi, (2016), menyoroti pentingnya kriteria planlet dalam mempersiapkan fase aklimatisasi.

9.4.7 Evaluasi Hasil

Tahap akhir dari metodologi kultur embrio adalah evaluasi hasil. Ini mencakup penilaian viabilitas dan kualitas embrio atau bibit yang dihasilkan. Evaluasi dapat dilakukan melalui pengamatan morfologi, analisis histologi, serta pengujian genetik untuk memastikan kestabilan dan kesesuaian tanaman.

Ilham et al., (2024), membahas penggunaan pendekatan histologi dalam studi morfogenesis embrio dalam kultur jaringan, yang dapat menjadi salah satu metode evaluasi hasil.

9.5 Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur Embrio

Keberhasilan kultur embrio dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, yang mencakup kondisi fisik dan kimia media kultur, pengaturan lingkungan, sifat eksplan, serta interaksi antar embrio selama proses kultur. Pemahaman mendalam mengenai faktor-faktor ini sangat krusial untuk meningkatkan efisiensi dan hasil dari teknik kultur embrio, baik dalam konteks penelitian maupun aplikasi praktis.

9.5.1 Komposisi Media Kultur

Komposisi media kultur adalah salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi keberhasilan kultur embrio. Media yang digunakan harus menyediakan nutrisi yang cukup, termasuk karbohidrat, vitamin, dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sesuai. Penelitian oleh Xie et al., (2006), menunjukkan bahwa media yang dikomposisikan dengan baik dapat mempengaruhi perkembangan embrio secara signifikan. Selain itu, penggunaan ZPT seperti auksin dan sitokinin dalam media kultur berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio, meskipun referensi tersebut tidak secara spesifik tertera dalam daftar.

9.5.2 Kondisi Lingkungan

Kondisi lingkungan selama kultur, termasuk suhu, pH, dan gas yang tersedia, juga memengaruhi hasil kultur embrio. Temperatur optimal dan konsentrasi oksigen sangat penting untuk perkembangan embrio yang sehat. Konsentrasi oksigen yang rendah dapat mempengaruhi metabolisme embrio saat kultur dan secara negatif mempengaruhi viabilitas mereka (Xie et al., 2007).

9.5.3 Sifat Eksplan

Sifat eksplan yang digunakan dalam kultur embrio berperan penting dalam keberhasilan kultur. Embrio yang sehat dan terpilih dari spesies yang tepat dapat meningkatkan peluang keberhasilan kultur. Arbeloa et al., (2009), mengungkapkan bahwa ukuran dan kualitas eksplan yang digunakan juga memiliki efek signifikan, di mana embrio yang lebih besar menunjukkan tingkat keberhasilan yang lebih tinggi dibandingkan embrio yang lebih kecil saat diinkubasi dalam kultur.

9.5.4 Interaksi Antar Embrio

Interaksi antara embrio selama kultur juga dianggap menjadi faktor penting dalam keberhasilan kultur. Houghton et al., (2002), menunjukkan bahwa kultur embrio dalam kelompok dapat meningkatkan pengembangan embrio secara signifikan, karena embrio dapat saling berinteraksi dan berbagi faktor pertumbuhan yang penting. Ini menunjukkan bahwa kultur kelompok dapat membantu menciptakan lingkungan mikro yang mendukung perkembangan yang lebih baik dibandingkan kultur individu (Spindler & Wildt, 2002).

9.5.5 Stres Metabolik

Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan kultur embrio adalah stres metabolik yang ditimbulkan oleh media kultur. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Xie et al., (2007), menunjukkan bahwa pengaruh penggunaan media yang kurang optimal dapat meningkatkan tingkat stres pada embrio, yang pada akhirnya mempengaruhi perkembangan mereka. Penggunaan media yang dirancang dengan baik, yang mendukung keseimbangan metabolik yang baik, sangat penting dalam meminimalkan efek ini (Xie et al., 2006).

9.6 Contoh Aplikasi Kultur Embrio

Kultur embrio merupakan teknik bioteknologi yang memiliki berbagai aplikasi penting dalam bidang pertanian, kedokteran hewan, dan penelitian biomedis. Berikut ini adalah beberapa contoh

aplikasi kultur embrio yang menunjukkan keberhasilan dan potensinya dalam berbagai bidang.

9.6.1 *Embryo Rescue* dalam Pemuliaan Tanaman

Kultur embrio juga digunakan dalam teknik embryo rescue pada tanaman untuk mengatasi masalah seperti kegagalan embrio dan sterilitas dalam hibridisasi. Dalam studi oleh Reddy et al., (2024), metode ini telah digunakan untuk memperluas keragaman genetik dalam tanaman cucurbit, yang memungkinkan untuk pengembangan hibrida interspesies dan intergenus dengan sifat unggul. Dengan kultur embrio, petani dan peneliti dapat menghasilkan tanaman baru yang lebih kuat dan tahan terhadap penyakit.

9.6.2 Pengembangan Model *In Vitro* untuk Penelitian

Kultur embrio menyediakan model yang berguna untuk mempelajari proses perkembangan awal dan interaksi antara embrio dan jaringan induk. Shahbazi et al., (2016), mengembangkan sistem kultur *in vitro* untuk memahami proses yang terjadi pada embrio manusia tanpa adanya jaringan maternal. Penelitian ini memberikan wawasan baru dalam mempelajari kejadian perkembangan pada tahap implantasi.

9.6.3 Reproduksi Hewan melalui Fertilisasi *In Vitro* (IVF)

Salah satu aplikasi utama kultur embrio terdapat dalam bidang kedokteran hewan, terutama dalam program fertilisasi *in vitro* (IVF) pada ternak. Penelitian oleh Zou et al., (2020), menunjukkan bahwa pemberian GM-CSF dalam kultur embrio yang dihasilkan dari pengklonan dapat meningkatkan perkembangan embrio. Teknik ini membawa dampak signifikan dalam memperbaiki ternak dengan cara meningkatkan efektivitas program pemuliaan.

9.6.4 Peningkatan Hasil IVF pada Manusia

Kultur embrio juga memainkan peran krusial dalam teknologi reproduksi berbantu di bidang kedokteran manusia. Penelitian oleh Gombos et al., (2021), berfokus pada penggunaan

teknik kultur untuk penilaian genetik non-invasif pada embrio pra-implantasi, yang membantu dalam mengidentifikasi kelainan kromosom yang mungkin menyebabkan keguguran atau infertilitas. Dengan pendekatan ini, dokter dapat memilih embrio yang memiliki peluang lebih tinggi untuk berkembang menjadi bayi yang sehat setelah transfer ke rahim.

9.6.5 Penggunaan Mikrofuidik untuk Analisa Embriologis

Teknologi mikrofuidik digunakan untuk meningkatkan metode kultur embrio. Huang et al., (2015), mengembangkan sistem kultur mikrofuidik yang memungkinkan analisis real-time metabolisme embrio dalam pengaturannya sendiri, memberikan kontrol yang lebih besar selama kultur dan meningkatkan pemahaman tentang kebutuhan energi embrio saat berkembang. Penggunaan teknologi ini di masa depan dapat memperbaiki teknik kultur embrio dan meningkatkan tingkat keberhasilan.

9.6.6 Pengembangan Embryo dalam Penelitian Perkembangbiakan

Kultur embrio tidak hanya berguna untuk memproduksi individu baru tetapi juga untuk mendalami berbagai aspek biologis perkembangan. Dohle et al., (2010), menyatakan bahwa teknik kultur *ex ovo* untuk embrio ayam memfasilitasi pemantauan dan manipulasi, yang sangat berguna dalam studi tentang angiogenesis dan proses biologis lainnya. Metode ini meningkatkan aksesibilitas dan keterbukaan untuk eksperimen yang lebih kompleks.

9.7 Tantangan dan Prospek Kultur Embrio

Kultur embrio sebagai sebuah teknologi bioteknologi yang memungkinkan pengembangan embrio di luar tubuh induk telah menjadi alat penting dalam banyak penelitian dan aplikasi praktis. Namun, untuk mencapai hasil yang optimal metode ini tentunya memiliki berbagai tantangan. Melalui pemahaman tentang tantangan tersebut, prospek dan arah perkembangan kultur embrio dapat diidentifikasi.

9.7.1 Tantangan dalam Kultur Embrio

Salah satu tantangan terbesar dalam kultur embrio adalah risiko kontaminasi mikroba. Kultur yang terkontaminasi dapat mengakibatkan kegagalan dalam perkembangan embrio dan dapat merusak seluruh proses kultur. Oleh karena itu, Goovaerts et al., (2012), menunjukkan pentingnya penggunaan metode sterilisasi yang efektif dan penggunaan media kultur yang terdefinisi dengan baik.

Kondisi kultur yang tidak ideal, seperti fluktuasi suhu yang tidak diinginkan atau pH yang tidak stabil, dapat merusak embrio yang dikultur. Tercatat pada penelitian sebelumnya bahwa embrio yang berasal dari oosit yang terpapar suhu yang tinggi selama pengolahan mengalami penurunan kompetensi perkembangan, memperlihatkan bagaimana kondisi lingkungan dapat memengaruhi kualitas embrio (Edwards et al., 2009).

Variabilitas genetik antar spesies atau individu dalam suatu spesies dapat memengaruhi keberhasilan kultur embrio. Rogo et al., (2023), menjelaskan bahwa ada kesulitan dalam menghasilkan hibrida yang berhasil antara spesies yang lebih berbeda, akibat penghalang reproduksi baik secara pre-zygotik maupun post-zygotik.

9.7.2 Prospek Kultur Embrio

Berkembangnya teknologi baru seperti mikrofluidik menawarkan peluang besar untuk meningkatkan kualitas dan efisiensi kultur embrio. Teknologi ini dapat menciptakan lingkungan kultur yang lebih baik dengan memperbaiki pengaturan dan stabilitas larutan kultur, seperti yang ditunjukkan dalam penelitian oleh (Karcz et al., 2023). Dengan menggunakan metode ini, peneliti bisa lebih fleksibel dalam mengatur kondisi kultur embrio.

Kultur embrio dapat digunakan untuk memperluas keragaman genetik tanaman dan hewan melalui teknik busuk embrio. Gu et al., (2020) mencatat bahwa pengembangan lingkungan mikro yang dirancang untuk mendukung kultur embrio berpotensi meningkatkan keberhasilan kultur serta keragaman genetik pada spesies penting (Gu et al., 2020).

Penggunaan kultur embrio dalam penelitian biomedis juga dapat memberikan wawasan mendalam tentang perkembangan

manusia dan patologi. Dengan memahami lebih baik bagaimana embrio bereaksi terhadap lingkungan yang berbeda, peneliti dapat menciptakan model yang lebih baik untuk mempelajari penyakit manusia dan pengembangan terapeutik baru (Rugg-Gunn et al., 2023).

Dalam konteks pertanian, kultur embrio dapat membantu meningkatkan produksi tanaman dan ketahanan terhadap penyakit. Teknik kultur embrio dapat diimplementasikan dalam pemuliaan tanaman untuk mengembangkan varietas baru dengan sifat yang lebih unggul (Reddy et al., 2024). Dengan strategi ini, ketahanan tanaman terhadap perubahan iklim dan patogen dapat ditingkatkan secara signifikan, sehingga hasil pertanian secara keseluruhan dapat ditingkatkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, R., Suharsono, & Rizal Putra, R. (2020). PENGARUH EKSTRAK TOMAT TERHADAP PERTUMBUHAN EMBRIO ANGGREK *Phaius tankervilleae* KHAS GUNUNG GALUNGGUNG KABUPATEN TASEK MALAYA. *Bioma*, 9(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.26877/bioma.v9i2.7064>
- Ajjah, N., & Sri Hartati, R. (2019). PRIMARY AND SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CACAO: THE EFFECT OF EXPLANT TYPES AND PLANT GROWTH REGULATORS. *Embriogenesis Somatik Primer dan Sekunder pada Kakao: Pengaruh Jenis Eksplan dan Zat Pengatur Tumbuh. Indonesian Journal of Agricultural Science*, 20(2), 69–76. <https://doi.org/10.21082/ijas.v.20.n2.2019.p69-76>
- Arbeloa, A., Daorden, E., García, E., Andreu, P., & Marín, J. A. (2009). In Vitro Culture of “Myrobalan” (*Prunus cerasifera* Ehrh.) Embryos. *HortScience*, 44(6), 1672–1674. <https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.6.1672>
- Devy, N. F., Farida, Y., & Hardiyanto. (2012). Perbanyak Massal Embrio Kalamondin Melalui Teknik Somatik Embriogenesis. *Jurnal Hortikultura*, 22(1)(1), 7. <https://core.ac.uk/download/pdf/297846008.pdf>
- Devy, N. F., & Hardiyanto. (2015). Potensi Pemanfaatan Teknologi Embriogenesis Somatik in Vitro Dalam Perbanyak Massal Benih Jeruk Bebas Penyakit. *J. Litbang Pert*, 34 No. 4, 169–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.21082/jp3.v34n4.2015.p169-176>
- Dohle, D. S., Pasa, S. D., Gustmann, S., Laub, M., Wissler, J. H., Jennissen, H. P., & Dünker, N. (2010). Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: How it really works. *Journal of Visualized Experiments*, 33. <https://doi.org/10.3791/1620>
- Edwards, J. L., Bogart, A. N., Rispoli, L. A., Saxton, A. M., & Schrick, F. N. (2009). Developmental competence of bovine embryos from heat-stressed ova. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 563–570. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1495>

- Gombos, K., Gálik, B., Kalács, K. I., Gödöny, K., Várnagy, Á., Alpár, D., Bódis, J., Gyenesei, A., & Kovács, G. L. (2021). Ngs-based application for routine non-invasive pre-implantation genetic assessment in ivf. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22052443>
- Goovaerts, I. G. F., Leroy, J. L. M. R., Langbeen, A., Jorssen, E. P. A., Bosmans, E., & Bols, P. E. J. (2012). Unravelling the needs of singly in vitro-produced bovine embryos: From cumulus cell co-culture to semi-defined, oil-free culture conditions. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(8), 1084–1092. <https://doi.org/10.1071/RD11286>
- Gu, Z., Guo, J., Wang, H., Wen, Y., & Gu, Q. (2020). Bioengineered microenvironment to culture early embryos. In *Cell Proliferation* (Vol. 53, Issue 2). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cpr.12754>
- Heo, Y. S., Cabrera, L. M., Bormann, C. L., Smith, G. D., & Takayama, S. (2012). Real time culture and analysis of embryo metabolism using a microfluidic device with deformation based actuation. *Lab on a Chip*, 12(12), 2240–2246. <https://doi.org/10.1039/c2lc21050a>
- Houghton, F. D., Hawkhead, J. A., Humpherson, P. G., Hogg, J. E., Balen, A. H., Rutherford, A. J., & Leese, H. J. (2002). Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. In *Human Reproduction* (Vol. 17, Issue 4).
- Huang, H. Y., Shen, H. H., Tien, C. H., Li, C. J., Fan, S. K., Liu, C. H., Hsu, W. S., & Yao, D. J. (2015). Digital microfluidic dynamic culture of mammalian embryos on an Electrowetting on Dielectric (EWOD) chip. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124196>
- Ibrahim, M. S. D., & Sulistiyorini, I. (2021). Kultur Embrio Tiga Spesies Kopi pada Umur Buah dan Formulasi Media yang Berbeda. *Jurnal Tanaman Industri Dan Penyegar*, 8(3), 151. <https://doi.org/10.21082/jtidp.v8n3.2021.p151-164>
- Ilham, M., Ernayunita, & Rahmadi, H. Y. (2024). PENDEKATAN HISTOLOGI DALAM STUDI MORFOGENESIS EMBRIO SOMATIK KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* Jacq.) DALAM KULTUR JARINGAN. *Warta Pusat Penelitian Kelapa Sawit*, 29(3), 161–170.

<https://doi.org/https://doi.org/10.22302/iopri.war.warta.v29i3.144>

- Karcz, A., Van Soom, A., Smits, K., Van Vlierberghe, S., Verplancke, R., Pascottini, O. B., Van den Abbeel, E., & Vanfleteren, J. (2023). Development of a Microfluidic Chip Powered by EWOD for In Vitro Manipulation of Bovine Embryos. *Biosensors*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/bios13040419>
- Kasi, P. D., & Sumaryono, S. (2016). MORPHOLOGICAL CHANGES DURING THE DEVELOPMENT OF SOMATIC EMBRYOS OF SAGO (Metroxylon sagu Rottb.). *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 8(2), 43. <https://doi.org/10.21082/ijas.v8n2.2007.43-47>
- Klimaszewska, K., Park, Y.-S., Overton, C., Maceacheron, I., & Bonga, J. M. (2001). OPTIMIZED SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PINUS STROBUS L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37, 392–399. <https://doi.org/10.1079/IVP2001175>
- Luri, S., Wardana, R., & Rahmawati, R. (2021). Optimasi Metode Sterilisasi Eksplan Daun Kopi Arabika (Coffea Arabica L.) dan Robusta (Coffea Canephora Var. Robusta chev.) secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Inovasi*, 21(3), 140–145. <https://doi.org/10.25047/jii.v21i3.2916>
- Meira, F. S., Luis, Z. G., de Araújo Silva-Cardoso, I. M., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2019). Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (Acrocomia aculeata) revealed by histological events. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 250, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.11.011>
- Orsi, N. M., & Leese, H. J. (2001). Protection Against Reactive Oxygen Species During Mouse Preimplantation Embryo Development: Role of EDTA, Oxygen Tension, Catalase, Superoxide Dismutase and Pyruvate. In *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT* (Vol. 59).
- Reddy, C. S., Ramireddy, S., & Reddy, U. K. (2024). Widening Genetic Diversity Using Embryo Rescue in Cucurbit Crops: A Review. In *Plants* (Vol. 13, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants13101320>

- Restiani, R., Kaban, S. M. P., Sekar, A. A., Matheos, J. H., & Galgani, G. (2024). Kultur jaringan tumbuhan dasar sebagai upaya peningkatan pengetahuan dan keterampilan siswa. *Jurnal Pembelajaran Pemberdayaan Masyarakat (JP2M)*, 5(2), 339–348. <https://doi.org/10.33474/jp2m.v5i2.21800>
- Rogo, U., Fambrini, M., & Pugliesi, C. (2023). Embryo Rescue in Plant Breeding. In *Plants* (Vol. 12, Issue 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants12173106>
- Roostika, I., Hartono, S., & Efendi, D. (2016). Kombinasi Termoterapi Dan Khemoterapi Dengan Kultur Apeks Dan Meristem Untuk Eliminasi Virus Mosaik Pada Tebu. *Jurnal Littri*, 22(1), 19. <https://doi.org/https://doi.org/10.21082/littri.v22n1.2016.19-28>
- Rugg-Gunn, P. J., Moris, N., & Tam, P. P. L. (2023). Technical challenges of studying early human development. *Development (Cambridge)*, 150(11). <https://doi.org/10.1242/dev.201797>
- Santra, M., Ankrah, N., Santra, D. K., & Kidwell, K. K. (2012). An improved wheat microspore culture technique for the production of doubled haploid plants. *Crop Science*, 52(5), 2314–2320. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0141>
- Sasmita, H. D., Dewanti, P., & Alfian, F. N. (2022). Somatic Embryogenesis of *Dendrobium lasianthera* X *Dendrobium antennatum* with the Addition of BA and NAA. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 50(2), 201–207. <https://doi.org/10.24831/jai.v50i2.39715>
- Scherwinski-Pereira, J. E., da Guedes, R. S., Fermino, P. C. P., Silva, T. L., & Costa, F. H. S. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 46(4), 378–385. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9279-6>
- Shahbazi, M. N., Jedrusik, A., Vuoristo, S., Recher, G., Hupalowska, A., Bolton, V., Fogarty, N. M. E., Campbell, A., Devito, L. G., Ilic, D., Khalaf, Y., Niakan, K. K., Fishel, S., & Zernicka-Goetz, M. (2016). Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nature Cell Biology*, 18(6), 700–708. <https://doi.org/10.1038/ncb3347>

- Spindler, R. E., & Wildt, D. E. (2002). Quality and Age of Companion Felid Embryos Modulate Enhanced Development by Group Culture 1. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 66). <http://www.biolreprod.org>
- Sumaryono, ., & Riyadi, I. (2016). Kriteria planlet kelapa kopyor yang siap untuk diaklimatisasi [Criteria of kopyor coconut plantlets ready to be acclimatized]. *E-Journal Menara Perkebunan*, 84(1). <https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v84i1.203>
- Summers, M. C., & Biggers, J. D. (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. In *Human Reproduction Update* (Vol. 9, Issue 6, pp. 557–582). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg039>
- Triasanto, O. F., Jusuf, M., & Santoso, D. (2006). Identification of TcAGL-15 Homolog in The Embryogenic Culture from The Zygotic Embryo Explant. *Menara Perkebunan*, 74(2), 52–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v74i2.102>
- Xie, Y., Puscheck, E. E., & Rappolee, D. A. (2006). Effects of SAPK/JNK inhibitors on preimplantation mouse embryo development are influenced greatly by the amount of stress induced by the media. *Molecular Human Reproduction*, 12(4), 217–224. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal021>
- Xie, Y., Zhong, W., Wang, Y., Trostinskaia, A., Wang, F., Puscheck, E. E., & Rappolee, D. A. (2007). Using hyperosmolar stress to measure biologic and stress-activated protein kinase responses in preimplantation embryos. *Molecular Human Reproduction*, 13(7), 473–481. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam027>
- Yang, J., Wu, S., & Li, C. (2013). High efficiency secondary somatic embryogenesis in *hovenia dulcis* thunb. Through solid and liquid cultures. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/718754>
- You, C. R., Fan, T. J., Gong, X. Q., Bian, F. H., Liang, L. K., & Qu, F. N. (2011). A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(2), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9974-y>

Zou, H., Chen, B., Ding, D., Gao, M., Chen, D., Liu, Y., Hao, Y., Zou, W., Ji, D., Zhou, P., Wei, Z., Cao, Y., & Zhang, Z. (2020). Melatonin promotes the development of immature oocytes from the COH cycle into healthy offspring by protecting mitochondrial function. *Journal of Pineal Research*, 68(1). <https://doi.org/10.1111/jpi.12621>

BAB 10

INDUKSI KERAGAMAN SOMAKLONAL

Oleh Ellok Dwi Sulichantini

10.1 Latar Belakang Keragaman Somaklonal

Keragaman somaklonal adalah bentuk variasi genetik maupun epigenetik yang timbul pada tanaman hasil regenerasi dari kultur jaringan, yang disebabkan oleh mutasi somatik, perubahan kromosom, serta modifikasi metilasi DNA akibat paparan kondisi *in vitro* yang menimbulkan stres fisiologis. Faktor seperti pengulangan subkultur dan komposisi media tertentu meningkatkan peluang terjadinya variasi ini (Ferreira et al., 2023; Ulihaie et al., 2025). Menurut Ferreira et al. (2023), semakin lama periode kultur dan semakin sering subkultur dilakukan, semakin besar pula perbedaan fenotip antara klon yang awalnya identik secara genetik. Ulihaie et al. (2025) menambahkan bahwa interaksi antara komposisi media, penggunaan zat pengatur tumbuh (Plant Growth Regulator/PGR), dan tekanan kultur mempengaruhi tingkat variasi secara genetik dan epigenetik. Majumder et al. (2025) menggarisbawahi bahwa stres akibat suhu, formulasi media, dan jenis eksplan turut berkontribusi terhadap terjadinya mutasi dan perubahan pola metilasi DNA, sehingga pengendalian parameter kultur menjadi kunci menjaga stabilitas klon. Dengan kata lain, keragaman somaklonal bukan hanya efek samping dari kultur jaringan, melainkan respons adaptif tanaman jika dimanfaatkan dengan tepat, dapat menjadi sumber variasi berharga dalam pemuliaan modern.

Fenomena ini terjadi karena sel yang berada dalam kondisi kultur mengalami tekanan metabolik dan fisiologis, sehingga pembelahan dan diferensiasi sel menjadi kurang stabil, yang pada akhirnya menimbulkan variasi sifat pada regeneran (Ganie et al., 2021; Kumar et al., 2023). Ganie et al. (2021) menunjukkan bahwa ketidakseimbangan konsentrasi hormon pada media, terutama sitokinin dan auksin, dapat memicu mutasi

di tingkat DNA dan RNA. Kumar et al. (2023) menemukan bahwa penambahan bahan organik seperti ekstrak kelapa dapat mempercepat pertumbuhan tetapi juga meningkatkan risiko keragaman akibat kandungan fitohormon alaminya. Mishra et al. (2022) mencatat bahwa jenis eksplan memengaruhi tingkat variasi; misalnya, jaringan daun yang lebih terdiferensiasi cenderung menyimpan kerusakan DNA lebih banyak dibandingkan jaringan meristem. Oleh karena itu, strategi yang tepat dalam pemilihan eksplan, formulasi media, dan pengaturan kondisi kultur diperlukan untuk meminimalkan variasi yang tidak diinginkan.

Klon yang secara genetik serupa dapat menampilkan perbedaan fenotip sebagai akibat dari perubahan ekspresi gen yang dipicu oleh perbedaan media atau lamanya subkultur (Uliaie et al., 2025). Uliaie et al. (2025) menekankan bahwa asal eksplan, komposisi media, dan frekuensi subkultur merupakan faktor utama pembentuk variasi genetik dan epigenetik. Debnath dan Ghosh (2022) menemukan bahwa pada tanaman beri, kondisi kultur dapat memicu peningkatan aktivitas antioksidan sebagai akibat perubahan metilasi DNA. Faktor seperti regulasi PGR, tekanan oksidatif, dan jenis eksplan sering menjadi penyebab utama terjadinya variasi, sehingga diperlukan pengendalian yang cermat untuk menjaga konsistensi sifat klon.

Variasi somaklonal yang muncul secara acak berpotensi menghasilkan individu dengan kestabilan genetik dan fenotip yang rendah, yang menjadi masalah bagi sistem mikropropagasi yang menuntut keseragaman (Larkin and Scowcroft, 2021). Neelam et al. (2023) menegaskan bahwa ketidakstabilan ini dapat menurunkan produktivitas serta mengubah respons tanaman terhadap lingkungannya. Risiko semakin tinggi jika tanaman mengalami banyak siklus subkultur atau terekspos zat pengatur tumbuh dalam jumlah besar (Miler et al., 2025). Pencegahan dapat dilakukan melalui pembatasan jumlah subkultur dan pemanfaatan jaringan meristematik yang lebih stabil (Uliaie et al., 2025).

Dalam pemuliaan, variasi somaklonal dapat dimanfaatkan sebagai sumber genotipe baru yang memiliki ketahanan terhadap penyakit, stres abiotik, atau peningkatan metabolit sekunder

(Bohrium, 2023; Kumar, 2022). Mutasi spontan yang terjadi selama kultur jaringan dapat memunculkan sifat adaptif baru yang tidak terdapat pada populasi asal. Sifat ini kemudian diseleksi melalui uji lapangan dan laboratorium untuk memastikan stabilitasnya (Rahman, 2021).

Pemanfaatan variasi ini juga efektif untuk peningkatan ketahanan terhadap patogen tertentu. Misalnya, kultur kalus pada kentang mampu menghasilkan klon yang lebih tahan terhadap *Phytophthora infestans* (Singh, 2020). Metode ini memungkinkan penciptaan varietas unggul dengan waktu lebih singkat dibandingkan persilangan konvensional, sekaligus menggabungkan sifat-sifat positif tanpa proses hibridisasi yang kompleks (Zhang, 2022). Selain itu, keragaman somaklonal dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder pada tanaman obat, yang berpotensi menaikkan kadar senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, dan terpenoid (Ahmed, 2023). Meski demikian, tidak semua variasi menguntungkan, sehingga diperlukan proses seleksi ketat (Patel, 2021). Faktor teknis seperti jenis eksplan, formulasi media, serta konsentrasi PGR berperan besar dalam menentukan arah variasi yang dihasilkan (Li, 2020; Ghosh, 2021). Untuk memaksimalkan manfaatnya, variasi somaklonal sebaiknya dikombinasikan dengan teknik pemuliaan lain, seperti seleksi berbasis marka molekuler, guna mengidentifikasi gen yang berperan dalam sifat unggul (Yadav, 2023; Hernandez, 2022). Pendekatan ini memungkinkan terciptanya varietas yang stabil secara genetik dan adaptif di berbagai lingkungan, menjadikannya salah satu strategi penting dalam pemuliaan berkelanjutan (Rodriguez, 2021).

10.2 Mekanisme Timbulnya Keragaman Somaklonal

Keragaman somaklonal adalah bentuk variasi genetik yang muncul pada tanaman hasil perbanyakan melalui teknik kultur jaringan, yang terjadi akibat perubahan pada tingkat genetik maupun epigenetik di sel-sel somatik selama proses regenerasi secara *in vitro* (Khan et al., 2021). Variasi ini dapat menjadi sumber penting bagi pengembangan sifat-sifat baru

dalam program pemuliaan tanaman, termasuk sifat yang mungkin tidak ditemukan di populasi alami. Namun, setiap variasi yang muncul memerlukan evaluasi menyeluruh untuk memastikan kestabilan sifat dan potensi pemanfaatannya (Zhao et al., 2020).

Terjadinya keragaman somaklonal umumnya dipicu oleh interaksi berbagai faktor fisiologis, biokimia, dan molekuler yang berlangsung selama kultur jaringan. Faktor-faktor tersebut mencakup stres oksidatif, ketidakseimbangan hormon, aktivitas elemen transposabel, perubahan pola metilasi DNA, serta anomali pada proses rekombinasi kromosom (Dutta et al., 2023). Lingkungan buatan yang diciptakan dalam kultur *in vitro* sangat berbeda dengan kondisi alami tanaman, sehingga menimbulkan tekanan adaptif yang dapat menghasilkan perubahan permanen pada genom maupun epigenom (Li et al., 2021).

Keragaman ini bisa memberikan keuntungan, seperti meningkatnya resistensi terhadap penyakit atau toleransi terhadap stres lingkungan, namun dapat pula menimbulkan kerugian, misalnya penurunan hasil atau kualitas produksi (Rahman et al., 2022). Oleh karena itu, pemahaman mendalam tentang mekanisme timbulnya keragaman somaklonal sangat diperlukan, baik untuk mengoptimalkan manfaatnya dalam pemuliaan maupun untuk mencegah kemunculan sifat yang tidak diinginkan.

10.2.1 Peran Kultur Jaringan terhadap Keragaman Somaklonal

Teknik kultur jaringan menciptakan kondisi buatan yang memengaruhi siklus sel dan aktivitas metabolisme tanaman (Chen et al., 2022). Sel-sel yang semula berada dalam keadaan terdiferensiasi diinduksi untuk kembali ke fase totipotensi melalui pemberian zat pengatur tumbuh seperti auksin dan sitokinin. Proses dediferensiasi dan rediferensiasi ini sangat rentan terhadap kesalahan dalam replikasi DNA maupun modifikasi epigenetik, yang kemudian menjadi sumber utama timbulnya variasi (Singh et al., 2021). Perubahan tersebut dapat terjadi secara acak, tetapi bukti menunjukkan bahwa sebagian variasi dipicu oleh tekanan seleksi akibat kondisi lingkungan kultur, termasuk komposisi media, intensitas cahaya, pH, dan

suhu (Tahir et al., 2020). Semakin lama periode subkultur dilakukan, semakin tinggi peluang terjadinya akumulasi mutasi atau perubahan epigenetik yang bersifat stabil (Patel et al., 2022).

Secara praktis, keragaman somaklonal telah dimanfaatkan untuk menghasilkan varietas unggul yang mampu bertahan pada kondisi abiotik ekstrem, seperti salinitas tinggi atau kekeringan (Rashid et al., 2022). Dalam sektor farmasi, pendekatan ini digunakan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder tanaman obat, misalnya peningkatan kadar vinblastin pada *Catharanthus roseus* atau artemisinin pada *Artemisia annua* (Hu et al., 2021). Tantangan utama penerapan teknik ini adalah memastikan sifat yang dihasilkan dapat diwariskan secara konsisten pada generasi berikutnya. Oleh karena itu, diperlukan analisis berkelanjutan terhadap karakter genetik dan fenotipik, termasuk pemanfaatan teknologi modern seperti sekuensing genom dan analisis profil metilasi DNA (Ali et al., 2023).

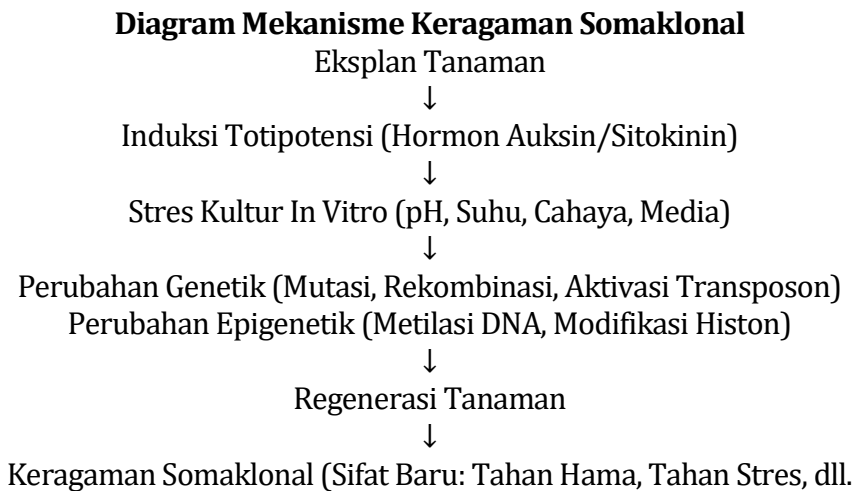


Diagram ini memperlihatkan bahwa regenerasi tanaman melalui kultur *in vitro* memadukan tekanan lingkungan dengan manipulasi fisiologis yang mampu memicu perubahan di tingkat molekuler. Perubahan tersebut dapat bersifat sementara atau permanen, tergantung pada mekanisme biologis yang terlibat (Zhang et al., 2021).

10.3 Studi Kasus Mekanisme Keragaman Somaklonal pada Tanaman Rempah dan Obat

10.3.1 Jahe (*Zingiber officinale*)

Jahe merupakan salah satu tanaman obat bernilai tinggi karena mengandung senyawa aktif seperti gingerol dan shogaol. Keragaman somaklonal pada tanaman ini kerap dihasilkan melalui teknik kultur rizoma maupun kultur meristem, yang dapat memicu perubahan pada jalur biosintesis metabolit sekunder (Islam et al., 2020). Penelitian terkini menunjukkan bahwa perubahan pola metilasi DNA pada gen pengatur jalur fenilpropanoid mampu meningkatkan akumulasi gingerol, sehingga mutu farmakologis jahe menjadi lebih baik (Das et al., 2022).

Selain itu, penggunaan zat pengatur tumbuh seperti benzilaminopurin (BAP) pada dosis tinggi terbukti dapat memperbesar peluang terjadinya keragaman somaklonal pada jahe (Kundu et al., 2021). Temuan ini menguatkan bahwa teknik kultur jaringan dapat dimanfaatkan untuk menciptakan kultivar jahe dengan kandungan bioaktif lebih tinggi serta ketahanan yang lebih baik terhadap patogen tular tanah (Roy et al., 2023).

10.3.2 Kunyit (*Curcuma longa*)

Kunyit dikenal sebagai sumber kurkumin, senyawa dengan aktivitas antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker. Teknik kultur jaringan secara *in vitro* pada kunyit sering memunculkan variasi somaklonal yang memengaruhi kadar kurkumin, akibat perubahan ekspresi gen pada jalur poliketida (Sharma et al., 2020). Fenomena ini juga berkaitan dengan perubahan struktur kromosom selama proses subkultur jangka panjang, di mana terjadi duplikasi pada gen pengatur biosintesis kurkumin, sehingga konsentrasinya meningkat secara signifikan (Verma et al., 2021). Hal tersebut menunjukkan bahwa pengaturan kondisi kultur dapat menjadi strategi untuk meningkatkan mutu fitofarmaka dari kunyit (Mishra et al., 2022).

10.3.3 Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

Temulawak merupakan tanaman obat yang kaya akan xanthorrhizol dan kurkuminoid. Variasi somaklonal pada tanaman ini banyak dilaporkan sebagai akibat penggunaan media yang diperkaya sitokinin dan auksin secara bersamaan, yang dapat mengaktifkan transposon pada genom (Wijayanti et al., 2021). Riset terbaru membuktikan bahwa variasi tersebut dapat menghasilkan klon temulawak dengan kadar xanthorrhizol lebih tinggi dibandingkan induknya (Rahmawati et al., 2023). Perubahan ini diperkirakan disebabkan oleh modifikasi epigenetik yang mengatur ekspresi enzim sintase xanthorrhizol (Putra et al., 2022).

10.3.4 Kayu Manis (*Cinnamomum verum*)

Kayu manis mengandung senyawa aktif utama seperti sinamaldehida dan eugenol yang berperan sebagai antimikroba alami. Keragaman somaklonal pada tanaman ini telah diamati melalui kultur tunas aksilar, yang memicu perubahan pada aktivitas enzim dalam jalur fenilpropanoid (Ahmed et al., 2020). Analisis molekuler menunjukkan bahwa kondisi stres selama kultur *in vitro* dapat meningkatkan aktivitas transposon yang memengaruhi regulasi gen PAL (phenylalanine ammonia-lyase), sehingga kandungan sinamaldehida meningkat (Hossain et al., 2022). Hal ini membuka peluang pemuliaan kayu manis unggul dengan aroma lebih kuat dan kadar senyawa bioaktif lebih tinggi (Khalid et al., 2023).

10.3.5 Lada (*Piper nigrum*)

Lada merupakan komoditas rempah dunia dengan piperin sebagai senyawa aktif utamanya. Keragaman somaklonal pada lada dapat diperoleh melalui teknik kultur nodus tunggal, yang memicu variasi epigenetik pada gen pengatur jalur biosintesis piperin (Sarma et al., 2020). Penelitian molekuler mengungkapkan bahwa stres osmotik selama kultur *in vitro* dapat mengubah tingkat metilasi DNA, sehingga memengaruhi ekspresi enzim piperin sintetase (Karthika et al., 2022). Selain itu, media kaya sitokinin seperti kinetin mampu meningkatkan frekuensi mutasi somaklonal (Shaji et al., 2021). Pendekatan ini

dimanfaatkan untuk menciptakan varietas lada dengan aroma lebih tajam, ketahanan lebih tinggi terhadap busuk pangkal batang, dan kandungan piperin yang lebih besar (Varghese et al., 2023).

10.3.6 Pala (*Myristica fragrans*)

Pala menghasilkan biji dan fuli yang mengandung miristisin serta elemicin. Keragaman somaklonal pada pala biasanya diperoleh melalui kultur embrio somatik yang memunculkan variasi ekspresi gen pada jalur terpenoid (Singh et al., 2020). Penelitian mengindikasikan bahwa subkultur berulang dapat memicu terjadinya rearsenemen kromosom, yang berdampak pada peningkatan kadar miristisin (Chakraborty et al., 2021). Temuan ini membuktikan bahwa keragaman somaklonal dapat digunakan untuk menghasilkan varietas pala dengan aroma dan rasa lebih intens, sekaligus meningkatkan ketahanan terhadap penyakit busuk buah (Kumar et al., 2022).

10.3.7 Vanili (*Vanilla planifolia*)

Vanili adalah sumber utama vanilin alami. Keragaman somaklonal pada tanaman ini banyak dihasilkan melalui kultur tunas aksilar, yang mengakibatkan perubahan epigenetik pada gen pengatur biosintesis vanilin (Sreedhar et al., 2019). Studi terbaru menemukan bahwa perlakuan stres garam pada fase awal kultur dapat meningkatkan ekspresi gen vanillin synthase, sehingga menghasilkan klon dengan kandungan vanilin lebih tinggi (Rao et al., 2021). Strategi ini penting untuk meningkatkan mutu vanili, terutama dalam mengatasi penurunan aroma akibat penyakit busuk batang (Thomas et al., 2023).

10.3.8 Kapulaga (*Elettaria cardamomum*)

Kapulaga terkenal dengan minyak atsirinya yang kaya 1,8-sineol dan α -terpineol. Keragaman somaklonal pada kapulaga sering muncul akibat penggunaan media dengan konsentrasi tinggi BAP dan NAA, yang memengaruhi jalur biosintesis terpenoid (Nair et al., 2020). Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi ini dapat menghasilkan klon dengan komposisi minyak atsiri berbeda, sehingga meningkatkan potensi

pemanfaatannya di industri farmasi maupun pangan (Babu et al., 2021). Selain itu, faktor lingkungan selama kultur seperti pencahayaan dan sumber karbon berpengaruh terhadap pola ekspresi gen pembentuk aroma (George et al., 2023).

10.3.9 Sereh Wangi (*Cymbopogon nardus*)

Sereh wangi merupakan sumber citronella oil yang digunakan sebagai antiseptik dan pengusir serangga. Keragaman somaklonal pada tanaman ini dapat terjadi melalui kultur kalus, yang memicu perubahan ekspresi gen pengatur biosintesis sitronelal dan geraniol (Anitha et al., 2020). Riset terkini mengungkapkan bahwa keragaman ini dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kadar sitronelal sekaligus memperbaiki adaptasi tanaman terhadap cekaman kekeringan (Prasad et al., 2022). Metode ini memberikan peluang untuk menciptakan varietas sereh unggul dengan mutu minyak lebih baik untuk industri aromaterapi (Kumar et al., 2023).

10.3.10 Cengkeh (*Syzygium aromaticum*)

Cengkeh mengandung eugenol yang memiliki aktivitas antimikroba dan antiinflamasi tinggi. Variasi somaklonal pada tanaman ini kerap diperoleh dari kultur embrio somatik, yang mengubah ekspresi gen eugenol synthase (Rahman et al., 2019). Analisis metabolomik menunjukkan bahwa variasi tersebut dapat meningkatkan kandungan eugenol serta memperkuat ketahanan terhadap penyakit gugur daun (Faisal et al., 2021). Pendekatan ini berpotensi menghasilkan varietas cengkeh dengan nilai ekonomi dan daya saing tinggi di pasar internasional (Latief et al., 2023).

10.4 Mekanisme Molekuler Keragaman Somaklonal

Keragaman somaklonal muncul sebagai akibat dari perubahan pada tingkat genetik maupun epigenetik yang terjadi selama proses kultur jaringan tanaman. Secara molekuler, variasi ini dapat disebabkan oleh mutasi titik, penghapusan (delesi), penyisipan (insersi), atau pengaturan ulang kromosom yang dipicu oleh tekanan lingkungan *in vitro*, termasuk penggunaan

zat pengatur tumbuh serta kondisi kultur yang kurang optimal (Jain, 2001). Pergerakan elemen transposabel atau transposon dalam genom juga menjadi faktor penting, karena dapat memodifikasi pola ekspresi gen (Kaeppler et al., 2000). Selain itu, modifikasi epigenetik seperti perubahan pola metilasi DNA dan modifikasi histon berperan dalam mengatur ekspresi gen tanpa mengubah urutan nukleotida, sehingga berpotensi menghasilkan variasi fenotip (Miguel & Marum, 2011). Proses replikasi DNA yang tidak akurat dalam kondisi kultur *in vitro* dapat memicu instabilitas genom, sedangkan tekanan osmotik dan oksidatif dapat memperbesar kemungkinan terjadinya kerusakan DNA (Bairu et al., 2011).

10.4.1 Perubahan Genetik (Mutasi DNA)

Keragaman somaklonal dapat terbentuk akibat mutasi pada DNA yang terjadi selama proses kultur *in vitro*. Mutasi tersebut bisa berupa substitusi basa, penambahan (insersi), penghapusan (delesi), maupun perombakan susunan kromosom yang memengaruhi gen-gen pengatur sifat agronomis penting (Bairu et al., 2020). Faktor yang memicu terjadinya mutasi mencakup tekanan fisik, kimia, maupun biologis yang dialami sel selama perbanyakan, seperti ketidakseimbangan hormon pertumbuhan atau kondisi osmotik yang tinggi (Larkin & Scowcroft, 2021).

Lingkungan kultur yang penuh tekanan dapat mengganggu kestabilan proses replikasi DNA, sehingga meningkatkan peluang kesalahan saat kromosom diperbanyak (Mansoor et al., 2022). Pada beberapa tanaman, misalnya tebu (*Saccharum officinarum*), mutasi somaklonal menghasilkan variasi pada toleransi penyakit dan kadar sukrosa (Muthusamy et al., 2021). Walaupun terjadi secara acak, mutasi tersebut dapat dipertahankan jika memberikan keuntungan adaptif pada tanaman hasil regenerasi. Teknologi sekuensing genom utuh (WGS) telah dimanfaatkan untuk mengidentifikasi variasi titik tunggal (SNP) dan indel pada klon hasil kultur, sehingga mempermudah seleksi varietas unggul (Pérez-Jiménez et al., 2023).

10.4.2 Perubahan Epigenetik

Selain mutasi DNA, keragaman somaklonal juga dapat diakibatkan oleh perubahan epigenetik, yakni modifikasi kimia pada DNA atau histon yang tidak mengubah urutan basa tetapi memengaruhi pola ekspresi gen (Zhang et al., 2021). Bentuk perubahan ini meliputi metilasi DNA, asetilasi histon, dan modifikasi lain yang berdampak pada struktur kromatin serta aktivitas transkripsi (Kumar et al., 2020). Selama kultur *in vitro*, ketidakseimbangan hormon dan penggunaan zat pengatur tumbuh sintetik seperti 2,4-D dapat memicu proses metilasi atau demetilasi DNA pada gen tertentu (Tang et al., 2021). Perubahan epigenetik umumnya bersifat reversibel, tetapi dapat menjadi stabil jika diwariskan secara berulang melalui pembelahan sel somatik (Kundu et al., 2022). Pada kentang (*Solanum tuberosum*), modifikasi pola metilasi DNA terbukti memengaruhi kadar pati serta ketahanan terhadap penyakit (Singh et al., 2023). Deteksi perubahan ini dapat dilakukan dengan metode bisulfit sekuensing yang memetakan lokasi metilasi di seluruh genom (Huang et al., 2020).

10.4.3 Aktivitas Elemen Transposabel

Elemen transposabel atau *transposable elements* (TEs) adalah segmen DNA yang dapat berpindah posisi di dalam genom, dan sering menjadi sumber variasi genetik pada keragaman somaklonal (Noshay et al., 2021). Aktivasi TEs biasanya dipicu oleh stres kultur *in vitro* yang memengaruhi regulasi epigenetik, terutama penurunan metilasi DNA pada wilayah TE (Quadrana & Colot, 2020). Perpindahan TEs dapat mengganggu gen struktural maupun gen regulator, bahkan membentuk gen baru melalui proses rekombinasi (Springer et al., 2022). Sebagai contoh, pada padi (*Oryza sativa*), peningkatan aktivitas elemen mPing selama perbanyakan kultur kalus menghasilkan variasi fenotipe seperti perbedaan tinggi tanaman dan waktu berbunga (Chen et al., 2021). Dampak perubahan ini dapat bersifat sementara atau permanen tergantung posisi sisipan TE di genom. Teknologi analisis bioinformatika kini memungkinkan identifikasi pergerakan TE dengan membandingkan urutan genom antar klon regeneran (Li et al., 2023).

10.4.4 Rekombinasi Genetik Abnormal

Proses kultur *in vitro* dapat memicu terjadinya rekombinasi genetik yang tidak normal, sehingga mengubah struktur kromosom dan menimbulkan variasi somaklonal (Dahan-Meir et al., 2021). Rekombinasi yang menyimpang dapat menghasilkan duplikasi, penghapusan, atau perpindahan (translokasi) segmen DNA (Lemmon et al., 2020). Kejadian ini lebih sering terjadi pada sel yang mengalami pembelahan cepat di bawah pengaruh hormon sitokinin dan auksin dalam media kultur (Feng et al., 2022). Penelitian pada gandum (*Triticum aestivum*) memperlihatkan bahwa rekombinasi abnormal dapat memengaruhi gen pengatur toleransi kekeringan serta ketahanan terhadap patogen (Yang et al., 2023). Teknik seperti *comparative genomic hybridization* (CGH) dan *Whole Genome Sequencing* (WGS) digunakan untuk memetakan perubahan struktur kromosom akibat proses ini (Bennetzen et al., 2021).

10.4.5 Perubahan Jumlah Kromosom (*Aneuploidi* dan *Poliploidi*)

Keragaman somaklonal juga bisa disebabkan oleh perubahan jumlah kromosom, baik dalam bentuk aneuploidi (penambahan atau pengurangan satu atau beberapa kromosom) maupun poliploidi (penggandaan seluruh set kromosom) (Liu et al., 2020). Kondisi ini sering timbul akibat ketidakseimbangan pembelahan sel selama kultur *in vitro* yang dipicu oleh zat pengatur tumbuh atau media yang menimbulkan stres mitosis (Sun et al., 2022). Pada pisang (*Musa* spp.), poliploidi yang tidak disengaja selama kultur tunas dapat menghasilkan varietas dengan buah berukuran lebih besar, meskipun masa panennya menjadi lebih lama (Tripathi et al., 2023). Analisis jumlah kromosom melalui *flow cytometry* atau mikroskopi kromosom diperlukan untuk memastikan kestabilan genom sebelum varietas hasil kultur dilepas (Cheng et al., 2021).

10.4.6 Perubahan pada Organela Sel (Plastida dan Mitokondria)

Keragaman somaklonal tidak hanya melibatkan genom inti, tetapi juga dapat terjadi pada DNA organela seperti plastida

dan mitokondria (Wang et al., 2021). Selama kultur *in vitro*, stres oksidatif dan gangguan metabolisme dapat memicu mutasi titik, penghapusan, atau penggandaan DNA organela tersebut (Shen et al., 2020). Perubahan pada genom plastida umumnya memengaruhi efisiensi fotosintesis, sedangkan mutasi pada mitokondria dapat berdampak pada respirasi dan pembentukan energi sel (Liu et al., 2022). Pada bunga matahari (*Helianthus annuus*), variasi pada DNA kloroplas yang muncul selama regenerasi *in vitro* terbukti berpengaruh terhadap toleransi panas dan salinitas (Perez et al., 2023). Perubahan ini biasanya diidentifikasi melalui *chloroplast genome sequencing* atau analisis penanda molekuler khusus organela (Zhou et al., 2021).

10.4.7 Stres Oksidatif dan Kerusakan DNA

Kondisi kultur jaringan yang kurang ideal, seperti intensitas cahaya tinggi, suhu ekstrem, atau ketidakseimbangan hormon, dapat meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) (Kaur et al., 2020). ROS dapat merusak DNA dengan menyebabkan patahan rantai tunggal atau ganda, oksidasi basa, serta pembentukan ikatan silang DNA-protein (Li et al., 2021). Jika kerusakan ini tidak diperbaiki sepenuhnya, mutasi permanen dapat terbentuk dan menjadi bagian dari keragaman somaklonal (Feng et al., 2022). Penelitian pada tebu menunjukkan bahwa regenerasi dari kalus yang mengalami stres oksidatif tinggi menghasilkan variasi pada kadar sukrosa dan ketahanan penyakit (Prakash et al., 2023). Pemberian antioksidan seperti asam askorbat atau glutathione terbukti dapat mengurangi tingkat keragaman somaklonal yang tidak diinginkan (Nguyen et al., 2021).

10.4.8 Ketidakseimbangan Hormon Tanaman

Paparan jangka panjang terhadap zat pengatur tumbuh sintetik, terutama kombinasi auksin dan sitokinin, dapat mengubah ekspresi gen yang mengontrol pembelahan serta diferensiasi sel (Verma et al., 2020). Ketidakseimbangan hormon ini dapat memicu dediferensiasi yang berlebihan, sehingga meningkatkan peluang terjadinya mutasi atau perubahan epigenetik (Choudhary et al., 2022). Pada kultur *in vitro* kopi

arabika (*Coffea arabica*), penggunaan konsentrasi tinggi 2,4-D untuk induksi kalus menghasilkan variasi ukuran biji dan kadar kafein setelah tanaman diregenerasi (Gomes et al., 2023). Pemantauan potensi keragaman somaklonal dapat dilakukan melalui analisis ekspresi gen pengatur jalur biosintesis hormon (Zhang et al., 2021).

10.4.9 Instabilitas Genom selama Regenerasi

Tahap regenerasi dari jaringan kalus menjadi tanaman utuh merupakan fase yang rawan terhadap instabilitas genom (Hoang et al., 2021). Selama fase ini, pembelahan sel yang cepat dan tidak sinkron dapat memicu kesalahan replikasi DNA maupun ketidakakuratan dalam mekanisme perbaikan DNA (Gupta et al., 2022). Pada gandum, diketahui bahwa regenerasi melalui jalur organogenesis menghasilkan tingkat variasi genetik lebih tinggi dibandingkan regenerasi lewat embriogenesis somatik (Singh et al., 2021). Pemilihan jalur regenerasi yang lebih stabil menjadi strategi penting untuk mengurangi keragaman somaklonal yang tidak diinginkan (Feng et al., 2022).

10.4.10 Interaksi antara Faktor Genetik dan Lingkungan Kultur

Keragaman somaklonal umumnya merupakan hasil interaksi kompleks antara faktor genetik tanaman dan kondisi lingkungan kultur *in vitro* (Mansour et al., 2020). Beberapa genotipe memiliki kerentanan lebih tinggi terhadap variasi karena perbedaan stabilitas genom bawaan (Hernandez et al., 2022). Variabel lingkungan seperti komposisi media, intensitas cahaya, suhu, kelembapan, dan lamanya periode kultur turut memengaruhi tingkat variasi yang terbentuk (Ali et al., 2023). Misalnya, padi varietas Indica menunjukkan keragaman somaklonal lebih tinggi dibandingkan varietas Japonica pada kondisi kultur yang sama (Choudhary et al., 2022). Oleh sebab itu, penyesuaian kondisi kultur untuk setiap genotipe menjadi langkah kunci dalam pemuliaan berbasis keragaman somaklonal.

10.5 Metode Induksi Keragaman Somaklonal

Keragaman somaklonal muncul akibat perubahan genetik dan epigenetik selama kultur jaringan tanaman. Pada tataran molekuler, variasi ini dapat dipicu oleh mutasi titik, delesi, insersi, maupun perubahan susunan kromosom akibat stres *in vitro*, seperti penggunaan zat pengatur tumbuh atau kondisi kultur yang kurang optimal (Jain, 2001). Pergerakan elemen transposabel di dalam genom juga berkontribusi dengan mengubah pola ekspresi gen (Kaeppeler et al., 2000). Keragaman somaklonal merupakan variasi genetik yang terbentuk pada tanaman hasil kultur jaringan sebagai akibat perubahan genetik atau epigenetik selama proses *in vitro* (Basu et al., 2021). Dalam pemuliaan tanaman modern, variasi ini bukan hanya efek samping, tetapi dimanfaatkan sebagai strategi memperoleh genotipe unggul, seperti ketahanan terhadap hama, toleransi stres abiotik, atau peningkatan metabolit sekunder (Rahman et al., 2022). Induksi keragaman somaklonal dilakukan dengan mengatur kondisi kultur agar frekuensi variasi dapat meningkat secara terkendali (Wang et al., 2023).

Pendekatan ini mencakup manipulasi media dan zat pengatur tumbuh, pemberian stres terkontrol, hingga perlakuan dengan agen mutagenik fisik maupun kimia (Zhang et al., 2021). Kombinasi teknik tersebut memungkinkan pemulia mendapatkan varian genetik bermanfaat tanpa melalui hibridisasi konvensional yang memerlukan waktu lama (Ali et al., 2020). Selain menambah keragaman genetik, metode ini mempercepat seleksi *in vitro*, misalnya dengan menguji ketahanan patogen melalui media selektif atau toleransi garam dengan penambahan NaCl (Singh et al., 2023). Oleh karena itu, induksi keragaman somaklonal menjadi metode strategis, ekonomis, dan adaptif untuk inovasi pertanian dan bioteknologi tanaman (Li et al., 2021).

Selain itu, modifikasi epigenetik seperti perubahan pola metilasi DNA dan modifikasi histon dapat memengaruhi regulasi gen tanpa mengubah urutan DNA, sehingga memunculkan variasi fenotip (Miguel & Marum, 2011). Ketidaktepatan replikasi DNA pada kondisi kultur *in vitro* berpotensi menyebabkan

ketidakstabilan genom, sementara tekanan osmotik dan oksidatif meningkatkan kerusakan DNA (Bairu et al., 2011). Kombinasi faktor-faktor ini menghasilkan beragam variasi genetik dan epigenetik yang dapat menjadi sumber perbaikan varietas tanaman, namun juga dapat menimbulkan hambatan dalam mempertahankan sifat unggul.

10.5.1 Kultur Kalus dan Subkultur Berulang

Kultur kalus menjadi salah satu metode paling umum dalam menginduksi keragaman somaklonal karena kalus terdiri dari sel-sel yang aktif membelah dan memiliki tingkat kerentanan tinggi terhadap mutasi (Mishra et al., 2021). Pada tahap ini, eksplan tanaman diinduksi membentuk kalus menggunakan media yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh seperti 2,4-D (asam 2,4-diklorofenoksiasetat) atau NAA (asam naftalenaasetat) dalam konsentrasi tertentu (Tariq et al., 2022). Proses subkultur berulang, yaitu pemindahan kalus ke media segar secara berkala, meningkatkan jumlah siklus pembelahan sel sehingga peluang terjadinya mutasi titik, delesi, insersi, maupun perubahan kromosom menjadi lebih besar (Wang et al., 2022). Durasi subkultur juga memengaruhi tingkat variasi; periode yang panjang (>12 bulan) umumnya menghasilkan keragaman lebih tinggi dibanding jangka pendek (Ahmed et al., 2020). Selain memicu perubahan genetik, subkultur berulang juga dapat mempengaruhi regulasi gen melalui mekanisme epigenetik seperti metilasi DNA (Chen et al., 2021). Menariknya, banyak variasi yang dihasilkan melalui teknik ini tetap stabil secara fenotipik setelah tanaman diregenerasi, menjadikannya metode andal dalam pemuliaan berbasis kultur jaringan (Li et al., 2022).

10.5.2 Penggunaan Media dengan Regulasi Zat Pengatur Tumbuh

Komposisi media kultur, terutama kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT), merupakan faktor penting dalam memicu keragaman somaklonal (Singh et al., 2021). Auksin seperti IAA (indol-3-asam asetat) dan sitokinin seperti BAP (benzilaminopurin) berperan dalam pengaturan pembelahan dan diferensiasi sel. Ketidakseimbangan rasio

keduanya dapat memunculkan perubahan genetik maupun epigenetik (Rashid et al., 2022). Konsentrasi auksin yang tinggi, misalnya, dilaporkan meningkatkan frekuensi mutasi titik pada kultur kalus padi (Ali et al., 2022), sedangkan dosis sitokinin yang berlebihan dapat mengganggu keteraturan pembelahan sel, menyebabkan ketidakstabilan genom, dan memicu rekombinasi kromosom (Patel et al., 2021). Penambahan senyawa seperti poliamin atau asam jasmonat dalam media juga terbukti memperkuat respons stres yang memicu variasi somaklonal (Tahir et al., 2020). Karena respons terhadap ZPT bersifat genotipe-spesifik, diperlukan pengujian bertahap untuk menentukan komposisi optimal (Kumar et al., 2023). Dengan formulasi media yang tepat, pemulia dapat mengarahkan variasi pada jalur tertentu, seperti peningkatan metabolit sekunder atau percepatan regenerasi tunas (Basu et al., 2021).

10.5.3 Stres Abiotik sebagai Pemicu Variasi

Penerapan stres abiotik pada kultur tanaman telah lama dikenal sebagai strategi efektif untuk menginduksi keragaman somaklonal (Li et al., 2021). Bentuk stres ini meliputi faktor non-biologis seperti salinitas tinggi, suhu ekstrem, kekeringan, dan toksisitas logam berat (Mansoor et al., 2022). Dalam sistem kultur *in vitro*, stres abiotik dapat diatur melalui penambahan agen stres pada media atau pengaturan kondisi lingkungan ruang kultur (Singh et al., 2021). Contohnya, penambahan NaCl dapat mensimulasikan salinitas, memicu tekanan osmotik, dan mengubah gen terkait transport ion atau metabolisme osmoprotektan (Ali et al., 2020), sedangkan PEG (polyethylene glycol) digunakan untuk menurunkan potensi air media guna mensimulasikan kekeringan (Basu et al., 2021). Suhu ekstrem dapat merusak membran, mendenaturasi protein, dan meningkatkan pembentukan ROS yang berpotensi memicu mutasi DNA (Chen et al., 2021). Paparan logam berat seperti kadmium atau aluminium dalam dosis subletal dilaporkan dapat menghasilkan variasi kromosom stabil pasca-regenerasi (Wang et al., 2023). Strategi ini sering dipadukan dengan seleksi *in vitro* untuk mendapatkan individu dengan toleransi tinggi terhadap kondisi ekstrem (Kumar et al., 2023).

10.5.4 Penggunaan Agen Mutagenik Kimia

Pemanfaatan agen mutagenik berbasis kimia telah menjadi salah satu pendekatan umum untuk menginduksi keragaman somaklonal karena kemampuannya memicu perubahan langsung pada DNA. Agen ini bekerja dengan cara mengubah struktur kimia basa nitrogen, menghambat mekanisme perbaikan DNA, atau menimbulkan kesalahan saat proses replikasi (Jain et al., 2021). Dua contoh utama yang sering diaplikasikan dalam kultur jaringan adalah *ethyl methanesulfonate* (EMS) dan *sodium azide* (NaN_3) (Rashid et al., 2020). EMS, yang tergolong alkilating agent, bereaksi dengan basa guanin pada DNA sehingga membentuk O^6 -ethylguanine, yang dapat menyebabkan kesalahan pasangan basa dan memunculkan mutasi titik (Ali et al., 2021). Tingkat efektivitas EMS ditentukan oleh konsentrasi dan lama perlakuan; dosis berlebih dapat membunuh jaringan, sedangkan dosis terlalu rendah tidak memicu variasi yang signifikan (Singh et al., 2022). Di sisi lain, sodium azide bekerja dengan membentuk azidoalanine yang mengganggu sintesis protein serta memicu mutasi melalui perubahan basa transisi (Patel et al., 2020). Karena sifatnya sangat toksik, penggunaannya memerlukan prosedur pengendalian ketat (Li et al., 2021). Bahan lain seperti nitrosomethylurea (NMU) dan diethyl sulfate (DES) juga digunakan meski jarang karena risiko toksisitas dan pengelolaan limbah yang rumit (Ahmed et al., 2019). Dalam praktiknya, agen kimia ini biasanya diaplikasikan pada kalus atau suspensi sel untuk periode tertentu, kemudian dicuci intensif guna menghilangkan residu sebelum proses regenerasi tanaman (Kumar et al., 2023). Kelebihannya adalah mampu menghasilkan mutasi acak di seluruh genom sehingga berpotensi menemukan sifat baru (Wang et al., 2022), namun kekurangannya adalah kemungkinan munculnya mutasi merugikan sehingga diperlukan seleksi ketat.

10.5.5 Radiasi Fisik untuk Induksi Keragaman

Radiasi fisik seperti sinar gamma dan sinar X telah lama digunakan dalam mutagenesis untuk menghasilkan keragaman somaklonal (Mansoor et al., 2021). Mekanisme utamanya adalah pemutusan rantai DNA yang memicu perubahan struktural, termasuk delesi, duplikasi, inversi, maupun translokasi kromosom (Basu et al., 2022). Sinar gamma, biasanya berasal dari sumber

radioaktif seperti Cobalt-60 (^{60}Co), memiliki kemampuan penetrasi tinggi sehingga efektif mencapai jaringan internal kalus atau embrio somatik (Liang et al., 2021). Dosis radiasi menentukan jenis perubahan yang dihasilkan—dosis rendah cenderung memunculkan mutasi titik, sementara dosis tinggi dapat mengakibatkan kerusakan genetik fatal (Tan et al., 2020). Sinar X, meskipun energinya lebih rendah dibanding gamma, efektif untuk kultur jaringan tipis atau suspensi sel (Zhang et al., 2019). Selain itu, radiasi ion berat dengan *Linear Energy Transfer* (LET) tinggi mampu menciptakan kerusakan DNA yang kompleks dan menghasilkan variasi genetik unik (Rahman et al., 2021). Setelah perlakuan radiasi, jaringan biasanya diregenerasi menjadi tanaman utuh. Perubahan yang terjadi umumnya stabil, terutama bila melibatkan modifikasi kromosom permanen (Wen et al., 2023). Keunggulan metode ini adalah tidak meninggalkan residu kimia, namun dibutuhkan fasilitas khusus dan protokol keselamatan radiasi yang ketat (Ali et al., 2022).

10.5.6 Teknik Seleksi In Vitro Berbasis Stres Biotik

Seleksi in vitro berbasis stres biotik merupakan strategi untuk memunculkan keragaman somaklonal dengan memanfaatkan patogen atau senyawa hasil metabolismenya sebagai tekanan seleksi pada kultur jaringan tanaman. Tujuannya adalah menghasilkan tanaman yang lebih tahan terhadap penyakit tertentu, sehingga performanya di lapangan meningkat (Yadav et al., 2021). Dalam penerapannya, jaringan atau kalus dipaparkan pada filtrat kultur patogen, toksin yang dihasilkannya, atau bahkan inokulum langsung (Rai et al., 2020). Sebagai contoh, ketahanan terhadap layu fusarium (*Fusarium oxysporum*) dapat diperoleh dengan menambahkan filtrat patogen ke media kultur sehingga hanya sel resisten yang bertahan (Sharma et al., 2021). Metode ini umum digunakan pada padi, gandum, dan kentang karena penyakit sering menjadi pembatas utama produktivitas (Khan et al., 2022). Keunggulannya adalah efisiensi seleksi sifat tahan penyakit sejak tahap kultur sehingga uji lapangan awal lebih hemat sumber daya (Singh et al., 2021). Namun, metode ini memerlukan keamanan laboratorium yang ketat dan berisiko menghasilkan varian

dengan sifat agronomis yang kurang diinginkan (Zhang et al., 2020; Patel et al., 2021).

10.5.7 Kombinasi Teknik untuk Efektivitas Maksimal

Penggunaan kombinasi teknik induksi keragaman somaklonal semakin populer karena dapat meningkatkan efisiensi pemuliaan (Li et al., 2021). Kombinasi dapat melibatkan agen mutagen kimia, radiasi, dan seleksi stres biotik maupun abiotik secara berurutan atau bersamaan. Misalnya, kalus diberi paparan EMS untuk memicu mutasi, lalu diseleksi pada media mengandung toksin patogen agar hanya varian tahan penyakit yang bertahan (Rahman et al., 2022). Penelitian menunjukkan bahwa kombinasi radiasi gamma dosis rendah dan stres osmotik dapat meningkatkan frekuensi varian tahan kekeringan pada sereal (Wang et al., 2022). Pendekatan ini memperluas variasi genetik sekaligus meminimalkan hilangnya sifat penting akibat mutasi acak (Singh et al., 2021). Kekurangannya adalah pengaturan perlakuan yang kompleks dan biaya tinggi, terutama jika membutuhkan fasilitas radiasi dan penanganan bahan berbahaya (Ali et al., 2022). Meski demikian, metode ini tetap bernilai tinggi untuk pengembangan varietas strategis bernilai ekonomi besar (Sharma et al., 2023).

10.6 Tantangan dan Prospek Masa Depan Metode Induksi Keragaman Somaklonal

Metode induksi keragaman somaklonal merupakan salah satu pendekatan krusial untuk menciptakan variasi genetik baru pada tanaman, khususnya bagi jenis yang sulit diperbanyak melalui metode konvensional atau memiliki keterbatasan dalam ketersediaan plasma nutfah. Meski memiliki potensi besar, penerapannya tidak lepas dari sejumlah hambatan teknis maupun non-teknis. Tantangan yang paling menonjol adalah ketidakpastian hasil, di mana keragaman yang dihasilkan tidak selalu memberikan sifat yang menguntungkan atau stabil pada generasi selanjutnya (Bairu et al., 2011). Tingginya tingkat variabilitas ini sering kali menuntut adanya proses seleksi tambahan yang panjang dan berbiaya tinggi, sehingga menurunkan efisiensi pengembangan varietas baru.

Kendala teknis lain mencakup kebutuhan optimasi media kultur, pencegahan kontaminasi, serta pemeliharaan kestabilan kultur dalam jangka panjang. Temuan penelitian mengindikasikan bahwa perubahan epigenetik yang terjadi selama proses kultur jaringan dapat memengaruhi ekspresi gen tanaman secara berkepanjangan, sehingga menyulitkan pemulia dalam memperoleh sifat yang konsisten (Neelakandan dan Wang, 2012). Selain itu, keterbatasan fasilitas kultur jaringan, terutama di wilayah negara berkembang, serta minimnya tenaga ahli bioteknologi tanaman menjadi hambatan tambahan (Larkin dan Scowcroft, 2022).

Induksi somaklonal masih menghadapi tantangan teknis, terutama sifat variasinya yang acak sehingga sulit memprediksi sifat yang muncul (Patel et al., 2021). Mutasi dapat menghasilkan efek negatif seperti penurunan hasil atau perubahan morfologi yang merugikan (Singh et al., 2021). Implementasinya juga memerlukan laboratorium kultur jaringan yang steril, fasilitas mutasi, dan sistem seleksi stres yang lengkap (Kumar et al., 2023), yang sulit dipenuhi di negara berkembang (Ali et al., 2022). Dari sisi ilmiah, pemahaman mekanisme molekuler keragaman somaklonal masih terbatas meskipun teknologi sekuensing dan transkriptom sudah berkembang (Li et al., 2021), sehingga diperlukan kolaborasi multidisiplin (Rahman et al., 2022).

Meskipun demikian, peluang pengembangan di masa depan cukup besar, terutama dengan penggabungan teknologi molekuler mutakhir seperti penggunaan penanda DNA, analisis genom, dan kajian epigenetik. Penerapan marker-assisted selection (MAS) dan genomics-assisted breeding (GAB) berpotensi mempercepat proses identifikasi serta seleksi varian somaklonal dengan sifat unggul (Gupta dan Varshney, 2020). Integrasi dengan teknologi pengeditan gen seperti CRISPR/Cas9 dapat mengarahkan keragaman genetik secara lebih presisi, sehingga meminimalkan ketidakpastian hasil (Zhang et al., 2021; Sharma et al., 2023).

Seiring kemajuan teknologi dan meningkatnya pemahaman terkait mekanisme genetik maupun epigenetik, metode ini diprediksi akan menjadi salah satu pilar utama dalam

pemuliaan tanaman di masa depan. Penyusunan protokol spesifik per spesies, pengaturan kondisi kultur yang optimal, serta penerapan bioinformatika dalam analisis data genetik diharapkan mampu meningkatkan keberhasilan dan keberlanjutan induksi keragaman somaklonal (Khan et al., 2023). Pemanfaatan big data dan AI untuk menganalisis pola mutasi juga berpotensi mempercepat pemuliaan (Wang et al., 2022). Mengingat tantangan perubahan iklim dan penyakit baru, metode ini tetap relevan dan lebih diterima secara sosial karena tidak melibatkan rekayasa transgenik (Yadav et al., 2021).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S., Khan, M. and Iqbal, M. (2021) 'Activation of transposable elements in plant tissue culture: Implications for somaclonal variation', *Plant Science Today*, 8(1), pp. 45–53.
- Ali, H., Noor, R. and Siddiqui, Z. (2022) 'Cytokinin-induced point mutations and their impact on plant genetic variation', *Journal of Plant Physiology*, 270, p. 153629.
- Ali, M., Hussain, S., Rehman, S., Farooq, M., Ahmad, S. and Ali, A. (2022) 'Somaclonal variation as a source of genetic diversity and crop improvement', *Plant Cell Reports*, 41(3), pp. 503–519.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O. & Van Staden, J. (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147–173.
- Basu, S., Gupta, A. and Choudhury, S. (2021) 'Polyploidy and aneuploidy in tissue culture-derived plants: Mechanisms and implications', *Plant Cell Reports*, 40(2), pp. 215–229.
- Chen, Y., Zhao, L. and Wang, X. (2021) 'Epigenetic mechanisms underlying plant adaptation to in vitro culture stress', *Frontiers in Plant Science*, 12, p. 667665.
- Jain, S.M. (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118, 153–166.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. & Rhee, Y. (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43, 179–188.
- Kumar, R., Singh, A., Verma, P. and Yadav, R. (2023) 'Advances in somaclonal variation for crop improvement: Recent trends and future prospects', *Journal of Plant Biotechnology*, 20(2), pp. 85–102.
- Kumar, R., Verma, P. and Singh, A. (2020) 'Induced mutations in plant tissue culture: Mechanisms and breeding applications', *Plant Biotechnology Journal*, 18(9), pp. 1776–1791.

- Li, H., Sun, Y. and Zhang, W. (2020) 'Stable inheritance of epigenetic modifications in tissue culture-derived plants', *BMC Plant Biology*, 20, p. 345.
- Li, X., Zhang, Y., Chen, L., Liu, J. and Wang, P. (2021) 'Molecular mechanisms underlying somaclonal variation: Genomic and epigenomic insights', *Frontiers in Plant Science*, 12, p. 643922.
- Liang, Y., Zhou, J. and Wang, F. (2022) 'mPing transposon activation enhances stress tolerance in rice', *Theoretical and Applied Genetics*, 135(1), pp. 101–112.
- Liu, Q., Zhang, Z. and Xu, C. (2022) 'Oxidative stress-induced DNA damage and mutagenesis in plant tissue cultures', *Environmental and Experimental Botany*, 193, p. 104650.
- Patel, D., Sharma, N., Gupta, V. and Singh, R. (2021) 'Somaclonal variation: Applications and limitations for crop improvement', *Biotechnology Advances*, 49, p. 107762.
- Patel, R., Kumar, S. and Mehta, D. (2020) 'Transposable elements as a source of genetic diversity in plants', *Plant Molecular Biology Reporter*, 38, pp. 25–37.
- Miguel, C. & Marum, L. (2011) An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3713–3725.
- Rahman, M., Alam, M., Jahan, S., Karim, M. and Hossain, M. (2022) 'Somaclonal variation: An important source of genetic diversity for crop improvement', *Plant Biotechnology Reports*, 16(4), pp. 479–493.
- Rahman, M., Hossain, M. and Alam, M. (2021) 'DNA methylation changes in medicinal plants: Effects on secondary metabolite biosynthesis', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147, pp. 573–585.
- Rashid, M., Ahmad, M. and Khan, M. (2021) 'Environmental factors influencing somaclonal variation in plant tissue culture', *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(8), pp. 1729–1742.
- Sharma, P., Kaur, G., Kumar, N. and Singh, J. (2023) 'CRISPR/Cas genome editing combined with somaclonal variation for crop improvement', *GM Crops & Food*, 14(1), p. 2152946.

- Singh, P., Sharma, R., Kumar, V. and Yadav, S. (2021) 'Exploring somaclonal variation for enhanced stress tolerance in crops', *Plant Physiology Reports*, 26(4), pp. 758–771.
- Singh, R., Kumar, A. and Sharma, P. (2022) 'DNA methylation reprogramming under in vitro culture conditions in plants', *Plant Epigenetics*, 2(1), pp. 55–64.
- Tahir, M., Saleem, S. and Iqbal, Z. (2020) 'Synergistic effects of in vitro environmental stresses on somaclonal variation', *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(1–2), pp. 35–47.
- Tan, Y., Huang, J. and Chen, Q. (2020) 'Chromosomal instability in plant tissue culture: Causes and consequences', *Plant Cytogenetics*, 1(2), pp. 75–85.
- Wang, H., Zhao, Y., Li, X., Zhou, J. and Liu, Z. (2022) 'Artificial intelligence in plant breeding: Applications in somaclonal variation analysis', *Computers and Electronics in Agriculture*, 199, p. 107207.
- Wang, Y., Li, Z. and Yang, X. (2021) 'DNA replication errors and mutation induction in plant tissue culture', *Plant Science*, 304, p. 110806.
- Wen, X., Gao, Y. and Li, F. (2023) 'Chromosomal rearrangements and gene copy number variations in tissue culture-derived plants', *Frontiers in Genetics*, 14, p. 1123456.
- Yadav, R., Meena, R., Singh, P. and Sharma, S. (2021) 'Somaclonal variation: A non-transgenic approach for crop improvement', *Agricultural Reviews*, 42(3), pp. 239–248.
- Yin, X., Zhao, S. and Liu, H. (2023) 'Functional impact of somaclonal mutations on plant stress tolerance', *Plant Physiology and Biochemistry*, 197, p. 107592.
- Zhang, L., Xu, H. and Chen, D. (2019) 'Stress-induced activation of transposable elements in plants', *BMC Genomics*, 20, p. 759.

BAB 11

INDUKSI TANAMAN TAHAN CEKAMAN LINGKUNGAN DAN PENYAKIT

Oleh Aloysia Sri Pujiyanti

11.1 Pendahuluan

Cekaman lingkungan dan serangan patogen merupakan faktor pembatas utama dalam produksi tanaman di seluruh dunia. Kondisi lingkungan yang tidak optimal seperti kekeringan, salinitas, suhu ekstrem, dan kontaminasi logam berat dapat mengganggu proses fisiologis normal tanaman dan mengurangi produktivitas secara signifikan. Selain itu, serangan patogen baik yang bersifat biotik maupun abiotik juga memberikan dampak merugikan terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Dalam konteks perubahan iklim global yang semakin tidak menentu, pengembangan varietas tanaman yang toleran terhadap berbagai jenis cekaman menjadi sangat penting untuk menjamin keberlanjutan produksi pangan.

Kultur jaringan tanaman telah terbukti sebagai platform yang efektif untuk menginduksi dan mengembangkan tanaman yang toleran terhadap cekaman. Teknik kultur jaringan memungkinkan seleksi varian somaklonal yang memiliki karakteristik toleransi terhadap cekaman dalam lingkungan terkontrol dengan biaya yang relatif rendah. Pendekatan induksi ketahanan tanaman melalui kultur jaringan dapat dilakukan melalui berbagai strategi, termasuk seleksi *in vitro*, modifikasi komposisi medium, aplikasi agens biologis, dan manipulasi genetik. Oleh karena itu, upaya untuk mengembangkan tanaman yang tahan stres memiliki arti yang sangat penting dalam meningkatkan produktivitas tanaman. Dalam beberapa tahun terakhir, seleksi *in vitro* berbasis kultur jaringan telah muncul sebagai alat yang layak dan efisien secara biaya untuk mengembangkan tanaman yang tahan stres. Keunggulan teknik ini

terletak pada kemampuannya untuk mengkondisikan lingkungan yang tepat bagi induksi respons adaptif tanaman terhadap berbagai jenis cekaman secara terkontrol dan terukur.

11.2 Mekanisme Fisiologis dan Biokimia Toleransi Cekaman pada Kultur In Vitro

Tanaman yang dikultur in vitro mengembangkan berbagai mekanisme adaptasi untuk menghadapi cekaman lingkungan melalui modifikasi jalur metabolisme dan ekspresi gen yang kompleks. Pada tingkat seluler, respons terhadap cekaman melibatkan aktivasi jalur transduksi sinyal yang dimulai dari persepsi sinyal cekaman oleh reseptor spesifik, dilanjutkan dengan transduksi sinyal intraseluler, dan berakhir pada respons fisiologis dan biokimia yang terkoordinasi. Mekanisme utama yang terlibat dalam toleransi cekaman mencakup aktivasi sistem antioksidan, akumulasi senyawa osmoprotektan, modifikasi struktur membran sel, dan regulasi ekspresi gen yang terkait dengan respons cekaman (Hussain et al., 2019).

Secara biokimia, salah satu ciri khas toleransi cekaman adalah penguatan sistem pertahanan terhadap stres oksidatif. Eksposur pada NaCl atau PEG di medium kultur meningkatkan pembentukan spesies oksigen reaktif ROS yang jika tidak dikendalikan akan merusak lipid membran, protein, dan DNA. Sistem antioksidan merupakan pertahanan utama sel tanaman terhadap stres oksidatif yang ditimbulkan oleh berbagai jenis cekaman abiotik dan biotik. Enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan peroksidase (POX) bekerja secara sinergis untuk mendetoksifikasi spesies oksigen reaktif (ROS) yang dapat merusak komponen seluler penting seperti DNA, protein, dan lipid membran (Noctor et al., 2018). Selain enzim, senyawa antioksidan non-enzimatis seperti askorbat, glutathione, tokoferol, flavonoid, alkaloid dan fenolik, termasuk siklus AsA–GSH yang berperan penting dalam regulasi H₂O₂ juga berperan penting dalam mempertahankan keseimbangan redoks sel dan melindungi struktur seluler dari kerusakan oksidatif (Fatma et al., 2021; Hasanuzzaman et al., 2020). Berbagai laporan menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas antioksidan, baik secara endogen maupun melalui aplikasi eksogen

seperti melatonin (MEL), nitric oxide (NO), phytohormone, dan probiotik bakteri, mampu memperkuat sistem pertahanan antioksidan dan meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman lingkungan (Qadir et al., 2021; Żur et al., 2021).

Akumulasi senyawa osmoprotektan seperti prolin, glisin betain, dan trehalosa merupakan strategi adaptasi yang umum dijumpai pada tanaman yang mengalami cekaman osmotik. Senyawa-senyawa ini tidak hanya berfungsi dalam penyesuaian osmotik untuk mempertahankan turgor sel, tetapi juga berperan sebagai stabilizer protein dan membran, serta sebagai scavenger radikal bebas yang melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Modifikasi komposisi dan fluiditas membran sel juga merupakan aspek penting dalam adaptasi terhadap cekaman, dimana perubahan rasio asam lemak jenuh dan tidak jenuh serta kandungan sterol dalam membran memungkinkan sel mempertahankan integritas dan fungsi membran dalam kondisi cekaman yang ekstrem (Hayat et al., 2012).

Namun, respon fisiologis dan biokimia ini bersifat spesifik tergantung genotipe dan kondisi kultur. Studi pada gandum menunjukkan bahwa hanya beberapa genotipe yang mempertahankan peningkatan aktivitas enzim antioksidan setelah aklimatisasi meski semuanya menunjukkan respon *in vitro*. Hal ini menekankan pentingnya validasi lintas tahap dari kultur hingga uji greenhouse. Oleh karena itu penelitian modern menyarankan kombinasi analisis osmolit, aktivitas antioksidan, dan ekspresi gen sebagai indikator komprehensif dalam menilai ketahanan yang muncul dari kultur *in vitro* sebelum digunakan untuk pemuliaan atau pelepasan varietas.

11.3 Seleksi In Vitro untuk Toleransi Cekaman Abiotik

Seleksi *in vitro* merupakan metode yang efisien untuk mengidentifikasi dan mengembangkan varian sel atau kalus yang toleran terhadap cekaman abiotik melalui aplikasi tekanan selektif yang terkontrol (Sahu et al., 2023). Proses seleksi ini umumnya dilakukan dengan menambahkan agen selektif ke dalam medium kultur yang mensimulasikan kondisi cekaman tertentu secara

spesifik. Agen selektif yang umum digunakan meliputi NaCl untuk cekaman salinitas dengan konsentrasi berkisar 50-200 mM, mannitol atau polietilen glikol (PEG) untuk simulasi cekaman kekeringan dengan potensial osmotik -0.5 hingga -2.0 MPa, dan logam berat seperti Cd, Pb, atau Al untuk cekaman toksisitas dengan konsentrasi sub-lethal yang disesuaikan dengan spesies tanaman (Wijerathna-Yapa & Hiti-Bandaralage, 2023). Pada prinsipnya seleksi in vitro adalah pendekatan yang mengekspos sel, kalus, atau eksplan yang tumbuh di medium kultur terhadap agen selektif yang meniru cekaman abiotik, misalnya NaCl untuk salinitas atau polietilen glikol (PEG) untuk mensimulasikan kekeringan. Tujuan utamanya adalah menyeleksi sel atau lini yang mampu bertahan dan tumbuh di bawah kondisi stres sehingga regenerasi yang dihasilkan berpotensi menunjukkan toleransi yang lebih tinggi. Keuntungan utama metode ini adalah kontrol kondisi yang tinggi, kemampuan melakukan skrining pada populasi besar dalam waktu relatif singkat, dan lingkungan aseptik yang mengurangi variabilitas eksternal (Al-Khateeb et al., 2020). Pendekatan ini didukung oleh tinjauan literatur modern yang menegaskan kegunaan kultur jaringan sebagai platform efisien untuk screening stres abiotik.

Secara praktis terdapat beberapa strategi seleksi in vitro yang umum digunakan. Metode *step-up* (peningkatan bertahap) NaCl atau pemberian konsentrasi tetap pada medium dipakai untuk seleksi salinitas; penggunaan PEG berukuran molekul tinggi dipilih untuk meniru defisit air tanpa menambahkan toksisitas ionik nyata; sementara perlakuan dengan sorbitol atau manitol juga sering dipakai sebagai agen osmotik. Selain itu beberapa studi menerapkan elicitor kimia atau pre-aklimatisasi (*preconditioning*) untuk memicu mekanisme toleransi sebelum regenerasi. Setiap protokol perlu menyesuaikan durasi paparan, konsentrasi selektif, dan tahap perkembangan eksplan sehingga seleksi tidak sekadar memilih sel yang “tahan” tetapi juga mempertahankan kemampuan regeneratif (Al-Khateeb et al., 2020). Contoh aplikasi telah dilaporkan pada berbagai spesies termasuk palma kurma, hawar, dan padi.

Keunggulan seleksi in vitro mencakup kecepatan dan kemampuan menemukan varian langka, tetapi pendekatan ini juga memiliki keterbatasan yang penting. Pertama, tekanan selektif yang digunakan in vitro kadang memicu *somaclonal variation* atau

perubahan epigenetik sehingga perlu verifikasi genetik dan fenotipik. Kedua, respons yang dideteksi dalam kondisi aseptik tidak selalu diterjemahkan menjadi toleransi di greenhouse atau lapang karena perbedaan lingkungan dan interaksi organisme lain. Ketiga, agen selektif seperti PEG meniru komponen osmotik tetapi tidak semua aspek kekeringan alami sehingga hasilnya harus ditafsirkan hati-hati. Oleh karena itu protokol seleksi yang baik selalu mencakup tahapan validasi berlapis termasuk pengukuran fisiologis, parameter biokimia, analisis molekuler, aklimatisasi, dan uji lapang (Ilhan et al., 2024).

11.3.1 Seleksi In Vitro untuk Toleransi Cekaman Kekeringan

Seleksi in vitro untuk toleransi kekeringan umumnya menggunakan agen osmotik berukuran molekul besar seperti polyethylene glycol (PEG) atau osmotik seperti sorbitol dan mannitol untuk menurunkan potensial air medium sehingga meniru kondisi dehidrasi; protokol dapat berbentuk pemberian konsentrasi tetap atau strategi step-up dengan peningkatan bertahap sehingga hanya sel atau kalus yang mampu menjaga homeostasis yang bertahan dan diregenerasi. Parameter penilaian yang sering dipakai meliputi viabilitas kalus, efisiensi regenerasi, akumulasi osmolit (mis. prolin), aktivitas enzim antioksidan (SOD, CAT, APX), kadar peroksidasi lipid (TBARS), serta pengukuran ion dan ekspresi gen terkait stres; kombinasi pengukuran fisiologis-biokimia dan uji aklimatisasi meningkatkan keandalan seleksi (Hernández-Pérez et al., 2021). Keunggulan metode ini adalah kapasitas skrining cepat pada populasi besar dan kontrol lingkungan yang tinggi namun keterbatasannya penting: PEG mensimulasikan komponen osmotik kekeringan tetapi tidak mereplikasi semua aspek kekeringan lapang sehingga hasil in vitro harus divalidasi di greenhouse atau lapang dan diuji lintas genotipe karena respons sangat genotipe-spesifik (Vuksanović et al., 2023).

Tabel 11.1. Aplikasi beberapa jenis agen selektif kimia pada seleksi in vitro untuk toleransi kekeringan

Tanaman	Agen Selektif	Metode Seleksi In Vitro	Referensi
Tebu	PEG-6000	Step-up: Kalus embriogenik dan regenerasi diberi perlakuan PEG-6000 (0,3,6,9% w/v) pada MS semi-padat; screening kalus dan regenerasi	Hernández-Pérez et al., 2021.
Pohon Hawar	PEG-6000	Konstan: Eksplan pucuk dan klon microshoot diberi perlakuan PEG-6000 (0-50 g/L)	Vuksanović et al., 2023
Melon	PEG dan Sorbitol	Konstan: Pemberian konsentrasi berbeda pada medium MS, eksplan hipokotil dan kalus	Mehmandar et al., 2023
Gandum (<i>winter wheat</i>)	PEG (variasi konsentrasi)	Konstan: uji PEG pada kultur bibit (seedlings) hasil kultur in vitro	Peršić et al., 2022

11.3.2 Seleksi In Vitro untuk Toleransi Salinitas

Seleksi in vitro untuk toleransi salinitas biasanya dilakukan dengan menambahkan garam natrium klorida (NaCl) ke medium kultur sehingga eksplan atau kalus dipaksa beradaptasi pada kondisi ionik tinggi. Pendekatan ini banyak digunakan karena dapat mengidentifikasi genotipe atau kalus yang lebih tahan terhadap salinitas dalam waktu singkat, sekaligus memfasilitasi studi mekanisme fisiologis dan molekuler. Sebagai contoh, penelitian pada kurma (*Phoenix dactylifera*) menunjukkan bahwa kalus embriogenik yang diseleksi pada medium dengan NaCl bertahap mampu menghasilkan regenerasi yang lebih adaptif terhadap salinitas dibanding kontrol (Al-Khateeb et al., 2020). Studi pada gandum emmer (*Triticum dicoccum*) juga memperlihatkan bahwa perlakuan NaCl konstan dapat menstimulasi ekspresi gen *SOS1* dan *SERK1*, yang berperan penting dalam mekanisme toleransi garam (Ilhan et al., 2024)

Selain itu, pada padi (*Oryza sativa*), seleksi step-up dengan konsentrasi NaCl bertahap mampu menghasilkan kalus toleran dengan aktivitas enzim antioksidan yang lebih tinggi, terutama katalase (CAT), serta akumulasi prolin sebagai osmolit pelindung (Jehan et al., 2024). Penelitian terbaru pada tebu (*Saccharum officinarum* L.), di mana kalus yang dipaparkan pada NaCl bertahap mempertahankan rasio ion Na^+/K^+ lebih seimbang, yang menjadi indikator penting dalam homeostasis ionik (Laksana et al., 2023).

Secara keseluruhan, hasil-hasil tersebut menunjukkan bahwa seleksi in vitro dengan NaCl efektif untuk mengidentifikasi eksplan toleran, mempelajari mekanisme biokimia, serta mendukung pemuliaan tanaman tahan salinitas. Namun demikian, hasil seleksi in vitro perlu divalidasi pada tahap aklimatisasi dan uji lapang untuk memastikan ketahanan tersebut konsisten di lingkungan nyata.

11.3.3 Seleksi In Vitro untuk Toleransi Logam Berat

Seleksi in vitro untuk toleransi logam berat merupakan pendekatan penting dalam kultur jaringan tanaman untuk menilai dan mengembangkan genotipe yang mampu bertahan pada kondisi toksik akibat akumulasi logam di lingkungan. Media kultur biasanya ditambahkan dengan ion logam tertentu seperti kadmium (Cd), timbal (Pb), atau arsenik (As) untuk mengevaluasi respon kalus, tunas, maupun embrio somatik. Respon tersebut dapat berupa viabilitas kalus, regenerasi tunas, aktivitas enzim antioksidan, hingga akumulasi senyawa pelindung seperti prolin. Misalnya, penelitian pada gandum (*Triticum aestivum*) menunjukkan bahwa kalus yang dipapar Cd memiliki peningkatan aktivitas superoksida dismutase sebagai mekanisme pertahanan (Rai et al., 2019). Studi pada tomat (*Solanum lycopersicum*) memperlihatkan bahwa kultur kalus yang ditumbuhkan dalam media dengan Pb memperlihatkan kemampuan mempertahankan viabilitas lebih tinggi dibanding kontrol, menandakan adanya seleksi genotipe toleran (Elazab et al., 2023). Hal ini menegaskan bahwa seleksi berbasis kultur jaringan tidak hanya penting untuk ketahanan tanaman, tetapi juga berkontribusi pada upaya bioremediasi lingkungan yang tercemar logam berat.

11.3.4 Toleransi Stres Melalui Teknologi Transgenik

Teknologi transgenik telah menjadi salah satu strategi utama untuk meningkatkan toleransi tanaman terhadap berbagai jenis cekaman abiotik, termasuk kekeringan, salinitas, suhu ekstrem, dan logam berat. Teknik transformasi genetik tanaman dapat diklasifikasikan menjadi 2 yaitu secara langsung dan *vector-based*, dengan mengintroduksi DNA transgenik ke dalam organisme inang. Transformasi genetik secara langsung merujuk pada introduksi DNA transgenik ke dalam sel tanaman. Teknik yang paling umum digunakan yaitu biolistik dan *vector* biologi yang menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* (Wijerathna-Yapa & Hiti-Bandaralage, 2023).

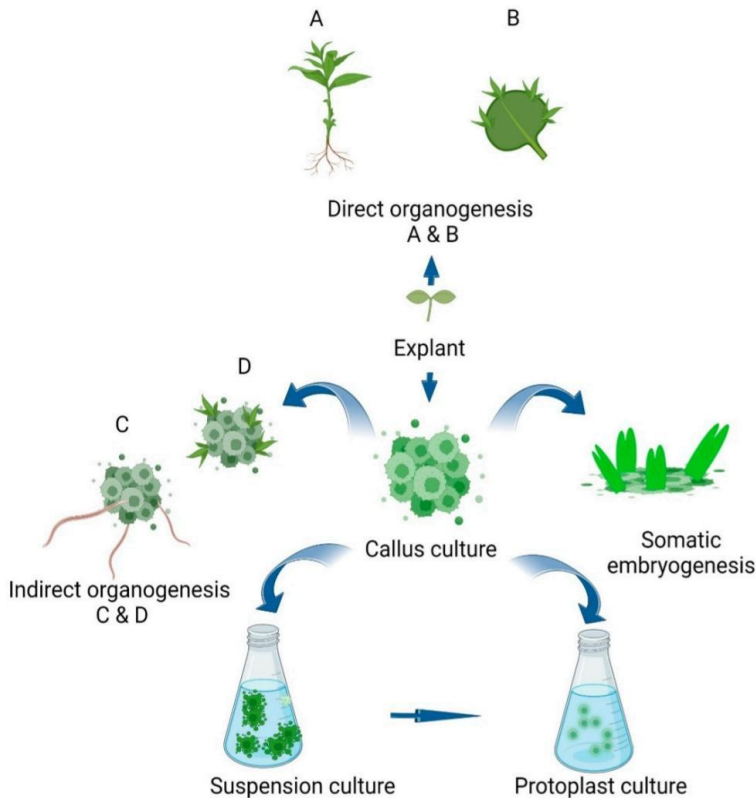
Perkembangan teknologi terbaru telah menghadirkan sistem CRISPR/Cas9, yaitu teknologi penyuntingan genom yang sangat presisi. Teknologi ini diadaptasi dari mekanisme pertahanan alami bakteri terhadap virus, kemudian diterapkan pada organisme eukariot termasuk tanaman. Prinsip kerjanya didasarkan pada interaksi RNA-DNA untuk mengenali urutan tertentu dalam genom, kemudian memotong atau mengubahnya sesuai kebutuhan. Dengan demikian, CRISPR/Cas9 memungkinkan para peneliti melakukan modifikasi genetik yang lebih spesifik, efisien, dan sesuai dengan tujuan pemuliaan tanaman (Wijerathna-Yapa & Hiti-Bandaralage, 2023).

Melalui teknik transformasi genetik, gen yang berperan dalam mekanisme adaptasi dapat diintroduksi ke dalam genom tanaman untuk menghasilkan sifat toleran yang stabil. Misalnya, gen yang mengatur akumulasi osmolit (seperti *P5CS* untuk prolin), antioksidan (seperti *SOD* atau *CAT*), serta regulator transkripsi (seperti *DREB* dan *WRKY*) terbukti meningkatkan kapasitas adaptasi tanaman. Sebagai contoh, padi transgenik yang mengekspresikan gen *OsDREB1F* menunjukkan peningkatan toleransi kekeringan dan salinitas melalui peningkatan ekspresi gen downstream terkait stres (Wang et al., 2008). Demikian pula, tanaman kacang tanah transgenik yang mengekspresikan gen *AtNHX1* memperlihatkan akumulasi ion Na^+ di vakuola, sehingga lebih toleran terhadap cekaman salinitas (Asif et al., 2011). Selain itu, pengenalan *transcription factor (TF)* *GmbZIP60* overekspresi meningkatkan toleransi terhadap salinitas dan kekeringan pada tanaman kedelai (Chai et al., 2025).

Tabel 11.2. Aplikasi beberapa jenis agen selektif kimia pada seleksi in vitro untuk toleransi kekeringan

Tanaman	Fokus / Gen Terlibat	Referensi
Kentang	Gen <i>StnsLTP1</i> diperoleh dari kentang; ekspresi berlebih di tanaman transgenik menunjukkan toleransi terhadap beberapa stres abiotik (panas, kekeringan, salinitas).	Gangadhar et al., 2016
Kedelai	Gen <i>GmNFYA5</i> , anggota <i>nuclear factor YA</i> family; induksi terhadap kondisi kekeringan menunjukkan toleransi yang lebih baik, aktivitas antioksidan meningkat, respons gen stres lebih tinggi dibanding kontrol	Ma et al., 2020
Padi	Gen <i>JcHDZ25</i> dari physic nut, ditransgen ke padi menunjukkan toleransi kekeringan	Tang et al., 2025)
Padi	Gen <i>galactinol synthase</i> dari gandum, toleransi terhadap dingin (chilling) di padi	Shimosaka & Ozawa, 2015

Tidak semua jenis jaringan maupun spesies tanaman dapat dengan mudah ditransformasi menggunakan metode yang telah dikembangkan. Pemilihan eksplan menjadi faktor penting, sebab jaringan yang digunakan sangat bergantung pada jenis tanaman serta kemampuan regenerasinya. Untuk itu, diperlukan pemilihan teknik kultur jaringan yang paling sesuai agar efisiensi transformasi dapat dicapai secara maksimal, sekaligus meningkatkan keberhasilan regenerasi sel-sel yang telah mengalami transformasi. Beberapa pendekatan yang umum digunakan dalam proses ini dapat dilihat pada Gambar 11.1, yang memberikan gambaran tentang variasi metode yang dapat diterapkan sesuai dengan kebutuhan spesifik tanaman yang diteliti.



Gambar 11.1. Berbagai teknik dalam kultur jaringan untuk regenerasi tanaman dapat dimanfaatkan dalam proses seleksi dan transformasi genetik tanaman. Keterangan: Dimulai dari eksplan pada medium seleksi, organogenesis langsung (A dan B) atau organogenesis tidak langsung (C dan D) melalui fase kalus sebagai perantara. Selanjutnya, kalus dapat digunakan untuk membentuk plantlet utuh melalui jalur embrionik atau dalam kultur suspensi secara langsung maupun melalui teknik kultur protoplas pada transformasi genetik.

(Sumber : Wijerathna-Yapa & Hiti-Bandaralage, 2023))

11.4 Induksi Ketahanan Penyakit Melalui Kultur Jaringan

Induksi ketahanan penyakit melalui kultur jaringan merupakan salah satu pendekatan bioteknologi modern yang memanfaatkan kondisi *in vitro* untuk memperoleh, memilih, maupun

memodifikasi respons pertahanan tanaman terhadap serangan patogen. Dalam kerangka konseptual, strategi ini dapat dilakukan melalui beberapa jalur utama. Pertama, pemanfaatan variasi somaklonal yang muncul selama proses regenerasi jaringan, yang berpotensi menghasilkan genotipe baru dengan sifat ketahanan spesifik. Kedua, penerapan seleksi *in vitro* langsung melalui perlakuan jaringan dengan toksin patogen atau kondisi biotik terkontrol, sehingga hanya sel atau jaringan dengan kemampuan adaptif yang mampu bertahan. Ketiga, penggunaan senyawa penginduksi (elicitor), baik yang berasal dari kitin, oligogalaktan, maupun metabolit mikroba, untuk mengaktifkan mekanisme pertahanan endogen pada kultur sel atau akar. Keempat, transformasi genetik yang diarahkan untuk mengekspresikan protein pertahanan (PR proteins) atau faktor regulator sistem imun tanaman. Berbagai strategi tersebut menempatkan kultur jaringan sebagai metode komplementer yang dapat mendukung pemuliaan konvensional, sekaligus menyediakan sistem seleksi yang cepat dan terukur (Orłowska et al., 2024; Wijerathna-Yapa & Hiti-Bandaralage, 2023).

Aplikasi elicitor merupakan strategi lain yang sangat menjanjikan dalam induksi ketahanan penyakit. Elicitor adalah senyawa yang dapat menginduksi respons pertahanan tanaman tanpa menyebabkan penyakit, dan dapat berupa senyawa biotik seperti oligosakarida dari dinding sel fungi, protein dan peptida dari patogen, atau senyawa abiotik seperti asam salisilat dan asam jasmonat. Aplikasi elicitor pada kultur *in vitro* dapat mengaktivasi jalur pertahanan tanaman dan meningkatkan ekspresi gen-gen yang terkait dengan ketahanan penyakit, termasuk gen yang mengkode *pathogenesis-related* (PR) proteins, enzim detoksifikasi, dan senyawa antimikroba (Baenas et al., 2014). Keuntungan dari aplikasi elicitor adalah dapat mengaktifkan mekanisme pertahanan tanpa menimbulkan mutasi, sehingga relatif lebih mudah diuji ulang dan dimanfaatkan dalam program penguatan ketahanan.

Sistem acquired resistance (SAR) dan induced systemic resistance (ISR) merupakan mekanisme pertahanan sistemik yang dapat diinduksi melalui kultur jaringan untuk meningkatkan ketahanan terhadap spektrum patogen yang luas. SAR umumnya diperantarai oleh asam salisilat dan mengaktivasi ekspresi

pathogenesis-related (PR) proteins yang memiliki aktivitas antimikroba, sementara ISR dimediasi oleh asam jasmonat dan etilen yang mengaktifasi mekanisme pertahanan yang berbeda. Mikroorganisme bermanfaat seperti bakteri *Bacillus* dan *Pseudomonas*, serta fungi *Trichoderma* dapat diaplikasikan pada kultur jaringan untuk menginduksi respons pertahanan dan meningkatkan ketahanan terhadap patogen melalui produksi metabolit bioaktif dan kompetisi nutrisi (Rahman et al., 2019). Integrasi berbagai pendekatan ini memungkinkan pengembangan tanaman dengan ketahanan penyakit yang komprehensif dan berkelanjutan.

11.5 Aplikasi Plant Growth Promoting Microbes (PGPM) dalam Kultur Jaringan

Plant Growth Promoting Microbes (PGPM) telah mendapat perhatian yang semakin besar sebagai agen biologis untuk meningkatkan toleransi cekaman pada kultur jaringan melalui berbagai mekanisme yang kompleks dan saling berinteraksi (Soumare et al., 2021). Mikroorganisme ini dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap berbagai jenis cekaman melalui produksi enzim ACC deaminase yang mengurangi tingkat etilen endogen, produksi fitohormon seperti auksin dan sitokinin yang memodulasi pertumbuhan, serta sintesis osmoprotektan dan antioksidan yang membantu tanaman beradaptasi terhadap kondisi cekaman (Shahid et al., 2023).

Mekanisme kerja PGPM dalam meningkatkan toleransi cekaman sangat beragam dan melibatkan interaksi molekuler yang kompleks antara mikroorganisme dan tanaman inang (Lopes et al., 2021). Produksi ACC deaminase oleh bakteri dapat mengurangi tingkat etilen endogen yang umumnya meningkat dalam kondisi cekaman, sehingga mengurangi dampak negatif cekaman terhadap pertumbuhan tanaman dan mempertahankan fungsi fisiologis normal. Selain itu, PGPM juga dapat memproduksi senyawa *volatile organic compounds* (VOC) yang mampu menginduksi ketahanan penyakit dan toleransi cekaman abiotik melalui aktivasi jalur pertahanan sistemik (El-Saadony et al., 2022).

Endofit sebagai kelompok khusus PGPM memiliki kemampuan unik untuk berinteraksi dengan tanaman inang dari dalam jaringan tanpa menyebabkan gejala penyakit (Hardoim et al., 2015). Mekanisme molekuler peningkatan toleransi cekaman oleh endofit mencakup induksi ekspresi gen-gen yang terkait dengan respons cekaman serta peningkatan produksi scavenger ROS yang penting untuk mempertahankan keseimbangan redoks sel. Interaksi antara endofit dan tanaman inang melibatkan komunikasi molekuler yang kompleks, termasuk pertukaran metabolit dan sinyal regulatoris yang memungkinkan terjadinya sinergi dalam menghadapi cekaman lingkungan. Aplikasi PGPM dalam kultur jaringan dapat dilakukan melalui berbagai metode mulai dari inokulasi langsung pada medium kultur hingga perlakuan eksplan sebelum kultur, dengan pemilihan isolat yang tepat, konsentrasi inokulasi optimal, dan waktu aplikasi yang tepat sebagai faktor kritis yang menentukan keberhasilan aplikasi dalam jangka panjang (Soumare et al., 2021).

11.5 Prospek Pengembangan

Pengembangan tanaman toleran cekaman melalui kultur jaringan memerlukan pendekatan terintegrasi yang menggabungkan berbagai teknik dan strategi untuk mencapai efektivitas maksimal (Bhatnagar-Mathur et al., 2008). Penelitian yang dilakukan selama beberapa dekade terakhir telah menunjukkan dengan jelas bahwa teknologi kultur jaringan dapat digunakan sebagai solusi praktis untuk mengatasi efek merugikan dari cekaman abiotik dan mempertahankan produktivitas tanaman (Villalobos-López et al., 2022). Integrasi mekanisme toleransi yang berbeda sangat penting untuk mengembangkan tanaman yang mampu bertahan dalam kondisi cekaman yang kompleks dan bervariasi, seperti yang sering terjadi dalam kondisi lapangan yang sesungguhnya.

Kombinasi seleksi *in vitro* dengan aplikasi PGPM dan elicitor telah menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam meningkatkan efektivitas induksi toleransi melalui aktivasi berbagai jalur pertahanan secara bersamaan (Singh et al., 2015). Pendekatan ini memungkinkan aktivasi multiple defense pathways sekaligus, sehingga meningkatkan kemampuan adaptasi tanaman terhadap multiple stresses yang sering terjadi secara bersamaan di lapangan.

Penggunaan teknologi omics seperti genomik, transkriptomik, proteomik, dan metabolomik dapat memberikan pemahaman yang lebih mendalam tentang mekanisme molekuler yang terlibat dalam toleransi cekaman dan membantu dalam identifikasi gen-gen target untuk program pemuliaan yang lebih terarah.

Prospek pengembangan teknologi sangat menjanjikan dengan adanya kemajuan pesat dalam bidang bioteknologi dan biologi molekuler modern. Teknik gene editing seperti *CRISPR-Cas* dapat diintegrasikan dengan kultur jaringan untuk mengembangkan tanaman dengan karakteristik toleransi yang lebih spesifik dan terarah tanpa melibatkan gen asing. Pengembangan sistem kultur yang lebih efisien, otomatis, dan berbasis digital akan meningkatkan *throughput screening* dan mengurangi biaya produksi secara signifikan. Tantangan utama yang masih perlu diatasi meliputi stabilitas karakter toleransi pada generasi lanjut, validasi efektivitas dalam kondisi lapangan yang beragam, dan aspek regulasi untuk pelepasan varietas hasil kultur jaringan. Dengan meningkatnya tantangan ketahanan pangan global akibat perubahan iklim dan pertumbuhan populasi, pengembangan teknologi kultur jaringan untuk induksi toleransi cekaman menjadi semakin penting dan strategis untuk mewujudkan pertanian berkelanjutan di masa depan.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Khateeb, S. A., Al-Khateeb, A. A., Sattar, M. N., & Mohmand, A. S. (2020). Induced in vitro adaptation for salt tolerance in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar Khalas. *Biological Research*, 53(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00305-3>
- Asif, M. A., Zafar, Y., Iqbal, J., Iqbal, M. M., Rashid, U., Ali, G. M., Arif, A., & Nazir, F. (2011). Enhanced Expression of AtNHX1, in Transgenic Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Improves Salt and Drought Tolerance. *Molecular Biotechnology*, 49(3), 250–256. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9399-1>
- Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. (2014). Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules*, 19(9), 13541–13563. <https://doi.org/10.3390/molecules190913541>
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. K. (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27(3), 411–424. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0474-9>
- Chai, M., Yang, F., Cai, S., Liu, T., Xu, X., Huang, Y., Xi, X., Yang, J., Cao, Z., Sun, L., Dou, D., Fang, X., Yan, M., & Cai, H. (2025). Overexpression of the Transcription Factor GmbZIP60 Increases Salt and Drought Tolerance in Soybean (*Glycine max*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26(7), 3455. <https://doi.org/10.3390/ijms26073455>
- Elazab, D., Lambardi, M., & Capuana, M. (2023). In Vitro Culture Studies for the Mitigation of Heavy Metal Stress in Plants. *Plants*, 12(19), 3387. <https://doi.org/10.3390/plants12193387>
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Ahmed, A. I., Mahmood, M., El-Tahan, A. M., Ebrahim, A. A. M., Abd El-Mageed, T. A., Negm, S. H., Selim, S., Babalghith, A. O., Elrys, A. S., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives.

- Fatma, M., Iqbal, N., Sehar, Z., Alyemeni, M. N., Kaushik, P., Khan, N. A., & Ahmad, P. (2021). Methyl Jasmonate Protects the PS II System by Maintaining the Stability of Chloroplast D1 Protein and Accelerating Enzymatic Antioxidants in Heat-Stressed Wheat Plants. *Antioxidants*, 10(8), 1216. <https://doi.org/10.3390/antiox10081216>
- Gangadhar, B. H., Sajeesh, K., Venkatesh, J., Baskar, V., Abhinandan, K., Yu, J. W., Prasad, R., & Mishra, R. K. (2016). Enhanced Tolerance of Transgenic Potato Plants Over-Expressing Non-specific Lipid Transfer Protein-1 (StnsLTP1) against Multiple Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01228>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S., Mahmud, J., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hernández-Pérez, C. A., Gómez-Merino, F. C., Spinoso-Castillo, J. L., & Bello-Bello, J. J. (2021). In Vitro Screening of Sugarcane Cultivars (*Saccharum* spp. Hybrids) for Tolerance to Polyethylene Glycol-Induced Water Stress. *Agronomy*, 11(3), 598. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030598>
- Hussain, H. A., Men, S., Hussain, S., Chen, Y., Ali, S., Zhang, S., Zhang, K., Li, Y., Xu, Q., Liao, C., & Wang, L. (2019). Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological

- attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. *Scientific Reports*, 9(1), 3890. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40362-7>
- Ilhan, D., Yazicilar, B., Geyik, M. S., Atici, O., & Bezirganoglu, I. (2024). In Vitro Studies of Salt Tolerance at the Physiological and Molecular Levels in Two Cultivars of Emmer Wheat (*Triticum dicoccum* Schrank ex Schübl). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 24(2), 2566–2576. <https://doi.org/10.1007/s42729-024-01678-0>
- Jehan, K., Sayyar Khan, M., Iqbal, N., Ullah, M., Malik, S., & Muhammad Khan, A. (2024). In Vitro Characterization and Analysis of Rice Varieties Against Various Levels of Salt Stress. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, e11179. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.11179>
- Laksana, C., Sophiphun, O., & Chanprame, S. (2023). In vitro and in vivo screening for the identification of salt-tolerant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) clones: molecular, biochemical, and physiological responses to salt stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(6), 103655. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103655>
- Lopes, M. J. dos S., Dias-Filho, M. B., & Gurgel, E. S. C. (2021). Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>
- Ma, X.-J., Yu, T.-F., Li, X.-H., Cao, X.-Y., Ma, J., Chen, J., Zhou, Y.-B., Chen, M., Ma, Y.-Z., Zhang, J.-H., & Xu, Z.-S. (2020). Overexpression of GmNFYA5 confers drought tolerance to transgenic Arabidopsis and soybean plants. *BMC Plant Biology*, 20(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02337-z>
- Mehmandar, M. N., Rasouli, F., Giglou, M. T., Zahedi, S. M., Hassanpouraghdam, M. B., Aazami, M. A., Tajaragh, R. P., Ryant, P., & Mlcek, J. (2023). Polyethylene Glycol and Sorbitol-Mediated In Vitro Screening for Drought Stress as an Efficient and Rapid Tool to Reach the Tolerant Cucumis melo L. Genotypes. *Plants*, 12(4), 870. <https://doi.org/10.3390/plants12040870>
- Noctor, G., Reichheld, J.-P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell &*

- Developmental Biology*, 80, 3–12.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.013>
- Orłowska, R., Zimny, J., Zebrowski, J., Androsiuk, P., & Bednarek, P. T. (2024). An insight into tissue culture-induced variation origin shared between anther culture-derived triticales regenerants. *BMC Plant Biology*, 24(1), 43.
<https://doi.org/10.1186/s12870-023-04679-w>
- Peršić, V., Ament, A., Antunović Dunić, J., Drezner, G., & Cesar, V. (2022). PEG-induced physiological drought for screening winter wheat genotypes sensitivity – integrated biochemical and chlorophyll a fluorescence analysis. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.987702>
- Qadir, M., Hussain, A., Hamayun, M., Shah, M., Iqbal, A., Irshad, M., Ahmad, A., Lodhi, M. A., & Lee, I.-J. (2021). Phytohormones Producing *Acinetobacter bouvetii* P1 Mitigates Chromate Stress in Sunflower by Provoking Host Antioxidant Response. *Antioxidants*, 10(12), 1868.
<https://doi.org/10.3390/antiox10121868>
- Rahman, Md. M., Mostofa, M. G., Rahman, Md. A., Islam, Md. R., Keya, S. S., Das, A. K., Miah, Md. G., Kawser, A. Q. M. R., Ahsan, S. M., Hashem, A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F., & Tran, L.-S. P. (2019). Acetic acid: a cost-effective agent for mitigation of seawater-induced salt toxicity in mung bean. *Scientific Reports*, 9(1), 15186. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51178-w>
- Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K.-H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International*, 125, 365–385.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>
- Sahu, M., Maurya, S., & Jha, Z. (2023). In vitro selection for drought and salt stress tolerance in rice: an overview. *Plant Physiology Reports*, 28(1), 8–33. <https://doi.org/10.1007/s40502-023-00713-z>
- Shahid, M., Singh, U. B., Khan, M. S., Singh, P., Kumar, R., Singh, R. N., Kumar, A., & Singh, H. V. (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop

- plants. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132770>
- Shimosaka, E., & Ozawa, K. (2015). Overexpression of cold-inducible wheat galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice. *Breeding Science*, 65(5), 363–371. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.363>
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 407–426. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9372-8>
- Soumare, A., Diédhiou, A. G., Arora, N. K., Tawfeeq Al-Ani, L. K., Ngom, M., Fall, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., & Sy, M. O. (2021). Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649878>
- Tang, Y., Wang, X., Wang, Y., Xie, J., Zhang, R., Liu, T., Jia, S., & Bao, X. (2025). Heterologous expression of physic nut JcHDZ25 confers tolerance to drought stress in transgenic rice. *BMC Genomics*, 26(1), 366. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11566-1>
- Villalobos-López, M. A., Arroyo-Becerra, A., Quintero-Jiménez, A., & Iturriaga, G. (2022). Biotechnological Advances to Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 12053. <https://doi.org/10.3390/ijms231912053>
- Vuksanović, V., Kovačević, B., Kebert, M., Pavlović, L., Kesić, L., Čukanović, J., & Orlović, S. (2023). In vitro selection of drought-tolerant white poplar clones based on antioxidant activities and osmoprotectant content. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1280794>
- Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., Chen, H., Chen, F., & Chu, C. (2008). Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology*, 67(6), 589–602. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9340-6>

- Wijerathna-Yapa, A., & Hiti-Bandaralage, J. (2023). Tissue Culture—A Sustainable Approach to Explore Plant Stresses. *Life*, 13(3), 780. <https://doi.org/10.3390/life13030780>
- Żur, I., Kopeć, P., Surówka, E., Dubas, E., Krzewska, M., Nowicka, A., Janowiak, F., Juzoń, K., Janas, A., Barna, B., & Fodor, J. (2021). Impact of Ascorbate—Glutathione Cycle Components on the Effectiveness of Embryogenesis Induction in Isolated Microspore Cultures of Barley and Triticale. *Antioxidants*, 10(8), 1254. <https://doi.org/10.3390/antiox10081254>

BAB 12

TEKNIK KULTUR TANAMAN

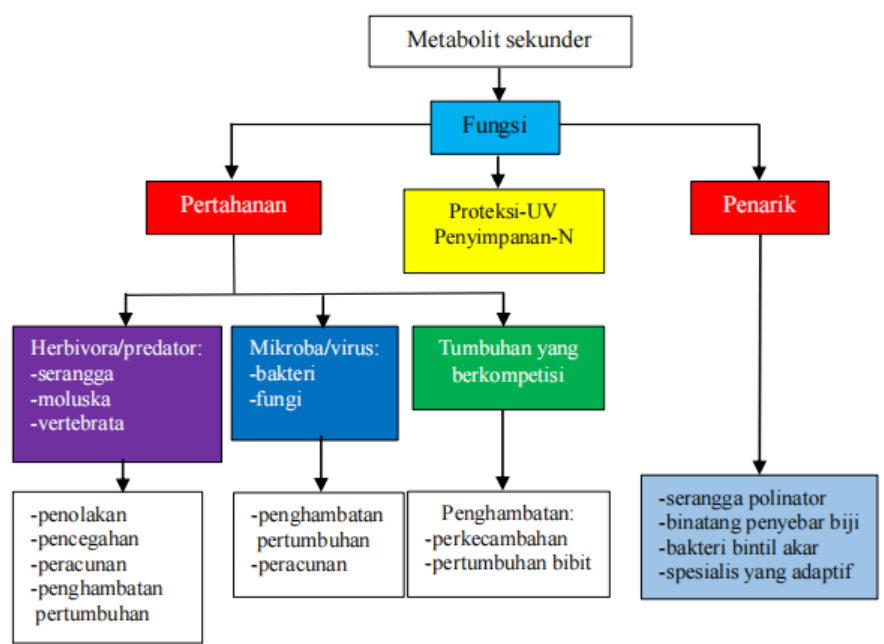
PENGHASIL METABOLIT SEKUNDER

Oleh Veronica Leonora Tuhumena

12.1 Pendahuluan

Tumbuhan memiliki peran penting dalam pemenuhan kebutuhan hidup manusia baik kebutuhan akan sandang, pangan dan papan. Selain pemenuhan kebutuhan dasar, senyawa-senyawa yang terkandung didalamnya dianggap berkasiat untuk menyembuhkan dan menambah stamina bagi manusia. Seiring perkembangan teknologi, tanaman dianggap sebagai salah satu sumber utama penghasil senyawa kimia yang digunakan dalam berbagai keperluan seperti farmasi, zat additiv pada produk makanan minuman, keperluan kosmetik, wangi-wangian pestisida nabati dan sebagainya. Sebagian dari senyawa kimia berasal dari hasil ekstrak spesies-spesies tanaman tropis yang diproses dengan biaya yang mahal menyebabkan sintesis secara kimiawi tidak ekonomis. Oleh sebab itu digunakanlah biositesis metabolit sekunder dengan kultur jaringan. Metabolit sekunder (MS) memiliki peran dalam pertumbuhan tanaman karena memiliki fungsi fisiologis untuk pertahanan terhadap patogen dan herbivora, antraktan dan pelindung dari sinar UV. Menurut Welter dan Constabel (1991), MS adalah produk dari tanaman yang khas dalam bentuk terpenoid, glikosida (steroid, fenolik) dan alkaloid. Beberapa fungsi dari MS pada tumbuhan yaitu ; 1) Membentuk senyawa yang berfungsi melindungi tumbuhan dari serangan virus, bakteri, dan fungi; tumbuhan yang merupakan pesaing bagi tanaman lain dan yang terpenting adalah terhadap serangga hama yang merusak tanaman itu sendiri, 2) Menimbulkan traktan (bau, warna, rasa) untuk serangga penyerbuk dan hewan yang menyebarkan biji, 3) Memberikan perlindungan bagi tanaman dari sinar UV dan penyimpanan-N. Selain fungsi MS sebagai perlindungan bagi tanaman, MS dapat juga berfungsi untuk

meningkatkan kemampuan tanaman untuk bereproduksi dengan menghambat perkembangan fungi, bakteri, dan serangga hama dan salahnya adalah fotoaleksin. Fotoaleksin merupakan senyawa anti mikroba yang dihasilkan oleh tanaman dengan berat molekul rendah sebagai respon terhadap cekaman faktor biotik dan faktor abiotik (Jeandet, 2015)



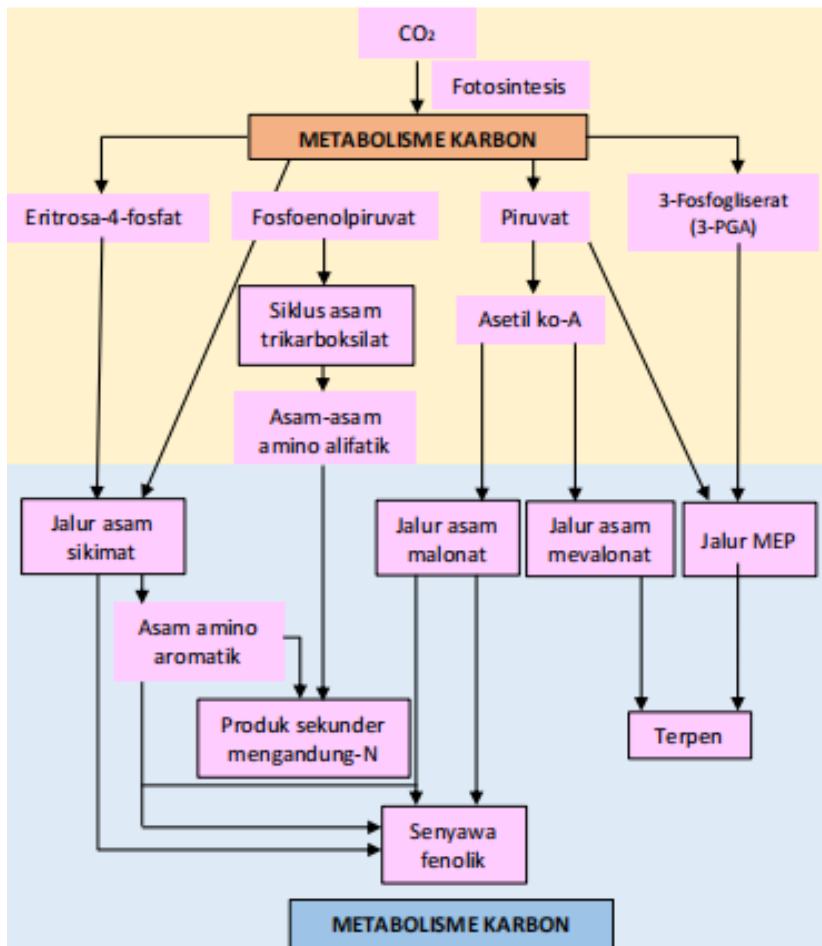
Gambar 12.1. Metabolit sekunder dan fungsinya bagi tumbuhan (Wink,2010)
(Sumber : Ullung Anggraito *et al.*, 2018)

Metabolit sekunder dapat dilakukan dengan menggunakan teknik kultur sel, namun untuk kepentingan perbaikan budidaya tanaman itu sendiri, dapat dilakukan dengan kultur jaringan. Kultur jaringan adalah mengisolasi sel/jaringan jaringan pada organ tanaman dan ditumbuhkan dalam media agar yang didalamnya terdapat nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam kondisi aseptik (Kristina, *et al.*, 2017). Kultur jaringan merupakan perbanyakan teknik perbanyakan vegetatif dengan mengisolasi bahan tanaman (eksplan) untuk kajian mutasi genetik dengan tanaman haploid, fusi

protoplas dan seleksi galur-galur untuk memperoleh galur yang tahan terhadap penyakit tanaman. Keuntungan dari penggunaan teknik kultur jaringan untuk menghasilkan MS antara lain tidak tergantung pada faktor lingkungan, serangan hama dan penyakit tanaman, hambatan geografis dan musim, untuk menghasilkan tanaman dapat diatur sesuai dengan kebutuhan, kualitas dan hasil produk (tanaman) lebih konsisten, dan menghemat penggunaan lahan karena diusahakan dalam lingkungan yang lebih kecil. .

Totipotensi sel adalah kemampuan sel untuk hidup dan tumbuh menjadi individu yang baru yang lengkap. Kemampuan inilah yang menjadi alasan tanaman dapat diperbanyak menggunakan teknik kultur jaringan. Selain itu dianggap lebih menguntungkan dibanding secara konvensional karena terdapat keuntungan proses hilir dan sintesis produk yang diinginkan. Industri kimia terutama industri farmasi dalam perkembangannya sangat membutuhkan senyawa alami yang dari tanaman karena senyawa tersebut tidak dapat digantikan oleh senyawa-senyawa lain karena memiliki kemampuan dalam menyembuhkan.

Biosintetik MS terbentuk dari molekul yang digunakan oleh enzim biosintetik sebagai substrat (prekursor) dan molekul tersebut kemudian dikonversi menjadi produk berupa senyawa intermediat yang akan digunakan kembali sebagai substrat enzim biosintetik berikutnya atau sebagai produk akhir reaksi tertentu. Biosintesis MS melalui jalur asam sikimat, jalur malonat, jalur asam mevalinat dan metileritrit fosfat (MEP).



Gambar 12.2. Jalur utama biosintesis dan hubungannya dengan MS (Taiz & Zeiger, 2015).
(Sumber : digilib.uns.ac.id)

12.2 Produksi Senyawa MS dan Faktor yang Mempengaruhi

1. Ekspresi Sintesis Senyawa MS

Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi senyawa MS menggunakan teknik kultur jaringan antara lain ; faktor genetik, faktor dalam kultur itu sendiri dan faktor lingkungan (eksternal). semua faktor diatas tergantung dari teknik kultur jaringan yang

digunakan, dan teknik manipulasi untuk menghasilkan senyawa MS dalam jumlah yang besar. Wujud senyawa metabolit sangat dipengaruhi oleh perkembangan organisme penghasil dan diferensiasi sel organisme penghasil sangat mempengaruhi sintesis senyawa tersebut. Misalnya senyawa antosianin akan dihasilkan oleh tanaman pada tahapan perkembangan tertentu; pada tanaman wortel, senyawa ini akan terbentuk pada bagian umbi namun pada tanaman lain senyawa antosianin akan ditemukan pada bunga, buah atau daun. Selain disebabkan oleh perkembangan sel, wujud SM, wujud dari SM juga dipengaruhi oleh kontrol sel terhadap jumlah enzim dan aktivitas yang berlangsung dalam biosintesis senyawa. Walaupun banyak senyawa MS yang dihasilkan, namun terkadang jumlah senyawa yang dihasilkan lebih sedikit bila sel tersebut berkembang membentuk organ lain. Contohnya ; pada kultur daun tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*) dihasilkan senyawa sebagai obat anti kanker (vinblastin dan vincristin), dibanding dengan kultur kalu.

Selain perkembangan sel, wujud senyawa MS tergantung juga pada pengaturan jumlah dan aktifitas jumlah enzim aktif yang terlibat dalam selama proses metabolisme berlangsung. Pada kondisi alami, jumlah dan aktifitas enzim yang terlibat dalam metabolisme dipengaruhi oleh faktor suhu, cahaya matahari atau serangan mikroorganisme yang mengakibatkan penyakit pada tanaman sehingga menimbulkan respon resistensi yang dapat diinduksi atau keadaan stres lainnya. Faktor ini menyebabkan sintesis dan peningkatan jumlah enzim, yang terlibat dalam MS sehingga senyawa metabolit yang dihasilkan meningkat.

2. Asal Bahan Eksplan

Karakter Genetik dan Fisiologi

Kegiatan analisis karakter genetik dan fisiologi dari eksplan sangat penting dilakukan untuk hasilkan MS dengan teknik kultur jaringan. Kegiatan analisis yang dapat dilakukan adalah : Tahap pertama : Analisis jaringan tanaman sehingga diketahui bagian tanaman yang memiliki kandungan senyawa tertinggi.

Analisis ini dapat dilakukan secara visual misalnya dari golongan pigmen seperti antosianin. Deteksi ini umumnya dilakukan di antara kultivar yang berbeda karena memiliki kandungan biokimia yang berbeda yang diturunkan. Selain itu, faktor lainnya adalah umur dari bagian tanaman yang dipilih dimana semakin muda usia fisiologi eksplan, maka keberhasilan kultur semakin besar, dan untuk mendapatkannya dilakukan grafting pada tanaman yang tua selanjutnya bagian muda tersebut diisolasi. Eksplan yang dipilih perlu dilakukan perlakuan pendahuluan yaitu dengan mempertimbangkan waktu pengambilan eksplan, pemberian unsur hara tertentu untuk merangsang perkembangan jaringan muda misalnya pemberian nitrogen, menanam pada kondisi gelap agar diperoleh tanaman yang teretiolasi dan pemberian zat pengatur tumbuh tertentu untuk sehingga tanaman lebih respon terhadap perlakuan yang diberikan.

Pemilihan Teknik Kultur Jaringan

Teknik kultur dalam media cair (suspensi) menjadi pilihan utama digunakan karena metode ini diharapkan memproduksi SM secara besar-besaran menggunakan bioreaktor. Beberapa keuntungan dari kultur suspensi adalah ; pertumbuhan lebih cepat, setelah dilakukan sub kultur sel relatif homogen, sel-sel dapat diamati mikroskop karena merupakan sel bebas, media cair kontak langsung dengan setiap sel, media dapat dibaharui dengan penambahan media baru, dan sel-sel dapat di pindah tanam secara langsung. Pada tahapan awal dilakukan dengan penanaman eksplan atau kalus pada media cair yang mengandung auksin konsentrasi rendah. Kalus yang mudah rapuh biasanya lebih baik dan cepat menghasilkan sel-sel tunggal apabila dimasukkan dalam medium yang dikocok. Pengocokkan menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 100-140 rpm dengan suhu 25°C - 30°C. Dengan pengocokkan , maka kalus mudah rapuh dan terlepas menjadi bagian-bagian yang kecil.

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kultur Jaringan

Pertimbangan utama dalam menentukan teknik kultur yang digunakan adalah biomassa yang dihasilkan dan konsentrasi senyawa yang digunakan sehingga dihasilkan SM dalam jumlah yang besar. Informasi tentang sifat fisiologis eksplan sangat membantu sehingga diperoleh senyawa metabolit yang banyak. Sebagai contoh, senyawa pembentuk warna paling banyak dihasilkan pada saat log phase adalah betasianin, sedangkan pada stationary phase senyawa antosianin maksimum diproduksi dengan demikian kondisi yang dibutuhkan untuk produksi kedua senyawa ini berbeda. Produksi biomassa sangat dipengaruhi oleh hasil fotosintesis yaitu karbohidrat atau turunannya. Pada kultur jaringan, massa sel yang dihasilkan sangat dipengaruhi dari kecepatan sel membelah diri, memperbanyak diri dan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi oleh konsentrasi auksin dan sitokinin pada tanaman, jenis media, ketersediaan unsur hara makro, ketersediaan karbohidrat, pemberian zpt alami seperti air kelapa, cahaya, pengocokkan, suhu, pH dan lain sebagainya.

a. Produksi Biomassa

Sumber karbohidrat ; sumber-sumber karbohidrat (glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, molase) dan sumber pati yang dicobakan pada beberapa tanaman lainnya seperti *Nicotiana tabacum* dan dari sumber karbohidrat tersebut, glukosa merupakan sumber karbohidrat efektif.

Pemberian Nitrogen ; Nitrogen diberikan pada media dalam bentuk NH_4NO_3 dan KNO_3 . Tetapi ada kecenderungan bahwa KNO_3 mempengaruhi kecepatan pertumbuhan.

Pemberian Fosfor; fosfor yang diberikan akan bekerjasama dengan ion kalium dan diduga berkaitan dengan sukrosa dan ferrum.

Kalsium ; peningkatan berat basah pada kultur jaringan beberapa jenis tanaman seperti tembakau tidak dipengaruhi oleh Ca^{++} pada kisaran 1,5-6 .

Vitamin ; Pemberian vitamin seperti thiamin, nicotinic acid, pyridoxin dan asam pantotenat memberikan efek positif diantaranya meminimalkan stress pada eksplan. Stress

pada eksplan terjadi karena rendahnya kemampuan untuk mensintesis vitamin atau stress karena pemindahan ke medium segar yang belum dikondisikan.

Zat pengatur tumbuh; beberapa kelompok senyawa yang memiliki pengaruh untuk pertumbuhan eksplan penghasil metabolit sekunder adalah auksin, sitokonin, giberellin, ethylen.

b. Produksi Metabolit Sekunder

Produksi metabolit sekunder tidak hanya dipengaruhi oleh peranan fisiologi, namun tergantung juga oleh hara mineral seperti; zat pengatur tumbuh, sukrosa, nitrogen, fosfor; dan lingkungan kultur.

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) ; dalam memproduksi senyawa metabolit, zpt golongan auksin berpengaruh terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus. Namun terdapat kelompok auksin yang dapat menghambat pembentukan MS. Pada kultur *Morinda citrifolia* , jika NAA digantikan dengan 2,4 D terjadi peningkatan produksi anthraquinone sebesar 30 kali . Jenis zpt dengan konsentrasi yang berbeda akan mengakibatkan perubahan kuantitatif yang berbeda. Penelitian Ernawati et al (1991) terlihat bahwa pada kultur kalus *Polygonum tinctorium* Ait dengan pemberian auksin jenis IAA, NAA dan 2,4 D menunjukkan bahwa pemberian IAA mampu menghasilkan antosianin dalam jumlah terbesar, baik diberikan tunggal maupun bila dikombinasikan dengan kinetin.

Diantara sitonkinin yang diberikan, kinetin diketahui mampu meningkatkan senyawa anti jamur sedang pemberian NAA menurunkan produksi senyawa anti jamur. Sukrosa; pada beberapa senyawa metabolit sekunder, peningkatan konsentrasi sukrosa mengakibatkan peningkatan senyawa bersangkutan. Pada kultur suspensi *Rosa* sp, peningkatan sukrosa 2 sampai 4 % mengakibatkan meningkatnya senyawa-senyawa polifenol. Pada kultur kalus *Lithospermum erythrorhizon*, hasil senyawa-senyawa turunan shikonin meningkat per gram berat basah dengan peningkatan sukrosa 1 menjadi 5 % dan relatif tetap pada

konsentrasi 7-10%, namun peningkatan konsentrasi sukrosa ini akan menurunkan berat basah kalus. Menurut Ernawati et al (1990) , dengan meningkatkan konsentrasi sukrosa sampai 6% akan meningkatkan produksi senyawa anti jamur pada kultur akar berambut *Polygonum tinctorium* Ait.

Nitrogen ; untuk beberapa kasus, dengan meningkatkan nitrogen akan menurunkan senyawa metabolit sekunder. Seperti pada kultur *Acer pseudoplatanus* dengan peningkatan nitrat atau urea, akumulasi senyawa-senyawa fenolik menurun. Selanjutnya Ernawati et al (1991) melaporkan bahwa kultur suspensi sel *Polygonum tinctorium* Ait bila konsentrasi NH_4^+ dalam medium dihilangkan maka sintesis antosianin akan meningkat tetapi peningkatannya tidak melebihi peningkatan akibat kinetin. Selanjutnya dilaporkan bahwa pada kultur suspensi sel *Scopolia japonica* produksi inhibitor plasmin meningkat, sedangkan pertumbuhannya sedikit dipengaruhi oleh penurunan kandungan ammonium . Fosfor ; fosfor dapat mempengaruhi sintesis metabolit sekunder baik secara positif maupun negatif. Pada kultur kalus *Peganum harmala*, menghilangkan kandungan fosfat pada media dapat meningkatkan kandungan harmanol dan harmine. Sebaliknya pada kultur suspensi *Catharanthus roseus* dengan peningkatan fosfat dalam medium akan meningkatkan senyawa-senyawa indole. Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh fosfat pada produksi senyawa-senyawa metabolit sekunder dipengaruhi oleh senyawa itu sendiri.

Faktor Lingkungan Kultur; cahaya mempengaruhi perkembangan tanaman dalam kultur jaringan karena berhubungan dengan aktifitas enzim. Aktifitas enzim yang terlibat dalam biosintesis asam cinamat, kumarin, lignin. Flavor, flavonol, chalcone dan antosianin sangat dipengaruhi oleh cahaya.

12.3 Peningkatan Produksi Metabolit Sekunder

Untuk memperbaiki produksi metabolit sekunder, dapat dilakukan beberapa upaya antara lain :

1. Penggabungan Sel untuk menghasilkan senyawa MS; manfaat fusi sel dalam menghasilkan MS antara lain ; produksi senyawa baru, peningkatan produksi, produksi dalam skala besar.
2. Seleksi Sel. Digunakan untuk menghasilkan lini sel sehingga diperoleh senyawa MS dalam jumlah besar dikarenakan variasi pada sel-sel dalam kemampuannya untuk menghasilkan senyawa . Variasi sel yang dimaksud adalah variasi somaklonal dimana secara genetik dapat dimanfaatkan sebagai sumber keragaman dalam menghasilkan senyawa tertentu. Untuk menghasilkan variasi tersebut diberikan 2.4 D sampai batas tertentu sehingga akan terjadi mutasi genetik pada sel-sel kalus yang dihasilkan.

Seleksi Visual. Perbanyakkan tanaman dengan teknik kultur jaringan dapat menghasilkan bermacam senyawa pigmen dalam jumlah besar sehingga dapat diseleksi secara visual. Misalnya seleksi kultur *Haplopappus* menghasilkan sel dengan antosianin tinggi.

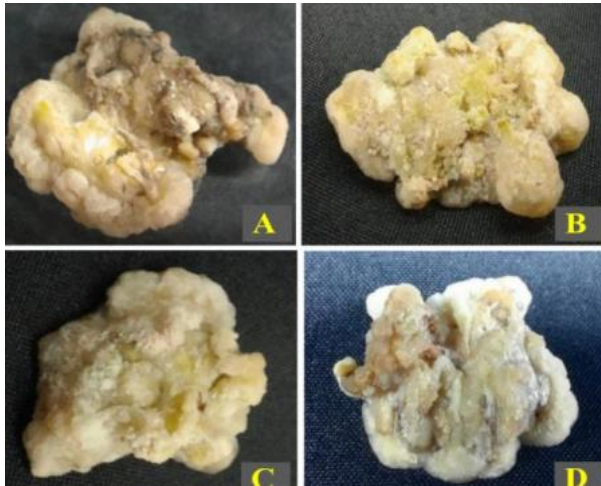
Seleksi dengan Metode adio Immuno Assay (RIA)_. Metode ini berguna untuk mengukur antigen yang berfokus untuk deteksi molekul. RIA digunakan untuk memproduksi senyawa Indol Al-kaloid serpentin dan ajmalicine yang kandungannya lebih tinggi dari normal. Metode ini memiliki sensitivitas yang tinggi dan cepat sehingga dapat digunakan untuk menganalisa sampel dalam jumlah besar.

Seleksi Ukuran Sel. Seleksi ini dilakukan berdasarkan asumsi bahwa kelompok sel yang kecil memiliki kandungan antosianin yang tinggi. Media yang digunakan adalah media W.C Imp (Wild Carrot Medium, Improved for anthocyanin production). Pada metode ini, media cair 50 ml dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 ml selanjutnya di kocok dengan shaker dalam keadaan gelap pada kecepatan 112 rpm dan suhu 20 °C. Setelah 14 hari, sampel diambil utk di sub kultur dan analisis

kandungan antosianinnya dan di distribusi ukuran agregat selnya.

3. Penggunaan Elisitor untuk Produksi MS

Untuk menghasilkan senyawa-senyawa biokimia dapat dilakukan dengan alterasi metabolisme sel melalui faktor eksternal seperti stress. Elisitor adalah teknik bioteknologi yang melibatkan penambahan agen (elisitor) pada tanaman atau kultur sel untuk memicu dan meningkatkan sintesis senyawa bioaktif tersebut sebagai respons terhadap stres. Menurut Khan et al (2021) Elisitor adalah pengaruh senyawa kimia dan lingkungan yang dapat merangsang dan menimbulkan respons pertahanan tanaman, termasuk sintesis senyawa-senyawa bioaktif, sebagai respons terhadap stres biotik atau abiotic. Dosis elisitor yang diberikan mampu menentukan tingkat efektivitas dalam menginduksi senyawa yang dituju. Contohnya penambahan elisitor Cu^{2+} sebanyak 6 ppm mampu meningkatkan kandungan senyawa flavonoid kalus tanaman tapak dara, sehingga dapat diindikasikan bahwa elisitor Cu^{2+} memiliki potensi untuk digunakan dalam pengembangan senyawa sekunder tanaman obat (Numba S et al, 2024)

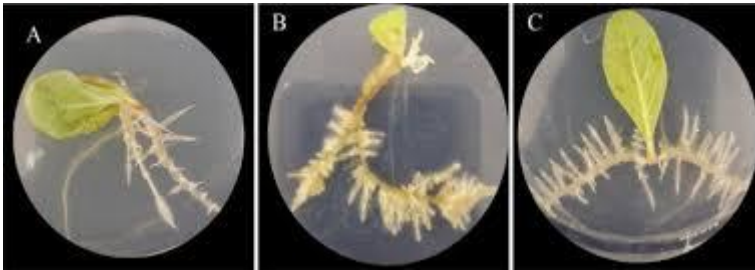


Gambar 12.3. Warna dan tekstur kalus hasil induksi berbagai konsentrasi Cu^{2+} pada media

(Sumber : *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan* Vol. 24 (3): 366-374)

4. Penggunaan Kultur Akar Berambut dalam Produksi MS

Kultur ini dilakukan dengan menginokulasi suspensi bakteri *Agrobacterium rhizogenes* pada bagian tanaman yang dilukai. Tanaman induk yang digunakan dapat berupa bibit yang ditumbuhkan pada rumah kaca. Bakteri yang berusia 2 hari dipelihara dalam media YMB dan diinkubasi pada suhu 25°C. Transformasi dapat diinduksi pada daun, peile, batang yang dilukai, pelukaan dapat dilakukan menggunakan jarum hipodermis yang mengandung bakteri tebal sehingga memungkinkan inokulasi pada beberapa tempat. Pada beberapa jenis tanaman, akar akan muncul secara langsung pada tempa inokulasi bakteri; tetapi pada spesies tertentu diawali dengan kemunculan kalus dan kemudian akar pada umur normal 1-4 hari.



Gambar 12.4. Pembentukan akar berambut menggunakan bakteri *Agrobacterium* yang dilakukan pada potongan daun, batang muda dengan cara menginfeksi dengan jarum suntik.
(Sumber : Research Gate)

Salah satu sifat penting kultur akar berambut dalam produksi metabolit sekunder adalah kestabilan dalam produksi senyawa metabolit sekunder. Dimana pada kultur akar berambut yang bersifat transformasi, pertumbuhannya relatif cepat, tidak memerlukan auksin eksogen sehingga mempengaruhi produksi metabolit sekunder.

12.4 Produksi dan Isolasi Metabolit Sekunder

Upaya menghasilkan metabolit sekunder dengan teknik kultur jaringan adalah teknik bioteknologi yang diterapkan untuk

menghasilkan senyawa penting secara konsisten dan efisien dari tanaman secara *in vitro* yang dilakukan dalam kondisi pertumbuhan dan pemanenan yang stabil tanpa dipengaruhi iklim dan geografis. Langkah-langkah dalam produksi dan isolasi metabolit sekunder adalah :

1. Preparasi Sampel meliputi : sampel tumbuhan (daun atau kulit batang) yang dibersihkan, dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk. Sampe mikroorganisme berbentuk koloni seperti jamur diinokulasi kedalam media cair untuk pertumbuhannya selanjutnya diinkubasi menggunakan shaker.
2. Ekstrasi serbuk sampel atau kultur mikroorganisme. Ekstrasi menggunakan pelarut organik yang sesuai seperti metanol atau etil asetat melalui proses perendaman.
3. Fraksinasi dimana ekstrak kental yang dihasilkan kemudian dipartisi menggunakan pelatur lain yang berbeda polar untuk memisahkan senyawa menjadi fraksi-fraksi
4. Isolasi dimana fraksi yang mengandung senyawa target dipisahkan menggunakan krimatgraf kolom, kromatografi tipis (KLT) atau teknik lain yang menghasilkan isolat murni
5. Identifikasi senyawa. Setelah isolat murni diperoleh, dilakukan identifikasi struktur menggunakan analisis spektroskopi UV-VIS dan IR untuk menentukan gugus fungsi dan struktur molekul
6. Uji Bioaktivitas, setelah senyawa metabolit murni yang diperoleh selanjutnya di uji aktivitas biologisnya seperti aktivitas mikroba.

DAFTAR PUSTAKA

- Ellok Dwi Sulichantini, 2015. Produksi Metabolit Sekunder Melalui Kultur Jaringan. Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian Ke-1. Samarinda, 5-6 Juni 2015
- Ernawati, A., S. Mayama and M. Kyo. 1991. Selection of anthocyanin and antifungal compounds of *Polygonum tinctorium* Ait. Bulletin Agron. XX (1):1.
- Henny Rampe *et al.* 2019. Pemanfaatan Elisitor Ekstrak Tumbuhan dalam Budidaya Tanaman Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L.). Jurnal Pengabdian Multidisiplin . Vivabio Volume 1 Nomor 1, April 2019
- Khan M, Khan ST. Epidemiology and Progress So Far. Moléculas. 2021;26 (1):1-25
- Kristina, M., Pandiangana D., dan Febby E. 2017. Deskripsi jenis-jenis kontaminan dari kultur kalus *Catharanthus roseus* L. G Don. Jurnal MIPA UNSRAT, 6(1): 47- 52.
- Nurlayla Bonggi *et al.* 2024. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Metanol pada Umbi Belajang Keissi'(*Stephania venosa* (Blume) Spreng). *Jurnal Chemica* Vol. 25 Nomor 2 Desember 2024, 1-13.
- Saputra Nduru *et al.* 2024. Pemanfaatan Elisitor Pada Tanaman. Jurnal Sapta Agrica Vol. 3 No. 1 Edisi Mei 2024. *Universitas Nias Raya*
- Sudirman Numba *et al.*, 2023. Peningkatan Senyawa Flavonoid Melalui Penggunaan Elisitor Pada Kultur Kalus Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.). Jurnal Penelitian Pertanian Terapan Vol. 24 (3): 366-374
- Tim Laboratorium Kultur Jaringan, 1991. Bioteknologi Tanaman. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Ullung Anggraito *et al.* 2018. *Metabolit Sekunder dari Tanaman : Aplikasi dan Produksi*. Diterbitkan oleh: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam . Universitas Negeri Semarang
- Wetter, L.R dan F. Constabel. 1991. Metode Kultur Jaringan Tanaman Edisi Kedua. Bandung : ITB

BAB 13

KULTUR DAN FUSI PROTOPLAS

Oleh Rahayu Opi Anggoro

13.1 Pendahuluan

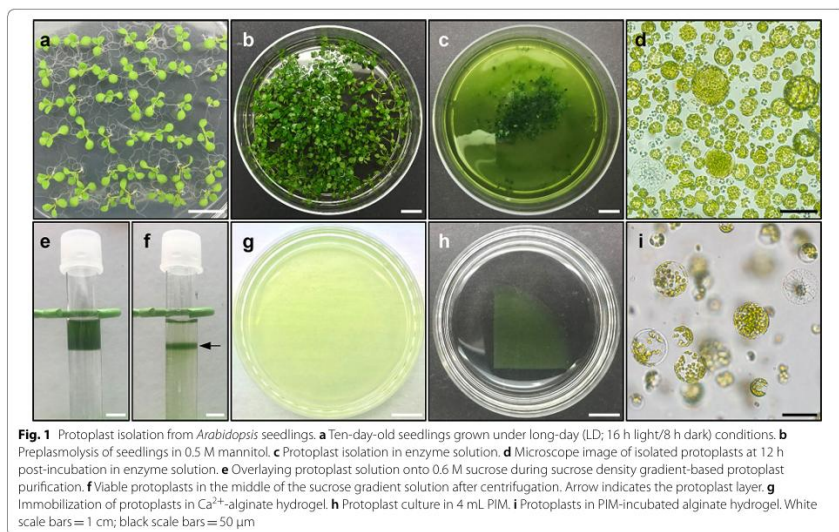
Kultur jaringan tanaman merupakan cabang ilmu bioteknologi yang mempelajari teknik pertumbuhan sel, jaringan, atau organ tanaman secara terpisah dari tanaman induk pada media buatan. Teknik ini tidak hanya digunakan untuk tujuan praktis dalam perbanyakan tanaman, tetapi juga menjadi metode penting dalam penelitian berbagai bidang botani. Pemahaman yang mendalam mengenai cara menumbuhkan dan memanipulasi bahan tanaman dalam kondisi *in vitro* merupakan prasyarat sebelum melakukan perbanyakan menggunakan pendekatan kultur jaringan (George et al., 2008).

Teknologi ini dipandang sangat sesuai untuk perbaikan tanaman karena efisiensinya yang tinggi dalam menghasilkan variasi somaklonal maupun gametoklonal. Melalui teknik mikropropagasi, dapat diperoleh bahan tanam dengan kualitas lebih baik. Selain itu, kultur jaringan juga berperan dalam memperkenalkan keragaman genetik serta memungkinkan seleksi varian unggul dengan produktivitas tinggi yang memiliki toleransi lebih baik terhadap cekaman biotik maupun abiotik (Hussain et al., 2012; George et al., 2008).

Salah satu metode yang dikembangkan dalam kultur jaringan tanaman adalah kultur dan fusi protoplas. Fusi protoplas merupakan metode yang sesuai untuk transfer gen antar varietas atau spesies yang bertujuan untuk mengembangkan varietas baru dengan sifat-sifat yang diharapkan seperti kualitas dan produktivitas tanaman (Prabavathy et al., 2006; Ahmed et al., 2021).

13.1.1 Definisi protoplas dan kultur protoplas

Protoplas tumbuhan (sel telanjang) merupakan sel tunggal yang telah dihilangkan dinding selnya sehingga menampilkan plasmalema. Satu gram daun dapat menghasilkan sekitar satu juta protoplas. Sifat khusus dari protoplas adalah ketika ditempatkan dalam jarak yang sangat dekat, mereka cenderung menyatu satu sama lain tanpa memandang darimana protoplas tersebut (Saran et al., 2012). Berdasarkan Jeong et al., (2021), protoplas dapat diperoleh melalui isolasi mekanis, enzimatik, atau kombinasi metode, tergantung jenis jaringan dan kondisi sumber eksplannya.



Gambar 13.1. Protoplas *Arabidopsis thaliana*

(Sumber: Jeong et al., 2021)

Protoplas telah banyak digunakan dalam penelitian ilmu tumbuhan dan pemuliaan tanaman. Transfeksi protoplas (melalui metode PEG- Ca^{2+} maupun elektroporasi) dapat mencapai efisiensi tinggi bahkan tanpa memerlukan penanda seleksi (Marx, 2016).

Kultur protoplas merupakan teknik *in vitro* di mana protoplas tersebut ditumbuhkan pada media buatan yang mendukung kelangsungan hidup sel, pembelahan, regenerasi dinding sel, pembentukan kalus, dan jika memungkinkan regenerasi tanaman utuh (Avila-Peltroche et al., 2022). Kultur ini juga meliputi

penggunaan protoplas untuk transfeksi genetik (PEG- Ca^{2+} , elektroporasi), pengujian ekspresi gen, editing gen (termasuk CRISPR), serta aplikasi penelitian dasar seperti studi regulasi hormon dan respons stres seluler (Mukundan et al., 2025)

13.1.2 Perkembangan sejarah kultur protoplas

Konsep protoplas sebagai substansi hidup dalam sel pertama kali diperkenalkan oleh Hugo von Mohl pada tahun 1846. Upaya awal isolasi protoplas tumbuhan dilaporkan oleh Klercker (1892) melalui metode mekanis untuk melepaskan dinding sel. Namun, protoplas hasil isolasi mekanis ini sangat rapuh, berumur pendek, dan tidak dapat dipertahankan dalam kultur (Thorpe, 2012).

Terobosan besar terjadi ketika Cocking (1960) mengembangkan metode isolasi enzimatis menggunakan *cellulase* dan *pectinase* untuk mendegradasi dinding sel tanpa merusak membran plasma. Teknik ini memungkinkan diperolehnya protoplas yang hidup dan stabil secara rutin. Selanjutnya, Takebe et al. (1971) menunjukkan bahwa protoplas mesofil tembakau mampu menyintesis kembali dinding sel, membelah, membentuk kalus, dan bahkan beregenerasi menjadi tanaman utuh, sehingga membuktikan totipotensi sel tumbuhan (Liu et al., 2005).

Sejak tahun 1980-an, kultur protoplas semakin luas digunakan dalam rekayasa genetik tanaman, antara lain untuk transfer gen dengan metode PEG- Ca^{2+} atau elektroporasi. Dalam beberapa tahun terakhir, protoplas banyak dimanfaatkan sebagai sistem model untuk ekspresi gen sementara, genomika fungsional, serta penyuntingan gen presisi berbasis CRISPR-Cas (Mukundan et al., 2025). Hingga kini, metode berbasis protoplas terus berkembang dan menjadi salah satu alat penting baik dalam penelitian dasar maupun aplikasi bioteknologi tanaman.

13.1.3 Signifikansi protoplas dalam bioteknologi tanaman

Protoplas memiliki peran penting dalam bioteknologi tanaman karena sifat totipotensinya, yaitu kemampuan untuk meregenerasi menjadi tanaman utuh. Teknologi kultur dan fusi protoplas membuka peluang besar dalam penelitian dasar maupun aplikasi praktis, khususnya dalam bidang perbaikan tanaman.

1. **Somatik Hibridisasi dan Cybridisasi**
Fusi protoplas memungkinkan penggabungan genom dari spesies yang tidak kompatibel secara seksual, sehingga dapat menghasilkan hibrida somatik maupun *cybrids* (cytoplasmic hybrids). Teknik ini penting untuk mengkombinasikan sifat unggul seperti ketahanan penyakit, toleransi cekaman abiotik, atau kualitas hasil panen (Ranaware et al., 2023).
2. **Transformasi dan Rekayasa Genetik**
Protoplas merupakan sistem yang ideal untuk transfer gen, baik melalui PEG- Ca^{2+} mediated transfection, elektroporasi, maupun metode modern berbasis nanoteknologi. Dengan demikian, protoplas menjadi platform utama untuk rekayasa genetik, termasuk penyuntikan gen presisi menggunakan CRISPR-Cas9 (Yue et al., 2021).
3. **Model Sistem untuk Genomika dan Biologi Sel**
Protoplas sering digunakan sebagai sistem model untuk mempelajari regulasi ekspresi gen, jalur sinyal seluler, serta interaksi molekuler, karena memungkinkan manipulasi cepat melalui transien ekspresi gen (Lu et al., 2025).
4. **Pemuliaan Tanaman dan Produksi Varietas Unggul**
Aplikasi kultur protoplas dalam pemuliaan meliputi seleksi in vitro terhadap cekaman biotik maupun abiotik, serta regenerasi tanaman dengan sifat agronomis yang lebih baik, seperti hasil tinggi (high yield) dan kualitas yang lebih unggul (Reed & Bargmann, 2021).

13.2 Isolasi dan Kultur Protoplas

Isolasi protoplas merupakan tahap awal yang sangat penting dalam pemanfaatan protoplas untuk riset maupun aplikasi bioteknologi tanaman. Protoplas diperoleh dari jaringan tumbuhan dengan menghilangkan dinding sel, namun tetap mempertahankan viabilitas sel serta integritas membran plasmanya. Keberhasilan proses isolasi sangat ditentukan oleh jenis jaringan (misalnya mesofil daun muda, kalus, atau suspensi sel), komposisi enzim (terutama cellulase dan pectinase), serta kondisi fisiologis tanaman donor (Jiang et al., 2021).

Setelah diisolasi, protoplas dapat dipelihara dalam kondisi *in vitro* menggunakan media kultur yang diperkaya dengan kombinasi auksin dan sitokinin untuk mendukung pembelahan sel dan pembentukan kalus. Selanjutnya, regenerasi dapat berlangsung melalui jalur organogenesis maupun embriogenesis somatik, yang memungkinkan perkembangan kembali menjadi tanaman utuh (Jeong et al., 2021).

Selain regenerasi, kultur protoplas juga berfungsi sebagai sistem model yang efisien untuk transformasi genetik, fusi protoplas, serta analisis ekspresi gen transien (Naing et al., 2021). Oleh karena itu, pemahaman prinsip dasar isolasi dan kultur protoplas menjadi landasan penting dalam penerapan teknologi protoplas untuk riset fundamental maupun pemuliaan tanaman modern.

13.2.1 Prinsip dasar isolasi protoplas

Isolasi protoplas merupakan proses pelepasan sel tumbuhan dari dinding selnya sehingga diperoleh sel hidup yang hanya dibatasi oleh membran plasma. Prinsip utama isolasi adalah menghilangkan dinding sel tanpa merusak membran plasma, sehingga protoplas tetap viabel dan dapat digunakan untuk kultur maupun manipulasi genetik.

Terdapat dua pendekatan utama dalam isolasi protoplas:

1. Metode Mekanis

Pendekatan ini dilakukan dengan cara fisik, seperti pemotongan atau penghancuran jaringan menggunakan mikropipet atau tekanan osmotik. Metode ini pertama kali dilaporkan oleh Klercker (1892), namun protoplas yang dihasilkan sangat terbatas, rapuh, dan sulit dipertahankan dalam kultur jangka panjang (Bogdziewicz et al., 2025)

2. Metode Enzimatis

Isolasi modern dilakukan menggunakan enzim yang mendegradasi dinding sel, seperti cellulase, pectinase, atau macerozyme. Jaringan tanaman, biasanya mesofil daun muda atau kalus embriogenik, diinkubasi dalam larutan enzim dengan kondisi osmotik seimbang menggunakan manitol atau sorbitol. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh

Cocking (1960) dan sejak itu menjadi teknik standar untuk memperoleh protoplas yang viabel dalam jumlah besar (Yao et al., 2016)

13.2.2 Teknik Isolasi, Kultur, dan Regenerasi Protoplas

Berdasarkan K. Chen et al., (2023a), isolasi protoplas umumnya dilakukan dengan metode enzimatis, menggunakan kombinasi *cellulase*, *pectinase*, atau *macerozyme* untuk mendegradasi dinding sel. Jaringan muda seperti mesofil daun atau kalus embriogenik diinkubasi dalam larutan enzim dengan kondisi osmotik seimbang (misalnya menggunakan manitol atau sorbitol) untuk menjaga viabilitas protoplas. Dibandingkan metode mekanis, pendekatan enzimatis menghasilkan protoplas yang lebih stabil, viabel, dan tersedia dalam jumlah besar.

Protoplas perlu dimurnikan dan diuji viabilitasnya setelah diisolasi. Pemurnian biasanya menggunakan filtrasi bertahap dan sentrifugasi gradien osmotik, sementara viabilitas dapat diperiksa dengan pewarnaan *fluorescein diacetate* (FDA) atau eksklusi pewarna seperti Evans blue. Protoplas viabel kemudian dikultur dalam medium yang diperkaya dengan kombinasi auksin dan sitokinin, yang berfungsi menstimulasi pembelahan sel dan pembentukan kalus (Carqueijeiro et al., 2018)

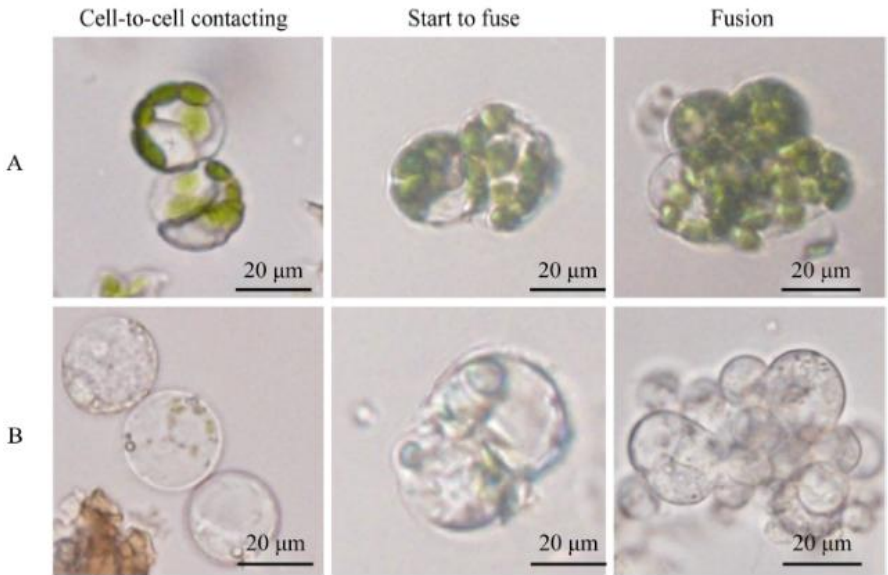
Tahap selanjutnya adalah regenerasi, yang dapat berlangsung melalui jalur organogenesis (pembentukan tunas dan akar langsung dari kalus) atau embriogenesis somatik (pembentukan embrio mirip zigotik). Regenerasi ini membuktikan sifat totipotensi sel tumbuhan, sekaligus menjadikan protoplas sebagai sistem penting untuk pemuliaan, transformasi genetik, dan produksi tanaman dengan sifat agronomis unggul (Long et al., 2022).

13.3 Fusi Protoplas

13.3.1 Prinsip, mekanisme, dan faktor yang mempengaruhi

Fusi protoplas merupakan proses penggabungan dua protoplas menjadi satu sel tunggal yang bersifat hibrid. Secara alami, fusi dapat terjadi secara spontan, namun dengan frekuensi yang sangat rendah. Oleh karena itu, berbagai pendekatan

dikembangkan untuk meningkatkan efisiensi fusi (Wang et al., 2013)



Gambar 13.2. Fusi protoplas
(Sumber: PENG et al., 2018)

Mekanisme dari fusi protoplas belum sepenuhnya diketahui. Beberapa penjelasan telah diajukan untuk memahami mekanisme ini. Salah satunya adalah ketika protoplas saling berdekatan, akan terjadi fase induksi yang memicu perubahan pada potensial elektrostatik membran sehingga menghasilkan fusi. Setelah fusi terjadi, membran kembali stabil dan potensial permukaan kembali ke keadaan semula. Literatur lain menjelaskan bahwa ketika protoplas saling menempel erat, adanya fusogen eksternal dapat mengganggu protein dan glikoprotein intramembran, sehingga memicu terjadinya fusi (Verma et al., 2008)

Keberhasilan fusi sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain: viabilitas dan kesegaran protoplas, kondisi osmotik medium, jenis serta konsentrasi agen fusi (misalnya polietilen glikol/PEG dan ion kalsium), serta tahap siklus sel yang sesuai. Pengendalian faktor-faktor ini penting agar proses fusi

berlangsung optimal dan menghasilkan hibrid yang stabil (Král et al., 2025). Berdasarkan Ahmed et al. (2021b), analisis pengaruh waktu inkubasi terhadap hasil (yield) dan viabilitas protoplas dilakukan untuk menentukan durasi optimal yang diperlukan dalam memperoleh pelepasan protoplas secara maksimal dan efisien.

Berdasarkan Narayanaswamy (1994), ketika protoplas dari organisme hidup didekatkan dan medan elektrostatik diaplikasikan melintasi membrannya, hal ini dapat menginduksi perubahan pada potensial elektrostatik membran yang kemudian menghasilkan fusi antar protoplas. Setelah fusi terjadi, membran akan mengalami stabilisasi dan potensial permukaan kembali ke keadaan semula. Beberapa peneliti berpendapat bahwa fusogen menyebabkan distorsi pada protein dan glikoprotein dalam membran ketika protoplas saling menempel erat. Peberdy (1980) menambahkan bahwa hal ini dapat meningkatkan fluiditas membran dan menciptakan area untuk terjadinya percampuran molekul lipid, sehingga memungkinkan adhesi membran yang berdekatan dan akhirnya menghasilkan fusi. Gugus fosfat pada membran bertanggung jawab terhadap muatan negatif protoplas. Penambahan ion kalsium (Ca^{2+}) dapat menurunkan potensial zeta membran sehingga memicu terjadinya fusi protoplas.

Jogdand (2009) memaparkan bahwa PEG mempunyai peran sebagai jembatan molekuler yang menghubungkan protoplas, sementara ion kalsium mengikat permukaan membran bermuatan negatif dengan PEG. Pencucian (elusi) PEG menyebabkan gangguan potensial permukaan, yang menghasilkan peningkatan kontak intramembran dan terjadinya fusi. Selain itu, sifat PEG yang memiliki afinitas tinggi terhadap air dapat menyebabkan dehidrasi membran dan meningkatkan fluiditasnya, sehingga turut menginduksi fusi. Agar fusi protoplas dapat terjadi, jarak molekuler antar protoplas harus kurang dari $10 \text{ \AA}$ (10 Angstrom). Hal ini menjadikan proses tersebut sebagai peristiwa seluler yang sangat traumatis.

13.3.2 Metode dan identifikasi hasil

Terdapat 3 kelompok besar yang digunakan sebagai metode utama, yaitu:

1. Fusi Spontan

Metode ini merupakan fusi spontan dari dua protoplas selama proses isolasi. Pada saat perlakuan protoplas dengan enzim, protoplas dari sel-sel yang berdekatan dapat menyatu melalui plasmodesma sehingga membentuk protoplas multinukleat (Ovcharenko et al., 2023)

2. Fusi Kimiawi

Dalam proses ini, bahan kimia yang digunakan disebut fusogen, seperti polietilen glikol (PEG), natrium nitrat, dan ion kalsium (Ca^{2+}), untuk menginduksi fusi protoplas. Fusogen ini menyebabkan terjadinya adhesi pada protoplas yang terisolasi, sehingga menghasilkan penggumpalan rapat dan fusi antar protoplas (Pasha et al., 2007). Kemofusi umumnya bersifat tidak selektif, non-spesifik, relatif murah, serta dapat menghasilkan produk fusi dalam jumlah besar, tetapi berpotensi bersifat sitotoksik dengan frekuensi fusi yang lebih rendah (Ozojiofor, 2017)

3. Fusi Fisik

Elektrofusi, mikroinjeksi, atau teknologi berbasis laser merupakan bagian dari metode ini. Pada dasarnya, protoplas ditempatkan dalam jarak dekat menggunakan dua mikroelektroda kapiler kaca. Medan listrik dengan kekuatan rendah kemudian diberikan pada elektroda untuk menghasilkan dipol dielektroforetik dalam suspensi protoplas, yang menyebabkan terbentuknya rantai susunan protoplas. Selanjutnya, penggunaan medan listrik kuat (100 kV m^{-1}) selama beberapa milidetik memicu kerusakan listrik pada membran dan akhirnya menghasilkan fusi (Jogdand, 2009). Elektrofusi relatif mudah dikendalikan, mampu menghasilkan frekuensi fusi yang tinggi mendekati 100%, dengan tingkat reproduktibilitas yang baik serta sitotoksitas yang lebih rendah (Ozojiofor, 2017).

13.4 Aplikasi Kultur dan Fusi Protoplas

Perkembangan teknik isolasi, kultur, dan fusi protoplas telah membuka berbagai peluang dalam bioteknologi tanaman. Menurut Klimek-Chodacka et al., (2020) protoplas digunakan meluas pada bidang kultur protoplas, di mana sel-sel ini dapat diarahkan untuk membentuk jaringan penyembuh. Jaringan tersebut selanjutnya berfungsi sebagai dasar bagi regenerasi tubuh tanaman secara utuh. Proses ini memiliki potensi besar dalam peningkatan varietas tanaman, kultur jaringan, serta program pemuliaan tanaman.

Pada intinya, fleksibilitas protoplas tanaman sebagai alat penelitian dan agen bioteknologi tidak tertandingi. Protoplas berperan sebagai landasan utama dalam teknologi transgenik tanaman, memungkinkan introduksi gen asing ke dalam sel tanaman untuk menghasilkan organisme hasil rekayasa genetika (GMO). Selain itu, protoplas juga memainkan peran penting dalam hibridisasi sel somatik, yang memfasilitasi penciptaan tanaman hibrida baru dengan sifat-sifat yang menguntungkan (K. Chen et al., 2023b)

13.4.1 Hibridisasi Somatik

Hibridisasi somatik merupakan aplikasi penting dari teknologi protoplas yang memungkinkan penggabungan dua sel dari spesies yang sama (*intra-spesifik*), spesies berbeda dalam satu genus (*inter-spesifik*), maupun antar-genus (*inter-genus*). Teknik ini mengatasi hambatan inkompatibilitas pada persilangan seksual konvensional, sehingga membuka peluang terbentuknya kombinasi genetik baru (Begna, 2020)

Melalui fusi protoplas, dua protoplas yang berbeda digabungkan menggunakan agen kimia seperti PEG- Ca^{2+} atau metode fisik seperti elektrofusi. Hasilnya berupa protoplas hibrid yang dapat dikultur menjadi kalus, lalu diregenerasikan menjadi tanaman utuh dengan sifat gabungan dari kedua tetua (Armita, 2020a)

Contoh aplikasinya antara lain pengembangan tanaman tahan penyakit, toleran cekaman abiotik (kekeringan, salinitas, suhu ekstrem), serta peningkatan kualitas nutrisi (Muhammad et

al., 2024). Misalnya, pada *Brassica* dihasilkan hibrid tahan hama dan penyakit (Romero-Muñoz & Pérez-Jiménez, 2024), sementara pada kentang diperoleh varietas dengan ketahanan tinggi terhadap patogen serta hasil yang lebih baik (He et al., 2024).

13.4.2 Peningkatan sifat tanaman

Selain menghasilkan hibrid somatik, kultur protoplas juga dapat dimanfaatkan untuk memperbaiki sifat tanaman secara langsung. Pendekatan ini memungkinkan:

1. Perbaikan ketahanan tanaman melalui penggabungan sifat toleransi cekaman abiotik (kekeringan, salinitas) dan biotik (penyakit, hama) (Muhammad et al., 2024)
2. Peningkatan kualitas hasil pertanian, seperti kandungan nutrisi, rasa, maupun umur simpan produk (Yang et al., 2024a)
3. Peningkatan produktivitas, dengan cara menggabungkan gen-gen yang mengatur efisiensi fotosintesis, pertumbuhan, dan hasil panen (Ambavaram et al., 2014)

Kultur protoplas juga menjadi sarana penting untuk seleksi *in vitro*, misalnya terhadap media dengan garam tinggi (Wijerathna-Yapa & Hiti-Bandaralage, 2023), herbisida (Adamu Ishaku et al., 2023), atau logam berat (Elazab et al., 2023). Sel-sel yang mampu bertahan dapat dikembangkan menjadi tanaman baru yang lebih adaptif terhadap kondisi lingkungan ekstrem.

13.4.3 Produksi metabolit sekunder dari kultur protoplas

Selain pemuliaan tanaman, protoplas juga berperan dalam produksi metabolit sekunder yang memiliki nilai farmasi, pangan, maupun industri. Kultur protoplas dapat diarahkan untuk menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah tinggi, misalnya alkaloid, flavonoid, terpenoid, atau fenolik (Aoyagi, 2011).

Keunggulan pendekatan ini adalah kemampuannya memproduksi metabolit tanpa bergantung pada ketersediaan tanaman utuh di alam, sehingga mendukung konservasi keanekaragaman hayati. Selain itu, kultur protoplas mudah dimodifikasi dengan teknik elicitation (penambahan senyawa

pemicu) atau rekayasa genetik untuk meningkatkan hasil metabolit tertentu (Ozyigit et al., 2023).

Contoh aplikasinya adalah produksi ajmalisin dari kultur protoplas *Catharanthus roseus* untuk pengobatan hipertensi (Fulzele & Heble, 1994), serta shikonin dari *Lithospermum erythrorhizon* yang bernilai tinggi dalam industri farmasi dan kosmetik (Yadav et al., 2022). Dengan demikian, kultur protoplas membuka peluang besar untuk bioprospeksi dan industrialisasi produk alami berbasis tanaman.

13.4.4 Transformasi Genetik Berbasis Protoplas

Protoplas telah menjadi sistem yang sangat penting dalam transformasi genetik tanaman karena tidak adanya dinding sel memungkinkan masuknya materi genetik secara efisien (Osmani et al., 2024). Beberapa pendekatan utama meliputi:

1. *PEG-mediated transfection*

Metode klasik yang menggunakan polietilen glikol (PEG) dan ion kalsium untuk meningkatkan permeabilitas membran, sehingga DNA atau RNA dapat masuk ke dalam protoplas. Teknik ini sederhana dan murah, namun sering bersifat non-spesifik (Mathur & Koncz, 1998).

2. Elektroporasi

Tegangan listrik tinggi digunakan untuk membuat pori sementara pada membran protoplas, yang memungkinkan molekul genetik masuk. Metode ini lebih terkontrol, memiliki frekuensi transformasi tinggi, dan relatif rendah sitotoksitas (Potter, 2003).

3. *CRISPR-Cas delivery*

Protoplas menjadi platform ideal untuk teknologi penyuntingan gen presisi, karena kompleks CRISPR-Cas9 (atau Cas varian lain) dapat langsung dikirimkan dalam bentuk DNA, RNA, atau protein. Hal ini memungkinkan modifikasi genetik tanpa integrasi transgen permanen (*transgene-free editing*), yang penting untuk regulasi dan penerimaan public (Yang et al., 2024b).

13.5 Diskusi dan Arah Masa Depan

Meskipun kultur dan fusi protoplas telah berkembang pesat, sejumlah hambatan teknis masih menjadi tantangan utama. Viabilitas protoplas pasca-isolasi sering menurun dengan cepat, dan efisiensi regenerasi tanaman utuh masih bergantung pada spesies serta kondisi kultur (Armita, 2020b). Selain itu, menurut Hamdan dan Tan (2025) fusi protoplas terkadang menghasilkan produk yang tidak stabil secara genetik, sehingga aplikasinya untuk pemuliaan memerlukan optimalisasi lebih lanjut.

Di sisi lain, prospek pengembangan teknologi ini sangat menjanjikan, terutama dengan integrasi metode modern. Pendekatan CRISPR-Cas memungkinkan penyuntingan gen presisi langsung pada protoplas (F. Chen et al., 2024), sementara teknologi omics (genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik) dapat mempercepat pemahaman mekanisme molekuler yang mendasari isolasi dan regenerasi (Yu et al., 2025). Lebih jauh lagi, berdasarkan Elayaperumal et al. (2025) penggunaan nanoteknologi dalam sistem penghantaran DNA/RNA menawarkan solusi untuk meningkatkan efisiensi transformasi dan mengurangi kerusakan seluler.

Dengan demikian, masa depan riset protoplas diarahkan pada peningkatan efisiensi regenerasi lintas spesies, pemanfaatan sistem *transgene-free genome editing*, serta aplikasi praktis dalam pemuliaan tanaman untuk menghadapi tantangan pertanian berkelanjutan. Integrasi inovasi teknologi modern diperkirakan akan menjadikan kultur dan fusi protoplas sebagai salah satu pilar utama bioteknologi tanaman di dekade mendatang.

DAFTAR PUSTAKA

- Adamu Ishaku, G., Kalum Abaka, A., Akram, M., & Shariful Islam, M. (2023). Article no.AJBGE.55804 Review Article Ishaku et al. In *Asian Journal of Biotechnology and Genetic Engineering* (Vol. 6, Issue 2). <https://www.sdiarticle5.com/review-history/55804>
- Ahmed, M. A. A., Miao, M., Pratsinakis, E. D., Zhang, H., Wang, W., Yuan, Y., Lyu, M., Iftikhar, J., Yousef, A. F., Madesis, P., & Wu, B. (2021a). Protoplast Isolation, Fusion, Culture and Transformation in the Woody Plant *Jasminum* spp. *Agriculture*, 11(8), 699. <https://doi.org/10.3390/agriculture11080699>
- Ahmed, M. A. A., Miao, M., Pratsinakis, E. D., Zhang, H., Wang, W., Yuan, Y., Lyu, M., Iftikhar, J., Yousef, A. F., Madesis, P., & Wu, B. (2021b). Protoplast Isolation, Fusion, Culture and Transformation in the Woody Plant *Jasminum* spp. *Agriculture*, 11(8), 699. <https://doi.org/10.3390/agriculture11080699>
- Ambavaram, M. M. R., Basu, S., Krishnan, A., Ramegowda, V., Batlang, U., Rahman, L., Baisakh, N., & Pereira, A. (2014). Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. *Nature Communications*, 5(1), 5302. <https://doi.org/10.1038/ncomms6302>
- Aoyagi, H. (2011). Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 56(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.05.004>
- Armita, D. (2020a). Plant Breeding Through Protoplast Fusion. *Jurnal Biologi UNAND*, 8(2), 42–47. <https://doi.org/10.25077/jbioua.8.2.42-47.2020>
- Armita, D. (2020b). Plant Breeding Through Protoplast Fusion. *Jurnal Biologi UNAND*, 8(2), 42–47. <https://doi.org/10.25077/jbioua.8.2.42-47.2020>
- Avila-Peltroche, J., Won, B. Y., & Cho, T. Oh. (2022). An improved protocol for protoplast production, culture, and whole plant regeneration of the commercial brown seaweed *Undaria*

- pinnatifida. *Algal Research*, 67, 102851.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102851>
- Begna, T. (2020). Review on Somatic Hybridization and Its Role in Crop Improvement. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. <https://doi.org/10.7176/JBAH/10-11-04>
- Bogdziewicz, L., Froeling, R., Schoppl, P., Juquel, J., Antoniadi, I., Skalický, V., Mathey, A., Fattaccioli, J., Sprakel, J., & Verger, S. (2025). *The Q-Warg Pipeline: A Robust and Versatile Workflow for Quantitative Analysis of Protoplast Culture Conditions*. <https://doi.org/10.1101/2025.03.05.641611>
- Carqueijeiro, I., Noronha, H., Bettencourt, S., Guedes, J. G., Duarte, P., Gerós, H., & Sottomayor, M. (2018). *Isolation of Vacuoles from the Leaves of the Medicinal Plant Catharanthus roseus* (pp. 81–99). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7856-4_7
- Chen, F., Chen, L., Yan, Z., Xu, J., Feng, L., He, N., Guo, M., Zhao, J., Chen, Z., Chen, H., Yao, G., & Liu, C. (2024). Recent advances of CRISPR-based genome editing for enhancing staple crops. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1478398>
- Chen, K., Chen, J., Pi, X., Huang, L.-J., & Li, N. (2023a). Isolation, Purification, and Application of Protoplasts and Transient Expression Systems in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 16892. <https://doi.org/10.3390/ijms242316892>
- Chen, K., Chen, J., Pi, X., Huang, L.-J., & Li, N. (2023b). Isolation, Purification, and Application of Protoplasts and Transient Expression Systems in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 16892. <https://doi.org/10.3390/ijms242316892>
- Elayaperumal, S., Sivamani, Y., Agarwal, P., & Srivastava, N. (2025). Plant-based nanotherapeutics: A new frontier in disease management and prevention. *Nano TransMed*, 4, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.ntm.2025.100086>
- Elazab, D., Lambardi, M., & Capuana, M. (2023). In Vitro Culture Studies for the Mitigation of Heavy Metal Stress in Plants. *Plants*, 12(19), 3387. <https://doi.org/10.3390/plants12193387>

- Fulzele, D. P., & Heble, M. R. (1994). Large-scale cultivation of *Catharanthus roseus* cells: Production of ajamalicine in a 20-l airlift bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 35(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90185-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90185-6)
- George, E. F. ., Hall, M. A. ., & Klerk, G.-J. de. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Springer.
- Hamdan, M. F., & Tan, B. C. (2025). Genetic modification techniques in plant breeding: A comparative review of CRISPR/Cas and GM technologies. *Horticultural Plant Journal*, 11(5), 1807–1829. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2024.02.012>
- He, W., Wang, B., Huang, M., Meng, C., Wu, J., Du, J., Song, B., & Chen, H. (2024). Screening for Resistance Resources against Bacterial Wilt in Wild Potato. *Plants*, 13(2), 220. <https://doi.org/10.3390/plants13020220>
- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50568>
- Jeong, Y. Y., Lee, H.-Y., Kim, S. W., Noh, Y.-S., & Seo, P. J. (2021). Optimization of protoplast regeneration in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*, 17(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00720-x>
- Jiang, W., Bush, J., & Sheen, J. (2021). A Versatile and Efficient Plant Protoplast Platform for Genome Editing by Cas9 RNPs. *Frontiers in Genome Editing*, 3. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.719190>
- Jogdand, S. N. . (2009). *Gene biotechnology*. Himalaya Pub. House.
- Klimek-Chodacka, M., Kadluczka, D., Lukasiewicz, A., Malec-Pala, A., Baranski, R., & Grzebelus, E. (2020). Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigella damascena* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143(3), 693–707. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01953-9>
- Král, D., Šenkyřík, J. B., & Ondřej, V. (2025). Early protoplast culture and partial regeneration in *Cannabis sativa*: gene expression dynamics of proliferation and stress response. *Frontiers in Plant Science*, 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1609413>

- Liu, J., Xu, X., & Deng, X. (2005). Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 19–44. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6015-0>
- Long, Y., Yang, Y., Pan, G., & Shen, Y. (2022). New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926752>
- Lu, H., Zhang, H., Wang, P., Chen, M., Liang, R., Tian, X., Yan, J., Zhan, Y., Xin, Y., & Zeng, F. (2025). Development of a xylem protoplast expression system for gene function analysis and genome editing in *Fraxinus mandshurica* Rupr. *Industrial Crops and Products*, 225, 120446. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120446>
- Marx, V. (2016). Plants: a tool box of cell-based assays. *Nature Methods*, 13(7), 551–554. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3900>
- Mathur, J., & Koncz, C. (1998). PEG-Mediated Protoplast Transformation with Naked DNA. In *Arabidopsis Protocols* (pp. 267–276). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-391-0:267>
- Muhammad, M., Waheed, A., Wahab, A., Majeed, M., Nazim, M., Liu, Y.-H., Li, L., & Li, W.-J. (2024). Soil salinity and drought tolerance: An evaluation of plant growth, productivity, microbial diversity, and amelioration strategies. *Plant Stress*, 11, 100319. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100319>
- Mukundan, N. S., Satyamoorthy, K., & Babu, V. S. (2025). Advancing plant protoplasts: innovative techniques and future prospects. *Plant Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11816-025-00957-1>
- Naing, A. H., Adedeji, O. S., & Kim, C. K. (2021). Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement. *Scientia Horticulturae*, 283, 110043. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110043>
- Narayanaswamy, S. . (1994). *Plant cell and tissue culture*. Tata McGraw-Hill Pub. Co.
- Osmani, Z., Wang, L., Xiao, W., & Kulka, M. (2024). Nanomaterials as tools in plant transformation: A protoplast-centric

- perspective. *Plant Nano Biology*, 10, 100100.
<https://doi.org/10.1016/j.plana.2024.100100>
- Ovcharenko, O. O., Rudas, V. A., & Kuchuk, M. V. (2023). Protoplast Fusion for Cellular Engineering of the Brassicaceae. *Cytology and Genetics*, 57(5), 432–450.
<https://doi.org/10.3103/S0095452723050043>
- Ozjofofor, U. O. (2017). Protoplast fusion technology and its application in genetic improvement of plants: A review. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 1(2), 45–52.
<https://doi.org/10.33545/26174693.2017.v1.i2a.116>
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., Cabi, E., & Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555>
- Pasha, F. A., Cho, S. J., Beg, Y., & Tripathi, Y. B. (2007). Quantum chemical QSAR study of flavones and their radical-scavenging activity. *Medicinal Chemistry Research*, 16(7–9), 408–417.
<https://doi.org/10.1007/s00044-007-9060-5>
- Peberdy, J. F. (1980). Protoplast fusion — a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(1), 23–29.
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(80\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(80)90004-6)
- PENG, Z., TONG, H.-R., LIANG, G.-L., SHI, Y.-Q., & YUAN, L.-Y. (2018). Protoplast Isolation and Fusion Induced by PEG with Leaves and Roots of Tea Plant (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze). *Acta Agronomica Sinica*, 44(3), 463.
<https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2018.00463>
- Potter, H. (2003). Transfection by Electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*, 62(1).
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62>
- Prabavathy, V. R., Mathivanan, N., Sagadevan, E., Murugesan, K., & Lalithakumari, D. (2006). Intra-strain protoplast fusion enhances carboxymethyl cellulase activity in *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 719–723.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.022>

- Ranaware, A. S., Kunchge, N. S., Lele, S. S., & Ochatt, S. J. (2023). Protoplast Technology and Somatic Hybridisation in the Family Apiaceae. *Plants*, 12(5), 1060. <https://doi.org/10.3390/plants12051060>
- Reed, K. M., & Bargmann, B. O. R. (2021). Protoplast Regeneration and Its Use in New Plant Breeding Technologies. *Frontiers in Genome Editing*, 3. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.734951>
- Romero-Muñoz, M., & Pérez-Jiménez, M. (2024). Optimizing Brassica oleracea L. Breeding Through Somatic Hybridization Using Cytoplasmic Male Sterility (CMS) Lines: From Protoplast Isolation to Plantlet Regeneration. *Plants*, 13(22), 3247. <https://doi.org/10.3390/plants13223247>
- Saran, S., Prem, B., & Dantu, K. (2012). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*.
- Thorpe, T. (2012). *History of Plant Tissue Culture* (pp. 9–27). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_2
- Verma, N., Bansal, M. C., & Kumar, V. (2008). *Protoplast Fusion Technology and Its Biotechnological Applications*.
- Wang, J., Jiang, J., & Wang, Y. (2013). Protoplast fusion for crop improvement and breeding in China. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112(2), 131–142. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0221-y>
- Wijerathna-Yapa, A., & Hiti-Bandaralage, J. (2023). Tissue Culture—A Sustainable Approach to Explore Plant Stresses. *Life*, 13(3), 780. <https://doi.org/10.3390/life13030780>
- Yadav, S., Sharma, A., Nayik, G. A., Cooper, R., Bhardwaj, G., Sohal, H. S., Mutreja, V., Kaur, R., Areche, F. O., AlOudat, M., Shaikh, A. M., Kovács, B., & Mohamed Ahmed, A. E. (2022). Review of Shikonin and Derivatives: Isolation, Chemistry, Biosynthesis, Pharmacology and Toxicology. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.905755>
- Yang, S. H., Kim, S. W., Lee, S., & Koo, Y. (2024a). Optimized protocols for protoplast isolation, transfection, and regeneration in the Solanum genus for the CRISPR/Cas-mediated transgene-free genome editing. *Applied Biological Chemistry*, 67(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13765-024-00870-1>

- Yang, S. H., Kim, S. W., Lee, S., & Koo, Y. (2024b). Optimized protocols for protoplast isolation, transfection, and regeneration in the *Solanum* genus for the CRISPR/Cas-mediated transgene-free genome editing. *Applied Biological Chemistry*, 67(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13765-024-00870-1>
- Yao, L., Liao, X., Gan, Z., Peng, X., Wang, P., Li, S., & Li, T. (2016). Protoplast isolation and development of a transient expression system for sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 209, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.003>
- Yu, T., Ma, X., Zhang, J., Cao, S., Li, W., Yang, G., & He, C. (2025). Progress in Transcriptomics and Metabolomics in Plant Responses to Abiotic Stresses. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(6), 421. <https://doi.org/10.3390/cimb47060421>
- Yue, J.-J., Yuan, J.-L., Wu, F.-H., Yuan, Y.-H., Cheng, Q.-W., Hsu, C.-T., & Lin, C.-S. (2021). Protoplasts: From Isolation to CRISPR/Cas Genome Editing Application. *Frontiers in Genome Editing*, 3. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.717017>

BAB 14

PEMANFAATAN KULTUR JARINGAN DALAM REKAYASA GENETIK TUMBUHAN

Oleh Yuke Mareta Ariesta Sandra

14.1 Kultur Jaringan sebagai Fondasi Revolusi Rekayasa Genetika Tumbuhan

Peningkatan jumlah populasi dunia menjadi tantangan besar bagi ketahanan pangan global pada abad ke-21. Populasi dunia yang diproyeksikan mencapai 9,7 miliar jiwa pada tahun 2050 membutuhkan peningkatan produksi pangan hingga 60-70% (United Nations, 2022). Peningkatan ini harus dicapai di tengah menyusutnya lahan pertanian subur, tekanan perubahan iklim yang memicu kekeringan dan banjir, serta serangan hama dan penyakit yang semakin resisten. Paradigma pertanian konvensional saja tidak lagi cukup untuk menjawab kompleksitas tantangan ini. Di sinilah bioteknologi tumbuhan, khususnya rekayasa genetika, muncul sebagai salah satu pilar harapan untuk melakukan lompatan inovasi.

Rekayasa genetika tumbuhan memungkinkan para ilmuwan untuk memperkenalkan sifat-sifat baru yang diinginkan—seperti ketahanan terhadap hama, toleransi terhadap cekaman abiotik (kekeringan, salinitas), atau peningkatan nilai gizi—secara presisi dan dalam waktu yang relatif lebih cepat dibandingkan pemuliaan konvensional. Namun, sebuah pertanyaan mendasar muncul: bagaimana mungkin sebuah gen asing dimasukkan ke dalam satu sel tumbuhan dan sel tersebut kemudian dapat berkembang menjadi sebuah tanaman utuh yang memiliki sifat baru tersebut dan dapat diwariskan ke keturunannya?

Teknik kultur jaringan menjadi jawaban dari pertanyaan tersebut. Teknik kultur jaringan tumbuhan telah berkembang sebelum rekayasa genetika itu sendiri matang. Prinsip dasar pada

kultur jaringan yaitu memanfaatkan prinsip **totipotensi**. Totipotensi merupakan kemampuan sebuah sel tumbuhan untuk berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap. Berdasarkan hal tersebut, teknik kultur jaringan menyediakan platform yang absolut dan indispensable bagi seluruh proses rekayasa genetika tumbuhan. Kultur jaringan bukan hanya sebagai alat bantu; ia adalah fondasi, tahapan kritis, dan jembatan yang menghubungkan manipulasi genetik di tingkat sel menjadi kenyataan di tingkat tanaman.

Bab ini akan membahas hubungan simbiosis antara kultur jaringan dan rekayasa genetika. Bab ini juga akan membahas dan menjelajahi tantangan pertanian global yang mendorong perlunya inovasi, menguraikan prinsip dasar totipotensi, menelusuri konvergensi historis kedua bidang ini, dan akhirnya, memetakan peran sentral kultur jaringan dalam setiap tahapan penciptaan tanaman transgenik.

14.1.1 Konvergensi Historis: Ketika Dua Bidang Ilmu Bertemu

Perkembangan kultur jaringan dan rekayasa genetika berjalan dalam garis waktu yang saling terkait. Teknik kultur jaringan mulai membuahkan hasil praktis beberapa dekade sebelum teknik rekayasa genetika ditemukan.

Tonggak sejarah penting dimulai dengan keberhasilan Philip White dan Roger Gautheret yang pada tahun 1939 berhasil menumbuhkan kalus secara terus-menerus dari jaringan kambium tembakau dan willow (Gautheret, 1939; White, American and Feb, 2013). Namun, tonggak paling dramatis adalah keberhasilan F.C. Steward dari Cornell University pada tahun 1958 yang membuktikan konsep totipotensi secara definitif. Ia berhasil meregenerasikan tanaman wortel utuh yang mampu berbunga dan berbuah dari sebuah sel tunggal yang diisolasi dari akar wortel yang sudah berdiferensiasi (Steward, Mapes and Mears, 1980). Eksperimen ini membuka pintu bagi segala kemungkinan manipulasi sel tumbuhan.

Pada saat yang hampir bersamaan, ilmu di balik rekayasa genetika mulai terbentuk. Penemuan struktur DNA double helix oleh Watson dan Crick pada tahun 1953 memberikan pemahaman dasar tentang materi genetik. Enzim restriksi dan ligase, yang merupakan "gunting dan lem" genetik, ditemukan

pada tahun 1970-an. Vektor plasmid pertama untuk kloning gen dikembangkan pada periode yang sama.

Puncak dari konvergensi ini terjadi pada awal 1980-an. Pada tahun 1983, tiga tim penelitian secara independen—Monsanto Company (Amerika Serikat), Ghent University (Belgia), dan Washington University (Amerika Serikat)—melaporkan keberhasilan pertama dalam menciptakan tanaman transgenik menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor untuk mentransfer gen asing ke dalam tanaman tembakau dan kemudian meregenerasinya menggunakan teknik kultur jaringan (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983). Keberhasilan ini menandai kelahiran era bioteknologi tumbuhan modern dan membuktikan secara definitif bahwa kultur jaringan adalah komponen yang tidak terpisahkan dari proses tersebut.

14.1.2 Peta Perjalanan: Peran Kultur Jaringan dalam Siklus Rekayasa Genetika

Untuk memahami betapa integratifnya peran kultur jaringan, kita dapat memetakan perannya dalam setiap langkah kritis siklus rekayasa genetika tumbuhan:

- 1. Penyediaan Target Transformasi:** Kultur jaringan menyediakan materi biologis yang optimal untuk introduksi gen. Ini bisa berupa:
 - a. **Jaringan yang mudah ditransformasi oleh *Agrobacterium***, seperti daun *in vitro* yang dipotong-potong (eksplan).
 - b. **Kalus** yang sedang dalam fase pertumbuhan aktif, ideal untuk transformasi dengan metode biolistik.
 - c. **Protoplas** (sel tanpa dinding sel), yang memungkinkan masuknya DNA secara langsung melalui elektroporasi atau PEG.
- 2. Seleksi Transforman:** Setelah DNA asing diperkenalkan, hanya sebagian kecil sel yang berhasil mengintegrasikannya ke dalam genomnya. Di sinilah kultur jaringan kembali memainkan peran kritis. Media kultur ditambahkan dengan agen selektif (biasanya antibiotik atau herbisida). Hanya sel-sel yang telah berhasil ditransformasi dan mengekspresikan gen penanda ketahanan yang akan bertahan dan terus tumbuh, sementara sel-sel liar (non-transgenik) akan mati.

Proses seleksi ini hanya mungkin dilakukan dalam kondisi *in vitro* yang terkendali.

3. **Regenerasi Tanaman Utuh:** Langkah ini adalah aktualisasi dari totipotensi. Sel atau kalus yang telah terseleksi kemudian dipindahkan ke media regenerasi dengan komposisi hormon yang dioptimalkan untuk mendorong pembentukan tunas, akar, atau embrio somatik. Setelah plantlet (tanaman kecil) terbentuk, ia akan diaklimatisasi secara bertahap dari kondisi *in vitro* yang steril ke kondisi *ex vitro* di rumah kaca.
4. **Konfirmasi dan Multiplikasi:** Tanaman yang diregenerasi kemudian diuji secara molekuler (misalnya, dengan PCR atau Southern blot) untuk memastikan integrasi dan ekspresi gen yang diinginkan. Selanjutnya, teknik kultur jaringan lagi-lagi dapat digunakan untuk memperbanyak tanaman transgenik yang telah terkonfirmasi dalam jumlah besar secara klonal (seragam) melalui mikropropagasi.

14.1.3 Tujuan dan Ruang Lingkup Bab

Tujuan dari bab ini adalah untuk memberikan pemahaman yang mendalam, komprehensif, dan aplikatif tentang bagaimana teknik kultur jaringan tidak hanya menjadi prasyarat tetapi juga menjadi penggerak utama yang memungkinkan keberhasilan rekayasa genetika tumbuhan. Pembahasan akan mencakup:

1. **Metode-metode transformasi genetik** (*Agrobacterium-mediated*, biolistik, dll.) dan jenis kultur jaringan yang menjadi targetnya.
2. **Strategi seleksi dan regenerasi** yang efisien untuk mendapatkan tanaman transgenik.
3. **Teknik analisis konfirmasi** di tingkat molekuler.
4. **Aplikasi-aplikasi terkini** dalam perbaikan sifat tanaman dan produksi senyawa biofarmasi.
5. **Tantangan teknis dan etika** yang dihadapi, serta prospek masa depan dengan teknologi seperti pengeditan gen CRISPR-Cas.

Dengan menjelajahi topik-topik ini, pembaca akan diajak untuk menghargai kompleksitas dan keindahan dari integrasi kedua

disiplin ilmu ini—sebuah integrasi yang telah merevolusi cara kita dalam memodifikasi dan memperbaiki tanaman untuk masa depan umat manusia.

14.2 Dasar-Dasar Kultur Jaringan yang Relevan untuk Transformasi Genetik

14.2.1 Platform yang Tak Tergantikan

Keberhasilan transformasi genetik pada tumbuhan tidak hanya bergantung pada kemampuan memasukkan gen asing ke dalam sel, tetapi yang lebih krusial adalah kemampuan **meregenerasi** sebuah tanaman utuh yang *viable* dan fertil dari sel tunggal yang telah dimodifikasi tersebut. Proses regenerasi inilah yang sepenuhnya bergantung pada teknik dan prinsip dasar kultur jaringan. Kultur jaringan menyediakan lingkungan yang terkendali, steril, dan dapat dimanipulasi untuk memanipulasi nasib sel tumbuhan, menjadikannya platform yang absolut dan tak tergantikan dalam rekayasa genetika. Pokok bahasan ini akan menguraikan fondasi biologis dan teknis dari kultur jaringan yang menjadi tulang punggung bagi seluruh proses transformasi genetik, mulai dari konsep totipotensi, jenis-jenis kultur yang kritis, hingga komponen media yang esensial.

14.2.2 Totipotensi: Landasan Teoretis Utama

Konsep totipotensi, yang pertama kali dihipotesiskan oleh ilmuwan Jerman Gottlieb Haberlandt pada tahun 1902, merupakan landasan teoretis paling fundamental yang mendasari baik kultur jaringan maupun rekayasa genetika tumbuhan. Haberlandt berpendapat bahwa karena setiap sel tanaman berasal dari pembelahan sel zigotik tunggal, maka setiap sel harus mengandung informasi genetik lengkap yang diperlukan untuk membentuk seluruh bagian tanaman (Haberlandt, 1902). Meskipun pada saat itu teknologinya belum memadai untuk membuktikan hipotesisnya, visinya terbukti benar.

Totipotensi didefinisikan sebagai kapasitas lengkap sebuah sel somatik untuk mengekspresikan seluruh potensi genetiknya, membelah, dan berdiferensiasi menjadi semua jenis sel yang terspesialisasi, dan akhirnya meregenerasi sebuah

organisme yang lengkap dan fungsional (George et al., 2008). Dalam konteks transformasi genetik, ini berarti bahwa memodifikasi satu sel saja sudah cukup. Asalkan sel tersebut dapat diinduksi untuk mengaktifkan kembali program totipotensinya, kita pada dasarnya dapat menciptakan seluruh tanaman yang membawa transgen yang diinginkan. Keberhasilan praktis totipotensi pertama kali didemonstrasikan oleh F.C. Steward dan koleganya pada tahun 1958, di mana mereka meregenerasikan tanaman wortel utuh dari sel tunggal yang diisolasi dari akar wortel yang sudah matang (fase dewasa) (Steward, Mapes and Mears, 1980). Eksperimen landmark ini membuka pintu bagi segala bentuk manipulasi genetika pada tingkat sel.

Proses aktualisasi totipotensi ini terjadi dalam kondisi *in vitro* yang sangat terkendali. Sel atau jaringan tumbuhan (disebut sebagai eksplan) ditumbuhkan pada media buatan yang kaya nutrisi dan mengandung hormon tumbuhan (auksin dan sitokinin) dalam rasio yang spesifik. Manipulasi hormonal inilah yang mengarahkan nasib sel:

1. **Rasio auksin/sitokinin tinggi** biasanya mendorong pembentukan **kalus**, yaitu massa sel yang tidak terdiferensiasi.
2. **Rasio sitokinin/auksin tinggi** mendorong pembentukan tunas (**organogenesis**).
3. **Rasio auksin tinggi tertentu** dapat memicu pembentukan embrio somatik (**embriogenesis somatik**), yang menyerupai embrio zigotik tetapi berasal dari sel somatik.

Pemahaman dan penguasaan terhadap kontrol diferensiasi sel inilah yang menjadi kunci sukses. Setelah sebuah sel berhasil ditransformasi secara genetik, ilmuwan harus dapat "membujuk" sel tersebut untuk berkembang mengikuti jalur organogenesis atau embriogenesis somatik untuk akhirnya menghasilkan tanaman transgenik utuh. Tanpa kemampuan untuk meregenerasi tanaman utuh dari sel tunggal, rekayasa genetika akan berhenti pada level sel dan tidak akan memiliki aplikasi praktis dalam pertanian.

14.2.3 Jenis-Jenis Kultur yang Kritis dalam Transformasi Genetik

Tidak semua jenis kultur jaringan relevan untuk transformasi genetik. Jenis yang dipilih sangat bergantung pada metode transformasi dan spesies target. Berikut adalah jenis-jenis kultur yang paling penting:

1. Kultur Kalus

Kalus adalah massa sel yang tidak terdiferensiasi dan tidak terorganisir, yang terbentuk sebagai respons terhadap luka atau stimulus hormonal dalam kondisi *in vitro*.

- a. **Peran dalam Transformasi:** Kalus merupakan target yang sangat umum, terutama untuk metode **biolistik** (particle bombardment). Butiran emas atau tungsten yang dilapisi DNA dapat ditembakkan langsung ke dalam sel-sel kalus yang sedang aktif membelah. Kalus juga sering digunakan dalam transformasi *mediated-Agrobacterium* untuk spesies tertentu.
- b. **Keuntungan:** Mudah diproduksi, dapat diperbanyak dalam jumlah besar, dan terdiri dari sel-sel yang aktif membelah yang lebih kompeten untuk mengambil DNA asing.
- c. **Tantangan:** Kalus rentan terhadap variasi somaklonal (perubahan genetik yang tidak diinginkan selama kultur), dan kemampuannya untuk beregenerasi dapat menurun seiring waktu.

2. Kultur Suspensi Sel

Ini adalah kultur sel-sel yang terpisah-pisah atau agregat sel kecil yang tumbuh tersuspensi dalam media cair yang terus diaduk.

- a. **Peran dalam Transformasi:** Sangat ideal untuk transformasi yang membutuhkan akses yang seragam ke sel, seperti **elektroporasi** atau treatment dengan **Polyethylene Glycol (PEG)**. Sel-sel dalam suspensi juga dapat digunakan untuk biolistik.
- b. **Keuntungan:** Pertumbuhan yang cepat dan seragam, lingkungan yang homogen untuk seleksi, dan mudah diskalakan ke volume besar dalam bioreaktor.

- c. **Tantangan:** Membangun garis suspensi sel yang stabil dan embryogenic bisa jadi sulit dan memakan waktu untuk banyak spesies.

3. Protoplas

Protoplas adalah sel tumbuhan yang telah dihilangkan dinding selnya melalui perlakuan enzimatis (misalnya, *selulase* dan *pectinase*).

- a. **Peran dalam Transformasi:** Protoplas adalah sistem yang sangat powerful karena tanpa dinding sel, membran plasma menjadi langsung terekspos. Ini memungkinkan metode transformasi langsung seperti:
 - 1) **Transformasi *mediated*-PEG:** PEG membantu DNA menembus membran sel.
 - 2) **Elektroporasi:** Sengatan listrik tegangan tinggi menciptakan pori-pori sementara di membran.
 - 3) **Fusi Protoplas:** Memadukan protoplas dari dua spesies berbeda untuk menciptakan hibrid somatik.
- b. **Keuntungan:** Efisiensi transformasi yang tinggi untuk sistem yang responsif, memungkinkan transfer organel, dan berguna untuk studi transport membran.
- c. **Tantangan:** Sangat rapuh, membutuhkan kondisi kultur yang sangat hati-hati, dan regenerasi tanaman utuh dari protoplas sangat sulit untuk banyak spesies (kecuali seperti tembakau dan beberapa spesies *Solanaceae*).

4. Eksplan Organ

Eksplan adalah potongan kecil jaringan atau organ tanaman (daun, hipokotil, akar, batang) yang ditempatkan dalam media kultur.

- a. **Peran dalam Transformasi:** Ini adalah sistem yang paling umum untuk **transformasi *mediated-Agrobacterium tumefaciens***. Bakteri *Agrobacterium* menginfeksi luka pada eksplan, mentransfer T-DNA ke dalam sel-sel yang berada di tepi luka. Eksplan ini kemudian dapat langsung diregenerasi melalui organogenesis atau embriogenesis somatik tanpa melalui fase kalus yang panjang (*direct organogenesis*).

- b. **Keuntungan:** Relatif mudah dan cepat, meminimalkan variasi somaklonal, dan merupakan metode pilihan untuk banyak tanaman dikotil.
- c. **Tantangan:** Efisiensi dapat bervariasi tergantung jenis eksplan, usia, dan genotipe.

14.2.4 Diferensiasi dan Regenerasi: Organogenesis vs. Embriogenesis Somatik

Setelah sel berhasil ditransformasi, langkah selanjutnya adalah mendorongnya untuk berkembang menjadi tanaman utuh. Dua jalur regenerasi utama adalah:

1. Organogenesis

Proses pembentukan organ (tunas atau akar) secara adventif langsung dari sebuah sel atau jaringan, tanpa melalui fase embrio.

- a. **Mekanisme:** Dikendalikan oleh rasio hormon auksin dan sitokinin dalam media. Rasio sitokinin yang tinggi mendorong pembentukan **tunas adventif**, sedangkan rasio auksin yang tinggi mendorong pembentukan **akar adventif**.
- b. **Aplikasi:** Sangat umum dalam transformasi *Agrobacterium* menggunakan eksplan. Tunas adventif yang terbentuk dari sel yang ditransformasi kemudian diinduksi untuk berakar.
- c. **Kekurangan:** Seringkali menghasilkan tanaman dengan akar tunggang yang lemah dan terkadang dapat menyebabkan chimerisme (hanya sebagian tanaman yang transgenik).

2. Embriogenesis Somatik

Proses pembentukan embrio dari sel somatik (bukan dari zigot). Embrio somatik ini melewati tahapan perkembangan yang mirip dengan embrio zigotik (*globular, heart-shaped, torpedo, cotyledonary*).

- a. **Mekanisme:** Dipicu oleh auksin dalam konsentrasi tinggi (seperti 2,4-D) dan stres fisiologis. Sel-sel embryogenic membelah dan membentuk struktur yang menyerupai embrio.

- b. **Aplikasi:** Jalur yang sangat disukai untuk transformasi karena **setiap embrio somatik berasal dari satu sel**. Ini sangat mengurangi kemungkinan chimerisme. Embrio somatik juga mudah dikonversi menjadi plantlet dan dapat digunakan untuk produksi biji buatan (*synthetic seeds*).
- c. **Kekurangan:** Induksi dan pemeliharaan garis embryogenic yang stabil bisa jadi sulit untuk banyak genotipe.

14.2.5 Komponen Media Kultur yang Esensial

Keberhasilan kultur dan regenerasi sangat bergantung pada komposisi media. Media kultur yang dirancang oleh Murashige dan Skoog (1962) masih menjadi formulasi dasar yang paling banyak digunakan hingga saat ini. Komponen-komponen kuncinya adalah:

1. **Makro dan Mikronutrien:** Menyediakan unsur hara esensial seperti nitrogen, kalium, kalsium, magnesium, fosfor, serta besi, mangan, seng, dll., untuk pertumbuhan sel.
2. **Vitamin:** Seperti myo-inositol, thiamine (B1), nicotinic acid, dan pyridoxine (B6), yang berperan sebagai kofaktor enzim.
3. **Sumber Karbon: Sukrosa** adalah sumber karbon dan energi yang paling umum, karena sel-sel *in vitro* tidak dapat berfotosintesis secara efisien.
4. **Zat Pengatur Tumbuh (Hormon):** Ini adalah komponen **paling kritis** untuk mengontrol diferensiasi dan regenerasi.
 - a. **Auksin:** Seperti 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Indole-3-acetic acid (IAA), dan Naphthaleneacetic acid (NAA). Berperan dalam induksi pembelahan sel, pembentukan kalus, dan embriogenesis somatik.
 - b. **Sitokinin:** Seperti Benzylaminopurine (BAP), Kinetin, dan Zeatin. Berperan dalam pembelahan sel, pembentukan tunas adventif, dan menghambat dominansi apikal.
5. **Agen Pemat:** **Agar** adalah agen pemat yang paling umum digunakan untuk membuat media padat. Ini menciptakan platform fisik untuk pertumbuhan jaringan dan memudahkan dalam penanganan.

6. **Agen Seleksi:** Setelah transformasi, antibiotik (seperti *kanamycin*, *hygromycin*) atau herbisida (seperti *phosphinothricin/glufosinate*) ditambahkan ke media untuk **menyeleksi** sel-sel yang telah berhasil mengintegrasikan dan mengekspresikan gen penanda ketahanan.

Dasar-dasar kultur jaringan membentuk kerangka kerja operasional yang memungkinkan rekayasa genetika tumbuhan menjadi kenyataan. Pemahaman mendalam tentang totipotensi, pemilihan jenis kultur yang tepat (kalus, suspensi, protoplas, atau eksplan), penguasaan jalur regenerasi (organogenesis dan embriogenesis somatik), serta formulasi media kultur yang optimal merupakan prasyarat mutlak untuk keberhasilan setiap proyek transformasi genetik. Tanpa platform yang diberikan oleh kultur jaringan, DNA asing hanyalah molekul yang tidak berguna di dalam sebuah sel yang tidak dapat berkembang. Dengan platform ini, sel tunggal yang dimodifikasi tersebut.

14.3 Metode-Metode Introduksi Gen (Transformasi Genetik) pada Tumbuhan

Transformasi genetik tumbuhan didefinisikan sebagai proses integrasi gen asing (transgen) yang stabil dan diwariskan ke dalam genom tanaman inang, sehingga mengakibatkan ekspresi sifat baru pada tanaman tersebut dan keturunannya. Keberhasilan proses ini bergantung pada dua kemampuan kunci: (1) kemampuan untuk memperkenalkan DNA asing ke dalam sel tanaman, dan (2) kemampuan untuk meregenerasi tanaman utuh dari sel yang berhasil ditransformasi tersebut, yang sangat bergantung pada teknik kultur jaringan (Slater et al., 2008). Selama beberapa dekade, berbagai metode telah dikembangkan untuk mengatasi hambatan alami tanaman, terutama dinding sel, yang menjadi penghalang fisik utama untuk masuknya molekul DNA. Metode-metode ini secara garis besar dapat dikategorikan menjadi dua kelompok: **metode biologis** yang memanfaatkan vektor biologis seperti *Agrobacterium*, dan **metode fisik/kimia** yang memanfaatkan kekuatan fisik atau senyawa kimia untuk melakukan transfer gen (Purwantoro et al., 2022)

14.3.1 Metode Biologis: Transformasi *mediated-Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens adalah bakteri tanah gram-negatif yang secara alami memiliki kemampuan mentransfer sebagian dari DNA-nya ke dalam genom tanaman inang, yang menyebabkan penyakit crown gall. Kemampuan alami inilah yang dimanfaatkan dan dimodifikasi untuk keperluan transformasi genetik.

1. Mekanisme Dasar

Mekanisme transformasi melibatkan beberapa komponen kunci pada plasmid Ti (Tumor-inducing) milik bakteri:

- a. **T-DNA (Transferred-DNA):** Bagian dari plasmid Ti yang akan dipindahkan dan diintegrasikan ke dalam genom tanaman.
- b. **Gen *vir* (virulence genes):** Gen yang mengatur proses pemotongan T-DNA dari plasmid dan transfernya ke sel tanaman. Gen *vir* diinduksi oleh senyawa fenolik (seperti asetosiringon) yang dikeluarkan oleh tanaman yang terluka (Gelvin, 2003).
- c. **Protein *vir*:** Berperan dalam menyalin, memotong, dan mengangkut T-DNA menuju nukleus sel tanaman.

Dalam rekayasa, gen penyebab tumor pada T-DNA asli digantikan oleh gen yang diinginkan (gen-of-interest/GOI) dan gen penanda seleksi (marker gene), sehingga menciptakan plasmid 'disarmed' yang tidak lagi menyebabkan penyakit.

2. Prosedur dan Aplikasi

Prosedurnya melibatkan inkubasi jaringan tanaman (eksplan) seperti daun, batang, atau akar, dengan kultur *Agrobacterium* yang membawa plasmid rekombinan. Setelah ko-kultivasi, eksplan diletakkan pada media yang mengandung antibiotik untuk membunuh bakteri dan agen seleksi (mis., kanamisin) untuk menyeleksi sel tanaman yang telah berhasil ditransformasi. Tanaman kemudian diregenerasi dari sel-sel tersebut.

3. Kelebihan dan Kekurangan

- a. **Kelebihan:** (1) Transfer DNA dengan efisiensi yang relatif tinggi; (2) Biasanya menghasilkan insersi

transgen yang utuh dan copy number rendah, yang mengurangi risiko silencing gen; (3) Dapat transfer fragmen DNA yang besar; (4) Relatif murah (Lacroix & Citovsky, 2019).

- b. **Kekurangan:** (1) Spesifisitas inang—awalnya hanya efektif untuk dikotil, meskipun strain super-virulen dan pretreatment telah mengembangkan aplikasinya pada monokotil; (2) Potensi integrasi yang kompleks; (3) Kontaminasi bakteri yang persisten dapat menjadi masalah.

14.3.2 Metode Fisik/Kimia: Transformasi Langsung

Metode ini dirancang untuk mentransfer DNA secara langsung ke dalam sel tanaman dengan melibatkan perlakuan fisik atau kimia untuk melintasi penghalang dinding sel.

1. Biolistik (Particle Bombardment)

Dikenal juga sebagai *gene gun*, metode ini melibatkan penembakan partikel mikroskopis (biasanya emas atau tungsten) yang dilapisi DNA ke dalam sel atau jaringan tanaman target dengan kecepatan tinggi menggunakan tekanan helium (Sanford, 2000).

- a. **Aplikasi:** Sangat serbaguna dan **tidak bergantung pada spesies**, sehingga menjadi pilihan utama untuk transformasi tanaman sereal (padi, gandum, jagung) dan spesies yang sulit ditransformasi dengan *Agrobacterium*.
- b. **Kelebihan:** Bebas dari batasan inang, dapat mentransfer DNA ke dalam organel seperti kloroplas dan mitokondria.
- c. **Kekurangan:** (1) Cenderung menghasilkan insersi transgen yang kompleks (multiple copy number dan rearrangements), yang dapat menyebabkan instabilitas dan silencing gen; (2) Memerlukan peralatan yang mahal; (3) Dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang signifikan.

2. Transformasi Protoplas

Protoplas (sel tanpa dinding sel) sangat rentan terhadap masuknya DNA asing. Dua metode utama adalah:

- a. **Transformasi *mediated*-Polyethylene Glycol (PEG):** PEG menyebabkan destabilisasi membran plasma protoplas, memungkinkan DNA untuk masuk (Rasmussen & Rasmussen, 2022).
- b. **Elektroporasi:** Sengatan listrik tegangan tinggi diberikan kepada suspensi protoplas, yang menciptakan pori-pori sementara di membran plasma sehingga DNA dapat berdifusi masuk.
- c. **Kelebihan:** Menghasilkan efisiensi transformasi yang tinggi dan cocok untuk studi transien.
- d. **Kekurangan:** Regenerasi tanaman utuh dari protoplas sangat sulit dan memakan waktu untuk banyak spesies, membatasi aplikasi praktisnya.

3. Metode Lainnya

- a. **Elektroporasi Jaringan:** Diterapkan pada jaringan yang dilukai, bukan protoplas, untuk menghindari kesulitan regenerasi.
- b. **Sonoporation:** Menggunakan gelombang ultrasonik untuk menciptakan pori-pori di membran sel.
- c. **Microinjection:** Menyuntikkan DNA langsung ke dalam sel menggunakan jarum mikropipet yang sangat halus. Sangat presisi tetapi memakan waktu dan memerlukan keahlian teknis yang tinggi.

14.3.3 Pemilihan Metode yang Tepat

Pemilihan metode transformasi bergantung pada beberapa faktor:

1. **Spesies Tanaman:** *Agrobacterium* adalah pilihan pertama untuk dikotil dan semakin banyak monokotil. Biolistik adalah pilihan untuk spesies yang recalcitrant.
2. **Sifat Transgen yang Diinginkan:** Jika integrasi transgen yang sederhana dan stabil diperlukan (mis., untuk pelepasan komersial), *Agrobacterium* lebih disukai. Untuk transformasi organel atau studi ekspresi gen transien, biolistik atau protoplas mungkin lebih baik.
3. **Sumber Daya dan Keahlian:** *Agrobacterium* umumnya lebih murah dan lebih mudah dilakukan di laboratorium dengan

infrastruktur dasar, sementara biolistik memerlukan investasi peralatan yang signifikan.

Perkembangan berbagai metode introduksi gen telah menjadi pendorong utama kemajuan dalam rekayasa genetika tumbuhan. **Transformasi *mediated-Agrobacterium*** tetap menjadi metode pilihan untuk banyak aplikasi karena efisiensi dan sifat insersi transgennya yang lebih dapat diprediksi. Namun, **metode biolistik** dan lainnya memberikan alat yang sangat berharga untuk tanaman yang tidak dapat ditransformasi oleh *Agrobacterium*, menunjukkan bahwa tidak ada satu metode pun yang universal untuk semua tujuan. Pemilihan metode harus didasarkan pada pertimbangan yang cermat terhadap tanaman target, tujuan penelitian, dan sumber daya yang tersedia. Inovasi terus berlanjut, dengan fokus pada pengembangan metode yang lebih presisi, efisien, dan bebas penanda (marker-free) untuk memenuhi standar regulasi dan keamanan hayati yang ketat.

14.4 Peran Kultur Jaringan dalam Seleksi dan Regenerasi Tanaman Transgenik

14.4.1 Jembatan Antara Sel dan Tanaman Utuh

Keberhasilan introduksi DNA asing ke dalam sel tumbuhan hanyalah langkah pertama dalam proses rekayasa genetika yang panjang dan kompleks. Sel-sel yang berhasil ditransformasi seringkali hanya merupakan sebagian kecil dari populasi sel, bercampur dengan mayoritas sel yang tidak tertransformasi. Selain itu, sel tunggal yang mengandung transgen ini harus berkembang menjadi tanaman utuh yang viable dan fertil. Proses seleksi dan regenerasi inilah yang sepenuhnya bergantung dan hanya dapat dilakukan dalam platform kultur jaringan. Kultur jaringan menyediakan lingkungan yang terkendali, steril, dan selektif untuk mengidentifikasi, memperbanyak, dan meregenerasi sel-sel transgenik yang diinginkan, sekaligus menyingkirkan sel-sel liar (non-transgenik). Tanpa tahapan kritis ini, identifikasi dan memperbanyak tanaman transgenik akan mustahil dilakukan (Miki & McHugh, 2004). Bab ini akan menguraikan peran sentral kultur

jaringan dalam proses seleksi menggunakan penanda genetik dan dalam merealisasikan prinsip totipotensi melalui regenerasi.

14.4.2 Peran Kultur Jaringan dalam Seleksi Transforman

Setelah proses introduksi gen (transformasi), populasi sel bersifat heterogen. Kultur jaringan memungkinkan dilakukannya seleksi tekanan (*selection pressure*) untuk memungkinkan hanya sel-sel yang telah berhasil mengintegrasikan dan mengekspresikan transgen yang dapat bertahan dan tumbuh.

1. Gen Penanda Seleksi (*Selectable Marker Genes*)

Gen penanda seleksi adalah gen yang disisipkan bersama dengan *gen-of-interest* (GOI) ke dalam tanaman. Gen ini memberikan ketahanan terhadap agen seleksi tertentu, biasanya antibiotik atau herbisida, yang ditambahkan ke dalam media kultur.

- a. **Penanda Antibiotik:** Gen yang paling umum digunakan adalah *neomycin phosphotransferase II* (*nptII*), yang memberikan ketahanan terhadap antibiotik kanamisin, geneticin (G418), dan paromomycin. Antibiotik ini ditambahkan ke media setelah ko-kultivasi. Sel-sel non-transgenik, yang tidak memiliki gen *nptII*, tidak dapat mendetoksifikasi antibiotik dan akan mati. Sebaliknya, sel-sel transgenik yang mengekspresikan *nptII* akan bertahan, membelah, dan membentuk kalus atau tunas yang resisten (Yau & Stewart, 2013).
- b. **Penanda Herbisida:** Gen seperti *bar* atau *pat* (yang mengkode enzyme phosphinothricin acetyltransferase) memberikan ketahanan terhadap herbisida glufosinate ammonium. Herbisida yang ditambahkan ke media akan membunuh sel-sel non-transgenik, sementara sel transgenik dapat menonaktifkan herbisida dan terus tumbuh.

2. Mekanisme dan Pentingnya Kondisi *In Vitro*

Proses seleksi ini hanya efektif dalam kondisi kultur jaringan yang terkendali karena beberapa alasan:

- a. **Kontrol Konsentrasi:** Konsentrasi agen seleksi (mis., kanamisin pada 50-100 mg/L) dapat dioptimalkan

secara tepat untuk membunuh sel liar tanpa sepenuhnya menghambat pertumbuhan sel transgenik.

- b. **Kontak Langsung dan Merata:** Dalam media cair atau agar, agen seleksi bersentuhan secara merata dengan setiap sel, memastikan bahwa tidak ada sel liar yang dapat lolos dari tekanan seleksi.
- c. **Lingkungan Steril:** Kondisi aseptik mencegah kontaminasi mikroba yang dapat mengganggu proses seleksi atau memecah agen seleksi.

Proses seleksi biasanya dilakukan secara bertahap, dengan periode seleksi yang panjang (beberapa minggu) untuk memastikan hanya sel-sel yang benar-benar resisten yang bertahan. Kalus atau jaringan yang tumbuh di bawah tekanan seleksi kemudian dipindahkan ke media regenerasi yang juga mengandung agen seleksi untuk memastikan bahwa hanya tunas transgenik yang beregenerasi (Purwantoro *et al.*, 2022)

Setelah sel-sel transgenik berhasil diidentifikasi dan diseleksi, langkah berikutnya adalah meregenerasinya menjadi tanaman utuh. Ini adalah aktualisasi dari prinsip **totipotensi**, dan kultur jaringan adalah satu-satunya platform yang memungkinkannya.

1. Dua Jalur Regenerasi Utama

Terdapat dua jalur utama regenerasi yang dimediasi oleh manipulasi hormon dalam media kultur:

- a. **Organogenesis:** Proses pembentukan organ baru (tunas atau akar) secara adventif langsung dari sel atau jaringan yang ditransformasi. Jalur ini dikendalikan oleh rasio hormon auksin dan sitokinin.
 - 1) **Aplikasi:** Media dengan rasio sitokinin yang tinggi (mis., BAP atau zeatin) mendorong pembentukan **tunas adventif** dari kalus atau langsung dari eksplan (direct organogenesis). Tunas-tunas ini kemudian dipindahkan ke media berauksin tinggi (mis., NAA atau IAA) untuk induksi **perakaran**.
 - 2) **Kelebihan:** Relatif cepat dan langsung.

- 3) **Kekurangan:** Berpotensi menghasilkan tanaman chimera (hanya sebagian jaringan yang transgenik) jika regenerasi berasal dari multi-sel.

b. Embriogenesis Somatik: Proses pembentukan embrio dari sel somatik (bukan dari zigot). Embrio somatik ini melewati tahapan perkembangan yang mirip dengan embrio zigotik (*globular, heart-shaped, torpedo, cotyledonary*).

- 1) **Aplikasi:** Dipicu oleh auksin dalam konsentrasi tinggi (biasanya 2,4-D). Sel-sel embryogenic membelah dan membentuk struktur embrio. Embrio somatik kemudian dapat "berkecambah" menjadi plantlet pada media tanpa auksin atau dengan auksin sangat rendah.
- 2) **Kelebihan: Jalur yang sangat disukai untuk transformasi** karena setiap embrio somatik berpotensi berasal dari **satu sel** (single-cell origin). Ini sangat mengurangi atau menghilangkan risiko chimerisme dan menghasilkan tanaman yang seluruhnya transgenik (homogen) (Guan et al., 2016).
- 3) **Kekurangan:** Induksi dan pemeliharaan garis embryogenic yang stabil bisa jadi sulit dan spesifik-genotipe untuk banyak tanaman.

2. Pentingnya Genotipe dan Optimasi Media

Efisiensi regenerasi sangat bergantung pada genotipe tanaman dan komposisi media. Beberapa genotipe (*cultivar*) memiliki respons regenerasi yang jauh lebih baik ("*recalcitrant*") daripada yang lain. Oleh karena itu, optimasi media—termasuk jenis dan konsentrasi hormon, komposisi nutrisi, dan zat aditif seperti prolin atau silver nitrate—sangat penting untuk mencapai efisiensi regenerasi yang tinggi untuk setiap spesies dan genotipe target.

14.4.3 Konfirmasi dan Aklimatisasi

Setelah tanaman diregenerasi di bawah tekanan seleksi, konfirmasi lebih lanjut diperlukan:

1. **Analisis Molekuler:** Teknik seperti PCR (untuk mendeteksi adanya transgen), Southern blot (untuk mengkonfirmasi integrasi dan *copy number*), dan Western blot (untuk mendeteksi ekspresi protein) dilakukan untuk memverifikasi status transgenik tanaman.
2. **Aklimatisasi:** Plantlet yang telah berakar dan tumbuh dalam kondisi *in vitro* yang steril, lembab, dan dengan nutrisi berlebih sangat rentan terhadap kondisi lingkungan luar. Proses aklimatisasi melibatkan pemindahan plantlet secara bertahap ke kondisi *ex vitro* (biasanya di rumah kaca) dengan meningkatkan intensitas cahaya dan mengurangi kelembaban secara perlahan. Ini memungkinkan plantlet mengembangkan kutikula dan sistem perakaran yang fungsional untuk bertahan hidup di tanah.

Kesimpulan

Peran kultur jaringan dalam tahap seleksi dan regenerasi adalah **tidak tergantikan** dan merupakan inti dari keseluruhan proses rekayasa genetika tumbuhan. Kultur jaringan menyediakan sistem yang memungkinkan:

1. **Seleksi Efisien:** Penggunaan agen seleksi dalam media untuk secara spesifik memilih hanya sel-sel yang membawa transgen, sehingga mengeliminasi jutaan sel non-transgenik.
2. **Realisasi Totipotensi:** Manipulasi hormonal yang presisi untuk meregenerasikan tanaman utuh yang viable dan fertil dari sebuah sel transgenik tunggal, melalui jalur organogenesis atau embriogenesis somatik.
3. **Produksi Biomassa:** Perbanyak klonal dalam jumlah besar dari tanaman transgenik yang telah terkonfirmasi.

Tanpa platform kultur jaringan, transformasi genetik akan berhenti pada level sel dan tidak akan memiliki aplikasi praktis. Dengan demikian, kemajuan dalam rekayasa genetika tumbuhan berjalan seiring dengan kemajuan dalam pemahaman dan penguasaan teknik-teknik kultur jaringan.

14.5 Aplikasi dan Studi Kasus: Pemanfaatan Kultur Jaringan dalam Rekayasa Genetika Tumbuhan

Teknik rekayasa genetika tumbuhan, yang fondasinya dibangun di atas platform kultur jaringan, telah merevolusi bidang bioteknologi pertanian, kedokteran, dan industri. Kemampuan untuk mentransfer gen secara spesifik melampaui batasan biologis reproduksi konvensional telah membuka pintu bagi pengembangan tanaman dengan sifat-sifat unggul yang sebelumnya mustahil untuk dicapai. Keberhasilan aplikasi-aplikasi ini, mulai dari tanaman pangan yang tahan hama hingga pabrik biologis untuk produksi vaksin, tidak akan terwujud tanpa peran kritis dari teknik kultur jaringan dalam setiap tahapannya—mulai dari transformasi, seleksi, hingga regenerasi tanaman transgenik. Bab ini akan memaparkan secara mendalam berbagai aplikasi utama rekayasa genetika tumbuhan, disertai dengan studi kasus yang iconic, untuk mengilustrasikan bagaimana integrasi kedua teknologi ini memberikan solusi inovatif bagi tantangan global.

14.5.1 Peningkatan Produktivitas dan Ketahanan Terhadap Cekaman Biotik

Aplikasi paling signifikan dan luas dari rekayasa genetika adalah dalam menciptakan tanaman yang mampu menghasilkan hasil panen yang lebih tinggi dan lebih stabil dengan mengurangi kehilangan akibat hama dan penyakit.

1. Tanaman Tahan Serangga: Kasus Kapas Bt

- a. **Latar Belakang:** Bollworm (*Helicoverpa armigera*) dan sejenisnya adalah hama penghancur yang dapat menyebabkan kehilangan hasil kapas hingga 50-60%, mendorong penggunaan insektisida kimia dalam jumlah besar yang mahal dan berbahaya bagi lingkungan.
- b. **Teknologi:** Gen *cry1Ac* dan *cry2Ab* dari bakteri tanah *Bacillus thuringiensis* (Bt) dikloning dan ditransformasikan ke dalam tanaman kapas. Gen-gen ini mengkode protein kristal (Cry) yang bersifat toksik spesifik terhadap serangga Lepidoptera tertentu namun aman bagi manusia, hewan, dan serangga non-target.

- c. **Peran Kultur Jaringan:** Transformasi dilakukan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa vektor mengandung gen *cry*. Eksplan kapas (biasanya kotiledon atau hipokotil) dikoin-kubasi dengan *Agrobacterium*, kemudian diregenerasi pada media yang mengandung antibiotik untuk seleksi dan hormon untuk induksi tunas dan akar. Tanaman yang diregenerasi diuji untuk integrasi dan ekspresi gen Bt (James, 2015).
 - d. **Dampak:** Diluncurkan pertama kali pada 1996, kapas Bt telah diadopsi secara global. Studi menunjukkan pengurangan penggunaan insektisida kimia hingga 40-60%, peningkatan hasil panen sebesar 20-30%, serta peningkatan keuntungan bagi petani dan pengurangan keracunan pestisida (Kathage & Qaim, 2012).
2. **Tanaman Tahan Virus: Kasus Pepaya Tahan PRSV**
- a. **Latar Belakang:** Pada tahun 1990-an, virus ringspot pepaya (Papaya Ringspot Virus, PRSV) menghancurkan industri pepaya di Hawaii, mengancam kehilangan panen total.
 - b. **Teknologi:** Mengadopsi konsep *pathogen-derived resistance*, para peneliti mentransformasikan pepaya dengan gen yang mengkode protein selubung (coat protein) dari PRSV. Ekspresi protein asing ini mengganggu siklus replikasi virus, memberikan ketahanan yang efektif (Gonsalves, 1998).
 - c. **Peran Kultur Jaringan:** Transformasi merupakan tantangan karena pepaya bersifat recalcitrant. Metode biolistik digunakan untuk menembakkan partikel emas berlapis DNA konstruksi coat protein ke dalam embriogenik somatik kalus pepaya. Kalus yang ditransformasi kemudian diseleksi dan diregenerasi melalui embriogenesis somatik, sebuah proses yang sepenuhnya bergantung pada optimasi media kultur yang cermat (Blum et al., 1992).
 - d. **Dampak:** Pepaya transgenik 'Rainbow' disetujui pada 1998 dan berhasil menyelamatkan industri pepaya Hawaii. Ini menjadi studi kasus klasik bagaimana rekayasa

genetika dapat menyelamatkan tanaman pangan dari ancaman kepunahan.

3. Tanaman Tahan Herbisida

- a. **Latar Belakang:** Pengendalian gulma adalah tantangan utama dalam pertanian. Herbisida seperti glifosat (Roundup®) efektif membunuh gulma luas tetapi juga membunuh tanaman budidaya.
- b. **Teknologi:** Gen *cp4 epsps* dari bakteri *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4, yang mengkode versi enzim EPSPS yang tidak peka terhadap glifosat, ditransformasikan ke kedelai, jagung, dan kapas. Tanaman yang mengekspresikan gen ini menjadi toleran terhadap penyemprotan glifosat.
- c. **Peran Kultur Jaringan:** Seperti pada kapas Bt, kultur jaringan melalui transformasi *Agrobacterium* dan regenerasi merupakan tahapan kunci dalam pembuatan garis tanaman toleran glifosat pertama. Media seleksi yang mengandung glifosat digunakan untuk memastikan hanya sel yang mengekspresikan gen *cp4 epsps* yang bertahan (Dill, 2005).
- d. **Dampak:** Memungkinkan pengendalian gulma yang lebih mudah dan efisien, mendukung praktik pengolahan tanah konservasi. Namun, aplikasinya juga menimbulkan kekhawatiran seperti munculnya gulma resisten glifosat.

14.5.2 Peningkatan Kualitas Nutrisi dan Komposisi Produk

Rekayasa genetika tidak hanya tentang perlindungan tanaman, tetapi juga tentang peningkatan nilai gizi dan fungsionalnya.

1. Biofortifikasi: Kasus Beras Emas (*Golden Rice*)

- a. **Latar Belakang:** Defisiensi vitamin A merupakan masalah kesehatan global yang menyebabkan kebutaan dan meningkatnya kerentanan terhadap penyakit, terutama di negara-negara berkembang yang bergantung pada beras sebagai makanan pokok, yang tidak mengandung provitamin A.
- b. **Teknologi:** Beras Emas direkayasa untuk mensintesis beta-karoten (prekursor vitamin A) di endosperma

bijinya, bagian yang biasa dimakan. Ini dicapai dengan memasukkan dua gen biosintetik: *phytoene synthase* (dari narsis) dan *carotene desaturase* (dari bakteri *Erwinia uredovora*) yang dikendalikan oleh promoter endosperma-spesifik (Ye et al., 2000).

- c. **Peran Kultur Jaringan:** Transformasi beras, sebagai tanaman monokotil, awalnya sangat sulit. Keberhasilan dicapai dengan menggunakan metode biolistik pada embrio yang belum matang atau kalus embriogenik. Regenerasi tanaman yang efisien dari kalus yang ditembak membutuhkan penguasaan penuh teknik kultur jaringan untuk spesies ini.
- d. **Dampak:** Golden Rice mewakili aplikasi rekayasa genetika yang berorientasi pada kesehatan masyarakat. Meskipun perdebatannya kompleks, Golden Rice merupakan bukti konsep yang powerful untuk menggunakan tanaman sebagai kendaraan pemberian nutrisi ((Tang et al., 2009).

2. Peningkatan Komposisi Asam Lemak: Kasus Kedelai Vistive Gold™

- a. **Latar Belakang:** Minyak kedelai konvensional mengandung asam lemak tak jenuh ganda yang tidak stabil terhadap pemanasan, menyebabkan hidrogenasi yang menghasilkan lemak trans tidak sehat.
- b. **Teknologi:** Dengan menggunakan *gene silencing* melalui RNA interference (RNAi), ekspresi gen *FAD2-1A* dan *FAD2-1B* (yang mengkode enzim pembentuk asam lemak tak jenuh ganda) pada kedelai ditekan. Hal ini menyebabkan akumulasi asam oleat (tak jenuh tunggal yang lebih stabil) hingga lebih dari 75% (Clemente & Cahoon, 2009).
- c. **Peran Kultur Jaringan:** Konstruksi RNAi ditransformasikan ke dalam kedelai menggunakan *Agrobacterium*. Proses regenerasi tanaman kedelai transgenik dari eksplan yang terinfeksi memerlukan protokol kultur jaringan yang sangat teroptimasi untuk mengatasi sifat recalcitrant-nya.

- d. Dampak:** Menghasilkan minyak kedelai dengan profil lemak yang lebih sehat, stabil untuk memasak tanpa perlu hidrogenasi, sehingga bebas lemak trans.

14.5.3 Produksi Senyawa Biofarmasi dan Industri (*Molecular Pharming*)

Tanaman transgenik dapat difungsikan sebagai pabrik biologis yang hemat biaya dan mudah diskalakan untuk memproduksi protein rekombinan bernilai tinggi.

1. **Produksi Vaksin: Kasus Vaksin Norwalk Virus dalam Tembakau**

- a. Latar Belakang:** Produksi vaksin konvensional dalam sistem sel mamalia atau telur mahal dan kapasitasnya terbatas.
- b. Teknologi:** Gen yang mengkode protein virus like particle (VLP) dari Norwalk virus (penyebab utama gastroenteritis) dikloning ke dalam vektor dan ditransformasikan ke tanaman tembakau. Tumbuhan menghasilkan VLP yang secara imunogenik identik dengan virus asli tetapi tidak menular (Mason et al., 1996).
- c. Peran Kultur Jaringan:** Tembakau adalah model ideal untuk transformasi dan regenerasi melalui kultur jaringan karena responsnya yang sangat baik terhadap *Agrobacterium* dan kemudahannya beregenerasi. Kultur jaringan memungkinkan produksi cepat garis tanaman tembakau penghasil VLP.
- d. Dampak:** Membuka jalan untuk produksi vaksin yang dapat diproduksi dengan cepat, murah, dan dalam jumlah besar, yang sangat berguna untuk negara-negara berkembang dan menghadapi wabah.

2. **Produksi Antibodi: Kasus Antibodi Anti-Kanker dalam Tanaman**

- a. Latar Belakang:** Antibodi monoklonal biasanya diproduksi dalam bioreaktor sel mamalia yang sangat mahal.
- b. Teknologi:** Gen untuk rantai berat dan ringan dari antibodi manusia (misalnya, antibodi untuk mengobati limfoma non-Hodgkin) diekspresikan dalam tanaman.

Tanaman mampu merakit antibodi fungsional yang kompleks.

- c. **Peran Kultur Jaringan:** Selain menciptakan tanaman transgenik stabil, kultur jaringan dalam bentuk kultur akar rambut (*hairy root culture*) yang diinduksi oleh *Agrobacterium rhizogenes* juga digunakan sebagai platform produksi protein rekombinan yang efisien dan stabil (Hakkinen et al., 2016).

14.5.4 Aplikasi dalam Pemuliaan Tanaman dan Konservasi Percepatan Pemuliaan Konvensional

Rekayasa genetika dapat memperkenalkan sifat-sifat baru yang tidak ada dalam plasma nutfah suatu spesies, yang kemudian dapat disilangkan ke varietas unggul melalui pemuliaan konvensional. Kultur jaringan memfasilitasi langkah pertama ini.

Konservasi dan Pertukaran Germplasm

Teknik kultur jaringan, khususnya **kriopreservasi** (penyimpanan dalam nitrogen cair pada suhu -196°C), digunakan untuk melestarikan germplasm tanaman transgenik yang berharga maupun plasma nutfah liar yang terancam punah secara jangka panjang, bebas dari penyakit, dan dengan ruang penyimpanan minimal (Engelmann, 2011).

14.5.5 Tantangan, Kontroversi, dan Perspektif Masa Depan

Meskipun manfaatnya besar, aplikasi rekayasa genetika menghadapi tantangan:

1. **Kekhawatiran Lingkungan:** Aliran gen ke kerabat liar, dampak pada organisme non-target, dan potensi ledakan hama sekunder.
2. **Kekhawatiran Kesehatan:** Potensi alergenitas dan keamanan pangan jangka panjang (meskipun konsensus ilmiah kuat menyatakan tanaman GM yang telah disetujui aman).
3. **Isu Regulasi dan Sosial-Ekonomi:** Biaya regulasi yang tinggi, hak kekayaan intelektual, dan penolakan konsumen.

Masa Depan: Teknologi baru seperti **pengeditan gen CRISPR-Cas9** semakin mengandalkan kultur jaringan untuk regenerasi tanaman yang diedit. CRISPR menawarkan presisi yang lebih tinggi—dapat mengedit gen endogen tanpa menyisipkan gen asing—sehingga berpotensi mengurangi kekhawatiran regulasi dan publik. Aplikasi masa depan termasuk menciptakan tanaman yang lebih tahan terhadap perubahan iklim, efisiensi penggunaan nitrogen yang lebih tinggi, dan peningkatan kandungan gizi yang lebih presisi.

14.6 Kesimpulan

Aplikasi rekayasa genetika tumbuhan, yang dimungkinkan oleh kultur jaringan, telah memberikan kontribusi yang nyata dan transformatif bagi pertanian dan kesehatan global. Dari menyelamatkan industri pepaya Hawaii, mengurangi beban pestisida, hingga berpotensi memerangi kekurangan gizi, studi-studi kasus ini membuktikan kekuatan teknologi ini. Kultur jaringan tetap menjadi tulang punggung yang indispensable, dari tahap desain awal hingga produksi massal tanaman transgenik. Meskipun tantangan dan perdebatan tetap ada, pendekatan yang berbasis sains, regulasi yang prudent, dan inovasi berkelanjutan dalam teknik seperti pengeditan gen akan terus memperluas potensi rekayasa genetika untuk membangun sistem pangan dan kesehatan yang lebih berkelanjutan dan tangguh di masa depan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bevan, M. W., Flavell, R. B., & Chilton, M. D. (1983). 'A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation', *Nature*, 304(5922), pp.184-187.
- Engelmann, F. (2011) 'Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47(1), pp. 5-16. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>.
- Gelvin, S.B. (2003) 'Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), pp. 16-37. Available at: <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>.
- Gelvin, S.B. (2010) 'Plant proteins involved in Agrobacterium-mediated genetic transformation', *Annual Review of Phytopathology*, 48, pp. 45-68. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081852>.
- Gonsalves, D. (1998) 'Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study', *Annual Review of Phytopathology*, 36, pp. 415-437. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto.36.1.415>.
- Guan, Y. *et al.* (2016) 'Application of somatic embryogenesis in woody plants', *Frontiers in Plant Science*, 7(June), pp. 1-12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>.
- Haberlandt, G. (1902) 'Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen', *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe. Abteilung I*, 111, pp. 69-92.
- Häkkinen, S.T. *et al.* (2014) 'Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody', *Biotechnology and Bioengineering*, 111(2), pp. 336-346. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.25113>.
- James, C. (2015) *20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015*, ISAAA Brief No. 51.
- Kathage, J. and Qaim, M. (2012) 'Economic impacts and impact dynamics of Bt (*Bacillus thuringiensis*) cotton in India',

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), pp. 11652–11656. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1203647109>.
- Lacroix, B. and Citovsky, V. (2019) 'Beyond protein-protein interactions: wiring the network through *Agrobacterium*-mediated plant transformation', *Current Opinion in Biotechnology*, 59, pp. 72-80.
- Mason, H.S., Ball, J.M., Shi, J.J., Jiang, X., Estes, M.K. and Arntzen, C.J. (1996) 'Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(11), pp. 5335-5340.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) 'A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures', *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473-497.
- Miki, B. and McHugh, S. (2004) 'Selectable marker genes in transgenic plants: Applications, alternatives and biosafety', *Journal of Biotechnology*, 107(3), pp. 193–232. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.011>.
- Purwantoro, A. *et al.* (2022) 'Genetic transformation via plant tissue culture techniques: Current and future approaches', *Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends*, (January), pp. 131–156. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00001-1>.
- Rasmussen, S.K. and Rasmussen, L. (2022) 'Protoplast transformation as a platform for biotechnology in cereals', in *Cereal Genomics: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US, pp. 267-279.
- Sanford, J.C. (2000) 'The development of the biolistic process', *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(5), pp. 303-308.
- Steward, A.F.C., Mapes, M.O. and Mears, K. (1980) 'American Journal of Botany', *American Journal of Botany*, 67(1), pp. 130–130. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1980.tb07633.x>.
- Tang, G. *et al.* (2009) 'Golden rice is an effective source of vitamin A', *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), pp. 1776–1783. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27119>.

- White, P.R., American, S. and Feb, N. (2013) 'American Journal of Botany', 26(2), pp. 59–64.
- Yau, Y.Y. and Stewart, C.N. (2013) 'Less is more: Strategies to remove marker genes from transgenic plants', *BMC Biotechnology*, 13. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-36>.
- Ye, X. and Beyer, P. (2000) 'Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm', *Science*, 287(5451), pp. 303–305. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.303>.
- Zhang, Y. and Wang, Q. (2020) 'The CRISPR/Cas9 system from bench to field: a review of its application in crop improvement', *Journal of Integrative Agriculture*, 19(2), pp. 481–496

BIODATA PENULIS



Dr. Maria Almeida, S.Pd., M.Si.

Dosen Program Studi Sarjana Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman

Penulis lahir di Bandung tanggal 29 Desember 1981. Penulis adalah dosen tetap pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman. Menyelesaikan pendidikan S1 tahun 2004 pada Jurusan Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia (UPI). Pendidikan S2 diselesaikan pada tahun 2013 di Jurusan Biologi, Institut Teknologi Bandung (ITB) dengan bidang kajian sains bioteknologi tumbuhan (kultur jaringan). Pada tahun 2025 menyelesaikan Pendidikan S3 di Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran (UNPAD) dengan bidang kajian farmasetika dan teknologi farmasi. Penulis pernah mengampu mata kuliah Kultur Jaringan, Biologi Dasar, Biologi Sel, Botani, Biologi Farmasi, Farmakognosi, Farmasi Bahan Alam dan Derivat, Praktikum Pengantar Fitokimia.

BIODATA PENULIS



Dr. Mar'atus Sholihah, M.Pd

Dosen Program Studi Pendidikan Biologi
Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Islam Balitar

Penulis lahir di Blitar tanggal 11 Februari 1992. Penulis adalah dosen tetap pada program studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Islam Balitar, Blitar, Jawa Timur. Studi S1 diselesaikan pada tahun 2014 di program studi Pendidikan Biologi Universitas Negeri Malang (UM). Studi S2 dan S3 nya juga dilanjutkan di prodi serta universitas yang sama dan lulus pada tahun 2016 dan tahun 2024. Penulis menekuni Bidang Pendidikan Biologi yang meliputi bidang Botani, Biologi Sel, dan ilmu pendidikan. Berbagai penelitian dibidang pendidikan juga telah banyak dilakukan khususnya tentang model-model pembelajaran dan pengaruhnya terhadap keterampilan abad 21. Penulis juga aktif menulis berbagai buku seperti buku pelajaran IPA untuk SMP, buku pengenalan lingkungan hidup untuk SD, buku Atlas Botani, buku referensi, dan Bookchapter. Penulis juga berperan aktif dalam Program Merdeka Belajar Kampus Merdeka dengan menjadi Dosen Pembimbing Lapangan Kampus Mengajar Angkatan 3 dan 4 pada tahun 2022. Penulis juga tergabung dalam asosiasi profesi dosen dan peneliti bidang Biologi yaitu Himpunan Pendidik dan Peneliti Biologi Indonesia. Selain itu penulis juga berkontribusi dalam bidang jaminan produk halal dengan menjadi ketua Halal Center sekaligus sebagai trainer pendamping proses produk halal di Universitas Islam Balitar.

BIODATA PENULIS



Dr. Ir. Nouke Lenda Mawikere, M.Si

Dosen Program Studi Agroteknologi
Fakultas Pertanian Universitas Papua

Penulis lahir di Tomohon-Manado tanggal 16 Nopember 1966. Penulis adalah dosen tetap pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, serta S2 Ilmu Pertanian dan S3 Ilmu Lingkungan Program Pascasarjana Universitas Papua Manokwari. Penulis menyelesaikan pendidikan S1 pada Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Cenderawasih Manokwari dan melanjutkan S2 serta S3 pada Jurusan Biologi Institut Pertanian Bogor. Penulis menekuni bidang ilmu Genetika, Pemuliaan Tanaman, dan Bioteknologi Pertanian. Berbagai penelitian yang telah dilakukan difokuskan pada Biodiversitas dan Pemuliaan Tanaman, Ketahanan Pangan, serta Budidaya Tanaman Pertanian. Penulis dapat dihubungi melalui e-mail: noukemawikere@gmail.com.

BIODATA PENULIS



Putri Damayanti, S.Si., M.Si.

Dosen Program Studi Pendidikan IPA
Fakultas MIPA Universitas Negeri Makassar

Penulis lahir di Wawondula tanggal 14 Juni 1993 di Kabupaten Luwu Timur, Sulawesi Selatan. Penulis adalah dosen tetap pada Program Studi Pendidikan IPA Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Makassar. Menyelesaikan pendidikan S1 pada Jurusan Biologi di Universitas Negeri Makassar pada tahun 2016 dan melanjutkan S2 pada Jurusan Biologi di Universitas Hasanuddin pada tahun 2018.

BIODATA PENULIS



Annisa Nurul Ilmi S. Si., M. Si.

Dosen Program Studi Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Mulawarman

Penulis lahir di Kendari tanggal 29 Juli 1994. Penulis adalah dosen tetap pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman. Menyelesaikan pendidikan S1 pada Jurusan Biologi dan melanjutkan S2 pada Jurusan Biologi. Penulis saat ini aktif mengajar di beberapa mata kuliah Program Studi S1 Biologi dan telah menulis beberapa artikel penelitian. Penulis memiliki pengalaman sebagai surveyor lapangan pada proyek kesehatan, sebagai staff biologi molekuler COVID-19 Rumah Sakit Pertamina, Jakarta.

BIODATA PENULIS



Yudia Azmi, S.P., M.Si.

Dosen Program Studi Agroteknologi
Institut Teknologi Perkebunan Pelalawan Indonesia

Penulis lahir di Pekanbaru tanggal 27 Oktober 1990. Penulis adalah dosen tetap pada Program Studi Agroteknologi Institut Teknologi Perkebunan Pelalawan Indonesia. Menyelesaikan pendidikan S1 pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang dan melanjutkan S2 pada Bidang Peminatan Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman Institut Pertanian Bogor. Penulis menekuni bidang menulis jurnal dan penelitian mengenai kultur jaringan dan pemanfaatan limbah kelapa sawit. Buku yang pernah diterbitkan yaitu Book chapter Pertanian Terpadu Anatomi Tumbuhan, Dasar – Dasar Hortikultura dan Pertanian Perkotaan. Penulis dapat dihubungi melalui e-mail: udiaazmi@gmail.com.

BIODATA PENULIS



Jamilatus Sa'diyah, S.Pd., M.Si.

Dosen Program Studi Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Makassar

Penulis saat ini merupakan salah satu dosen tetap pada Program Studi Biologi Fakultas MIPA, Universitas Negeri Makassar. Penulis merampungkan pendidikan S1 pada Jurusan Biologi Universitas Negeri Malang dan melanjutkan studi magister (S2) pada Jurusan Biologi di Universitas Brawijaya. Bidang kajian yang ditekuni penulis adalah biologi tumbuhan. Penulis saat ini aktif melaksanakan tridharma perguruan tinggi yakni pengajaran, penelitian, dan pengabdian pada masyarakat. Selain menekuni bidang akademik, penulis juga aktif pada berbagai kegiatan sosial *entrepreneurship* dan komunitas literasi. Untuk berkolaborasi dan terhubung dengan penulis dapat melalui e-mail jamilatus.sa'diyah@unm.ac.id atau media sosial IG @jamila_sadiyah.

BIODATA PENULIS



Sri Nopitasari, S.Si., M.Sc.

Doctor (Cand.) Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman
Fakultas Pertanian, Departemen Agronomi dan Holtikultura,
IPB University

Penulis lahir di Tasikmalaya, 10 November 1992. Penulis adalah praktisi di bidang kultur jaringan, *plant biotechnology* dan *research assistant* program kolaborasi RIIM Pisang: Wild Banana di Indonesia proyek BMGF (Bill Melinda Gates Foundation) x BRIN (Badan Riset Inovasi Nasional) dengan skema Degree by Research (DBR) x Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP). Menyelesaikan pendidikan S1-S2 pada Jurusan Biologi, Universitas Gadjah Mada. Penulis memiliki pengalaman menjadi Manuscript Editor di Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology (JTBB), Fakultas Biologi, UGM dari tahun 2020. Beberapa penelitian yang pernah di publikasikan oleh penulis, antara lain: Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing System for Molecular Breeding of Orchids (Semiarti, et al. 2020, Indonesian Journal of Biotechnology), Development of an agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 for *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume genome editing system (Nopitasari et al. 2020, AIP Conference Proceedings), The potential of three endemic *Alocasia* species in Indonesia: Insights from advancing in vitro propagation methods and comparative metabolites analysis (Rachmawati et al. 2025, South African Journal of Botany).

BIODATA PENULIS



Natasha Florenika, S.Si., M.Biotek

Dosen Program Studi Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Mulawarman

Penulis lahir di Samarinda tanggal 28 Desember 1998. Penulis adalah dosen tetap pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman. Menyelesaikan pendidikan S1 pada Jurusan Biologi dan melanjutkan S2 pada Jurusan Bioteknologi. Penulis menekuni bidang bioteknologi tanaman, yang mencakup kultur jaringan tanaman dan analisis fitokimia minyak atsiri. Saat ini penulis tengah aktif mengajar sebagai dosen mata kuliah Pengantar Bioteknologi, Morfologi Tumbuhan, dan Bioteknologi Lingkungan.

BIODATA PENULIS



Dr. Ir. Ellok Dwi Sulichantini, M.Si.

Dosen Program Studi Agroekoteknologi
Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman

Penulis lahir di Lamongan Jawa Timur, bekerja sebagai dosen di Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman sejak tahun 1989 sampai sekarang. Menyelesaikan jenjang pendidikan S1 pada Program Studi Agronomi di Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman pada tahun 1987. Pendidikan S2 di Program Studi Agronomi, Sub Program Studi Pemuliaan Tanaman Non Konvensional di Institut Pertanian Bogor lulus pada tahun 1998. Pendidikan S3 dilaksanakan pada Program Studi Ilmu Kehutanan di Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman lulus pada tahun 2015. Penulis aktif melakukan kegiatan pendidikan, penelitian, dan pengabdian masyarakat di bidang pertanian.

Email: ellok.sulichantini1@gmail.com

BIODATA PENULIS



Aloysia Sri Pujiyanti, S.Si., M.Biotek.

Dosen Program Studi Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Penulis lahir pada tanggal 30 Juli 1996 di Kutai Barat. Penulis menyelesaikan pendidikan Sarjana Sains (S.Si.) di bidang Biologi (Bioteknologi) dan melanjutkan studi Magister Bioteknologi (M.Biotek.) pada jenjang pascasarjana di Universitas Surabaya. Bidang keahlian dan minat penelitiannya meliputi bioteknologi, biologi molekuler, kultur jaringan tumbuhan, mikrobiologi terapan, serta konservasi keanekaragaman hayati. Selain aktif mengajar mata kuliah terkait bioteknologi dan biologi seluler, beliau juga terlibat dalam penelitian dan publikasi ilmiah di jurnal nasional maupun internasional. Kegiatan pengabdian kepada masyarakat yang beliau lakukan terutama berfokus pada penerapan bioteknologi dalam pemanfaatan sumber daya hayati lokal untuk mendukung pembangunan berkelanjutan.

BIODATA PENULIS



Veronica Leonora Tuhumena, SP., M.Si.

Dosen Program Studi Budidaya Tanaman Perkebunan
Fakultas Pertanian Universitas Papua

Penulis lahir di Sorong tanggal 01 Januari 1979 merupakan dosen tetap pada Program Studi Budidaya Tanaman Perkebunan Fakultas Pertanian, Universitas Papua. Menyelesaikan pendidikan S1 pada Jurusan Budidaya Pertanian dan melanjutkan S2 pada Program Studi Ilmu Tanaman. Penulis menekuni bidang menulis sejak tahun 2022.

Penulis memulai karirnya sebagai dosen tetap yayasan di Universitas Victory Sorong (2010-2012), Dosen tidak tetap di Universitas Muhammadiyah Sorong (2011-2012) dan menjadi Dosen program studi Budidaya Tanaman Perkebunan, Fakultas Pertanian Universitas Papua Manokwari (2012-sekarang).

Bidang kajian yang menjadi tanggungjawab penulis sebagai dosen adalah Bioteknologi, Budidaya Tanaman Perkebunan, Budidaya Tanaman Rempah dan Pemanis, Botani dan Taksonomi Tumbuhan, Kultur Jaringan Tanaman, Zat Pengatur Tumbuh dan Teknik Perbanyakan Tanaman.

Penulis telah mengambil bagian dalam penulisan book chapter pada beberapa judul buku antara lain Ekologi Pertanian, Pengantar Ilmu Pertanian, Teknologi Pengendalian Hama dan Penyakit Tanaman Ubi-ubian, Optimalisasi Penggunaan Lahan Pertanian dan Teknologi Budidaya Tanpa Tanah.

BIODATA PENULIS



Rahayu Opi Anggoro, S.Si., M.Biotech.

Dosen Program Studi Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Penulis lahir di Purworejo, Jawa Tengah pada tanggal 8 Oktober 1991. Penulis adalah dosen tetap pada Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Palangka Raya. Menyelesaikan pendidikan S1 pada Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta dan melanjutkan S2 pada Jurusan Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Penelitian yang pernah dilakukan diantaranya adalah morfologi dan kekerabatan tanaman kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). Selain itu penelitian yang lainnya yaitu tentang isolasi dan transfeksi protoplas tanaman padi hitam (*Oryza sativa* L.) 'Cempo Ireng'. Saat ini penulis sedang melakukan penelitian pada beberapa tanaman khas Kalimantan Tengah salah satunya ramin (*Gonystylus bancanus*) dan beberapa varietas lokal padi Kalimantan Tengah seperti Siam Epang. Salah satu mimpi penulis adalah dapat melakukan konferensi internasional setiap bulan di berbeda-beda negara.

BIODATA PENULIS



Yuke Mareta Ariesta Sandra

Dosen Program Studi Sarjana Terapan Pertanian Presisi Jurusan Rekayasa Elektro dan Industri Pertanian Politeknik Manufaktur Negeri Bangka Belitung.

Penulis lahir di Pangkalpinang, tanggal 21 Maret 1995. Penulis Menyelesaikan Pendidikan S1 pada tahun 2013 pada Jurusan Agroteknologi Universitas Bangka Belitung. Pendidikan S2 diselesaikan pada tahun 2022 di Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman Institut Pertanian Bogor (IPB). Penulis memulai karir sebagai dosen tetap Program Studi Pertanian Presisi di Politeknik Manufaktur Negeri Bangka Belitung pada tahun 2024. Sebelumnya penulis berkarir sebagai asisten peneliti di Pusat Kajian Hortikultura Tropika Institut Pertanian Bogor mulai tahun 2022-2024. Penulis aktif melakukan kegiatan pendidikan, penelitian, dan pengabdian masyarakat di bidang pertanian.

Email: Yuke@polman-babel.ac.id