

KULTUR FOTOAUTOTROFIK: **Solusi Mikropropagasi Tumbuhan Berkayu**

Penulis :

Dr. Enni Suwarsi Rahayu, M.Si.

Penyunting :

Dr. Y. Ulung Anggraito, M.Si.

Setting :

Satria Fala Dwisada

Penerbit :



FMIPA
Universitas Negeri Semarang

E-mail : press.mipaunnes@gmail.com

Copyright © 2015 by Enni Suwarsi Rahayu

Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku tanpa izin penulis.

Dicetak oleh CV. Swadaya Manunggal

Jl. Kelud Raya No. 78, Semarang

Telp, 024-8411006

e-mail, percetakanswadaya@yahoo.com

PRAKATA

Segala puji bagi Allah, Tuhan Yang Maha Kuasa. Atas petunjuk dan izinNya, penulis dapat menyelesaikan monograf yang berjudul **“Kultur Fotoautotrofik: solusi mikropropagasi tumbuhan berkayu”**. Monograf ini menyajikan hasil penelitian, teori dan konsep tentang salah satu teknik kultur *in vitro* tumbuhan dan aplikasinya dalam mikropropagasi tumbuhan berkayu.

Mikropropagasi tumbuhan berkayu selama ini diketahui mempunyai tingkat kesulitan yang lebih tinggi dibandingkan tumbuhan berhabitus herba dan rerumputan. Berdasar hasil penelitian, mikropropagasi secara fotoautotrofik dapat mengatasi kesulitan tersebut. Fotoautotrofik merupakan aplikasi kultur *in vitro* yang memberi kondisi agar eksplan yang ditumbuh-kembangkan lebih bersifat autotrof melalui peningkatan kemampuan fotosintesis.

Teknik ini belum banyak dilakukan di Indonesia, walaupun di manca negara telah berkembang pesat. Oleh karena itu penulisan monograf ini bertujuan untuk memperkaya wawasan pemerhati, peneliti, dan praktisi kultur jaringan tumbuhan dari kalangan mahasiswa, produsen bibit tanaman, maupun masyarakat umum.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada para mahasiswa dan alumni Program Studi Biologi FMIPA Unnes yang telah membantu pelaksanaan penelitian untuk mengembangkan metode kultur fotoautotrofik pada kawista,

terutama Nidaul Khoiriyah S.Si. Ucapan terima kasih dan penghargaan juga disampaikan kepada Dr. Y. Ulung Anggraito, M.Si yang telah bersedia menyunting monograf ini. Semoga karya ini dapat dijadikan sebagai informasi berharga bagi peneliti dan praktisi di bidang kultur jaringan tumbuhan. Kritik dan saran sangat diharapkan untuk kesempurnaan isi monograf ini.

Semarang, November 2015

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan	2
C. Tujuan	3
D. Metode Pemecahan Masalah	3
II TEKNIK MIKROPROPAGASI	
A. Macam Teknik Mikropropagasi	4
B. Faktor Penentu Keberhasilan Mikropropagasi	
1. Faktor Internal: eksplan	6
2. Faktor Eksternal: bejana, medium dan lingkungan fisik	10
C. Keterbatasan Teknik Mikropropagasi Konvensional	21
III KULTUR FOTOAUTOTROFIK	
A. Prinsip Dasar dan Perkembangan Kultur Fotoautotrofik	23
B. Karakteristik Kultur Fotoautotrofik	26
C. Kelebihan dan Keterbatasan Kultur Fotoautotrofik	27
IV MEDIUM KULTUR FOTOAUTOTROFIK	
A. Substrat Medium	29
B. Nutrien Anorganik	32
V PENGENDALIAN LINGKUNGAN FISIK DALAM KULTUR FOTOAUTOTROFIK	
A. Pengendalian Faktor Cahaya	36
B. Pengendalian Konsentrasi Gas (O ₂ dan CO ₂)	39
C. Pengendalian Kelembaban Udara dan Suhu	47

VI	MIKROPROPAGASI TUMBUHAN BERKAYU SECARA FOTOAUTOTROFIK	
	A. Karakteristik Eksplan Tumbuhan Berkayu ..	49
	B. Faktor-faktor Keberhasilan Mikropropagasi Tumbuhan Berkayu	50
	C. Efektivitas Kultur Fotoautotrofik Tumbuhan Berkayu	53
	D. Contoh Aplikasi Kultur Fotoautotrofik dalam Mikropropagasi Tumbuhan Berkayu	55
VII	PENUTUP	62
	DAFTAR PUSTAKA	63
	GLOSARIUM	76

DAFTAR TABEL

1	Perbandingan komposisi senyawa nutrisi anorganik, resep Hoagland, MS, WPM, dan Gamborg-B5	33
2	Perbandingan NaHCO_3 , Na_2CO_3 , dan HCl yang digunakan untuk menghasilkan berbagai kadar CO_2	46

DAFTAR GAMBAR

1	Beberapa jenis kultur <i>in vitro</i>	5
2	Pengaruh umur ontogeni tanaman induk terhadap respon eksplan	9
3	Berbagai ukuran bejana kultur dan bahan penutup	10
4	Medium cair dan bahan penunjang pada medium cair	12
5	Pengembunan pada bejana kultur	15
6	<i>Plantlet</i> kacang tanah hasil kultur <i>in vitro</i>	21
7	Berbagai macam bahan substrat medium kultur fotoautotrofik	32
8	Pencahayaan dalam ruang kultur	39
9	Filter mikropori	42
10	Penambahan CO ₂ melalui bahan kimia penghasil CO ₂	47

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Phytomass atau bahan yang berasal dari organ-organ tumbuhan mempunyai berbagai peran dalam kehidupan manusia. *Phytomass* berbagai spesies dimanfaatkan sebagai sumber bahan pangan, obat-obatan, energi alternatif, perumahan, dan pakan ternak. Selain itu juga dibutuhkan untuk rehabilitasi lahan marginal, menjaga keseimbangan ekosistem, stabilitas iklim lokal dan global, serta konservasi air bersih.

Untuk memenuhi kebutuhan *phytomass* secara efektif dan efisien diperlukan spesies-spesies tumbuhan yang berkualitas. Tumbuhan berkualitas tinggi dengan karakteristik fisiologi dan morfologi unggul hanya dapat diproduksi di bawah lingkungan terkendali. Teknik kultur *in vitro* berpotensi untuk dimanfaatkan dalam produksi bibit tumbuhan berkualitas tinggi dalam jumlah besar.

Kultur *in vitro* merupakan teknik menumbuhkan sel, jaringan atau organ yang diisolasi dari tumbuhan induk pada medium buatan. Pada teknik tersebut sel, jaringan, atau organ ditanam pada medium dalam suatu bejana tertutup secara steril. Pada umumnya bejana kultur terbuat dari gelas bening yang dapat melewatkan cahaya ke dalam bejana, dan diletakkan di dalam ruang tumbuh dengan kondisi lingkungan yang terkendali. Hal tersebut mengakibatkan teknik kultur *in vitro* konvensional memerlukan fasilitas, biaya, dan tenaga kerja yang relatif tinggi (Kozai & Kubota, 2005a).

Lingkungan *in vitro* konvensional ditandai dengan kelembaban udara yang tinggi, intensitas cahaya rendah, konsentrasi CO₂ rendah, konsentrasi etilen tinggi, pergerakan udara terbatas, porositas udara rendah, dan adanya kandungan gula dalam medium kultur (Hazarika, 2003). Kondisi yang sangat berbeda dengan kondisi lingkungan *ex vitro* tersebut

sering menyebabkan tumbuhan produksi kultur *in vitro* mengalami kerusakan stomata, penipisan lapisan lilin epikutikuler, pemanjangan tunas berlebihan, penurunan konsentrasi klorofil dan hiperhidrasi sehingga intensitas pertumbuhan dan peluang hidup dalam lingkungan *ex vitro* juga rendah (Lucchesini *et al.*, 2001; Hazarika, 2006; Chaum *et al.*, 2011). Selain itu juga sering menghadapi resiko kontaminasi dan menghasilkan *plantlet* dengan persentase hidup yang rendah pada tahap aklimatisasi (Kozai & Kubota, 2005a). Oleh karena itu penggunaan teknik *in vitro* untuk perbanyak tumbuhan, terutama tumbuhan berkayu, masih perlu dioptimalkan. Dibandingkan tumbuhan berhabitus herba, selama ini tumbuhan berkayu diketahui lebih sulit dikembangkan secara *in vitro*.

Morfologi dan fisiologi tumbuhan hasil kultur yang abnormal seperti di atas diprediksi dapat dikurangi melalui modifikasi lingkungan kultur. Sejumlah hasil penelitian menunjukkan bahwa pengendalian lingkungan dalam rumah kaca terbukti berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kualitas tumbuhan. Oleh karena itu bila kondisi lingkungan dalam kultur *in vitro* dikendalikan seperti di rumah kaca diyakini kultur tersebut akan menghasilkan tumbuhan baru dengan daya hidup yang lebih tinggi. Teknik kultur *in vitro* ini disebut teknik kultur fotoautotrofik.

B. Permasalahan

Untuk memahami dan mampu melakukan teknik fotoautotrofik beberapa permasalahan yang perlu dibahas adalah sebagai berikut.

1. Bagaimanakah karakteristik kultur fotoautotrofik?
2. Bagaimanakah komposisi medium kultur fotoautotrofik?
3. Bagaimanakah kondisi dan cara mengendalikan lingkungan fisik dalam kultur fotoautotrofik ?
4. Bagaimanakah efektivitas kultur fotoautotrofik dalam mikropropagasi tumbuhan berkayu?

C. Tujuan

Tulisan ini bertujuan untuk 1) memperkaya wawasan pemerhati dan peminat bioteknologi tumbuhan tentang teknik kultur *in vitro* non-konvensional, 2) meningkatkan inovasi penerapan kultur *in vitro* bagi para praktisi teknik kultur *in vitro*, dan 3) meningkatkan efektivitas dan efisiensi mikropropagasi tumbuhan berkayu.

D. Metode Pemecahan Masalah

Masalah dipecahkan melalui penelitian pada tumbuhan berkayu tertentu dan analisis pustaka terhadap artikel yang dipublikasikan dalam jurnal ilmiah dan prosiding seminar nasional maupun internasional. Sebelum menjelaskan hal-hal yang berkait dengan mikropropagasi fotoautotrofik, dalam tulisan ini disajikan ulasan tentang teknik mikropropagasi secara heterotrofik yang selama ini banyak dilakukan. Hal ini bertujuan agar pembaca memiliki persepsi dan pemahaman awal yang sama dan dapat membandingkan dengan teknik fotoautotrofik. Penyajian hasil penelitian mikropropagasi fotoautotrofik dilengkapi dengan analisis pustaka dari berbagai sumber.

BAB II

TEKNIK MIKROPROPAGASI

A. Macam Teknik Mikropropagasi

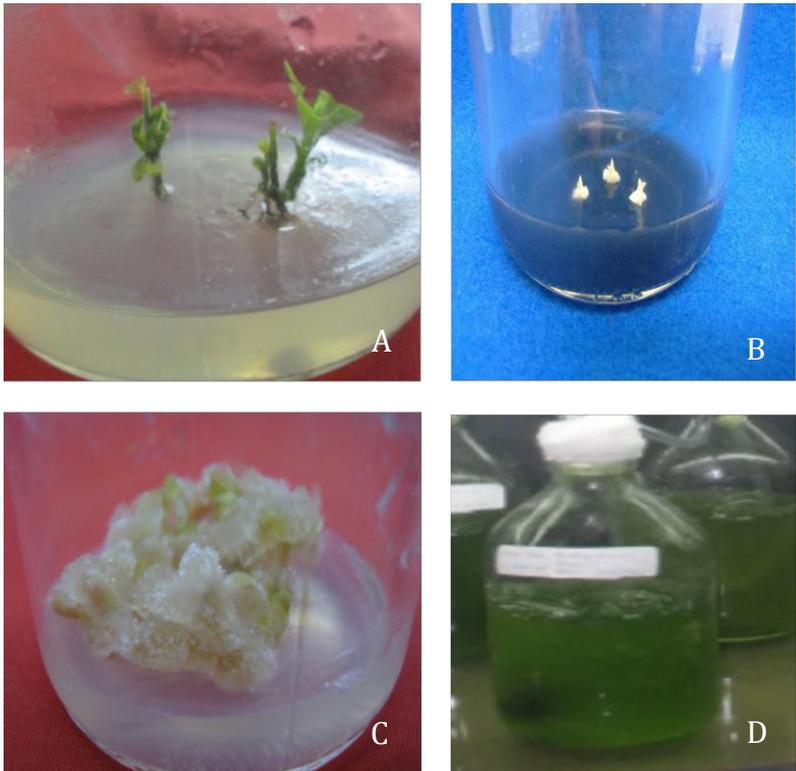
Mikropropagasi adalah perbanyakan tumbuhan yang dilakukan melalui teknik kultur *in vitro* dengan menumbuhkan dan mengembangkan eksplan dalam kondisi buatan yang aseptik. Eksplan dapat berupa sel, jaringan, atau organ. Mikropropagasi bertujuan menghasilkan secara massal tumbuhan yang mempunyai materi genetik identik, fisiologi seragam, perkembangan normal dan bebas patogen, serta dapat diaklimatisasi dalam waktu singkat dengan biaya yang hemat (Kozai & Kubota, 2005a).

Pertumbuhan dalam kultur *in vitro* dapat dibedakan menjadi pertumbuhan terorganisir dan tidak terorganisir. Pertumbuhan terorganisir merupakan proses kelanjutan pertumbuhan eksplan yang telah mengalami diferensiasi. Hal ini terjadi bila eksplan berupa meristem apikal batang atau akar, primordia daun, kuncup bunga atau buah. Dalam medium kultur *in vitro* eksplan meneruskan pertumbuhannya sesuai struktur yang sudah ada sebelumnya. Tipe kultur yang memungkinkan struktur terorganisir dapat meneruskan proses pertumbuhannya disebut kultur organ. Dalam rangka perbanyakan tumbuhan, jenis kultur organ yang paling penting adalah:

- a. kultur meristem: menumbuhkan potongan kecil kuncup apikal atau lateral (Gambar 1A) yang terdiri atas jaringan meristematik tanpa atau dengan 1-2 primordia daun. Ujung kuncup akan tumbuh menjadi tunas tunggal
- b. kultur embrio: menumbuhkan embrio zigotik yang diambil dari biji (Gambar 1B), sampai berkembang menjadi kecambah. Kultur embrio sangat berbeda dengan embriogenesis somatik.

Pertumbuhan tidak terorganisir adalah pertumbuhan yang terjadi melalui proses diferensiasi atau spesialisasi fungsi jaringan sehingga masing-masing mempunyai peran tertentu.

Pertumbuhan yang tidak terorganisir jarang terjadi di alam, namun sering terjadi dalam kultur *in vitro*. Kumpulan sel yang terbentuk akan kehilangan karakteristik sebelumnya dan berkembang menjadi macam-macam jaringan yang ada pada tumbuhan utuh. Sel-sel tersebut dikatakan mengalami diferensiasi sehingga mempunyai bentuk dan fungsi khusus yang kemudian disebut jaringan.



Gambar 1. Beberapa jenis kultur *in vitro*. A. Kultur meristem lateral kawista (Rahayu & Habibah, 2014), B. Kultur embrio zigotik kacang tanah (Rahayu, 2007), C. Kultur kalus karika dieng (Rahayu *et al.*, 2009), D. Kultur suspensi sel daun anggrek (Rahayu, 2007)

Beberapa macam kultur yang tidak terorganisir antara lain sebagai berikut.

- a. Kultur kalus: pertumbuhan dan pemeliharaan massa sel tidak

terorganisir dalam jumlah besar, yang berasal dari pertumbuhan potongan organ, jaringan dan sel-sel sebelumnya yang tidak terkoordinir dan terorganisir (Gambar 1C).

- b. Kultur suspensi sel: kultur sel atau gumpalan sel yang terpisah satu dengan yang lain dan tersebar dalam medium cair aerobik (Gambar 1D). Sel dapat berasal dari kalus.
- c. Kultur protoplas: kultur sel-sel tumbuhan tanpa dinding sel
- d. Kultur anthera: kultur kepala sari yang mengandung polen; biasanya digunakan untuk memperoleh tumbuhan haploid melalui pembentukan embrio somatik langsung dari polen atau dari kalus melalui embriogenesis.

B. Faktor-faktor Penentu Keberhasilan Mikropropagasi *in vitro*

1. Faktor Internal: Eksplan

Berbagai organ atau jaringan dapat dipilih untuk digunakan sebagai eksplan. Pilihan tersebut tergantung pada jenis kultur yang akan dikembangkan, tujuan kultur, dan spesies tumbuhan. Pilihan bahan eksplan yang tepat mempunyai peran besar dalam keberhasilan kultur jaringan (Marks & Simpson, 2000; Jain *et al.*, 2009). Faktor-faktor yang perlu diperhatikan pada saat pengambilan eksplan antara lain sebagai berikut.

a. Sterilitas eksplan

Karena eksplan ditumbuhkan pada medium nutrisi yang biasanya juga cocok untuk mikroorganisme, maka kultur *in vitro* harus dilakukan dalam kondisi aseptik. Berbagai jenis mikroorganisme, khususnya bakteri dan fungi, dapat berkompetisi dengan eksplan yang tumbuh di dalam kultur *in vitro*. Oleh karena itu eksplan harus dibebaskan dari kontaminan atau mikroorganisme.

Organ-organ tumbuhan yang tumbuh di lingkungan *ex vitro* sering terkontaminasi oleh berbagai mikroorganisme. Kontaminan ini terutama terdapat pada permukaan organ, namun beberapa mikroorganisme dan virus kadang-kadang

secara sistemik berada di dalam jaringan/organ. Pencegahan kontaminan dapat dilakukan dengan memelihara tumbuhan induk dalam rumah kaca yang steril, melakukan sterilisasi eksplan dengan bahan kimia desinfektan, serta sterilisasi alat tanam, laminar, dan medium yang digunakan.

b. Kepadatan eksplan dalam bejana kultur

Kepadatan atau jumlah eksplan yang ditanam dalam bejana berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan awal kultur (Tisserat & Silman, 2000). Senyawa kimia esensial tertentu (antara lain asam amino, enzim, hormon, dan vitamin) dapat berdifusi keluar dari eksplan menuju medium sel. Difusi akan berhenti bila tercapai keseimbangan konsentrasi senyawa antara eksplan dan medium. Apabila terdapat sejumlah besar eksplan, keseimbangan akan lebih cepat tercapai sehingga jumlah senyawa per eksplan yang berdifusi ke luar lebih kecil. Sebaliknya bila jumlah eksplan sedikit, keseimbangan baru akan tercapai bila setiap eksplan mengeluarkan senyawa yang relatif banyak. Pengeluaran tersebut dapat mengakibatkan defisiensi. Oleh karena itu untuk keberhasilan inisiasi kultur, harus ada ukuran minimum eksplan atau jumlah sel atau protoplas per unit volume kultur. Untuk mengatasi defisiensi senyawa esensial pada awal kultur, ke dalam medium dapat ditambahkan beberapa suplemen seperti zat pengatur tumbuh (ZPT), asam organik, gula tambahan, kasein hidrosilat, dan air kelapa.

c. Ukuran eksplan

Ukuran eksplan yang besar pada umumnya mempunyai daya hidup yang lebih baik dan tumbuh lebih cepat dibandingkan yang kecil. Irisan yang dilakukan pada eksplan mengakibatkan luka yang bila bereaksi dengan O₂ dapat mengakibatkan kematian sel tertentu. Kematian tersebut tampak sebagai gejala *browning* (pencoklatan) dan nekrotik (Jain *et al.* 2009; Bairu *et al.*, 2009). Pada eksplan yang berukuran kecil *browning* atau nekrotik dapat menurunkan potensi tumbuh secara signifikan; sebaliknya pada eksplan yang berukuran besar hal ini tidak terlalu mengganggu.

Browning juga dapat terjadi akibat oksidasi senyawa fenolik. Beberapa macam tumbuhan, khususnya spesies tropis, mengandung senyawa fenolik dengan konsentrasi tinggi yang akan berdifusi ke luar bila sel terluka atau menua. Akibatnya jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau hitam dan terhambat untuk tumbuh (Jain *et al.*, 2009).

d. Umur ontogeni tumbuhan induk

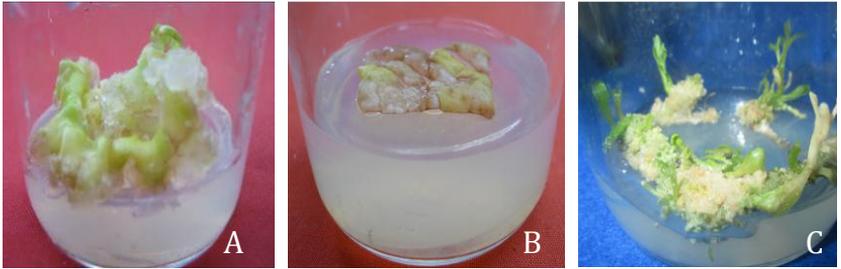
Umur ontogeni tumbuhan induk saat eksplan diambil menentukan pula keberhasilan pertumbuhan eksplan. Ontogeni adalah serangkaian tahap yang dilalui tumbuhan tinggi mulai dari fertilisasi, perkecambahan, *juvenile* sampai dewasa. Pada umumnya fase *juvenile* identik dengan potensi tumbuh maksimal (Ballester *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2009). Rentang fase tersebut bervariasi antar spesies. Rentang terpendek terdapat pada spesies herba *annual* dan terpanjang pada pohon berkayu yang kadang-kadang sampai beberapa tahun.

Terdapat beberapa karakteristik *juvenility*, tetapi bervariasi antar spesies. Pada umumnya daun-daun tumbuhan *juvenile* berbeda bentuk dengan daun pada tumbuhan dewasa, strukturnya lebih sederhana (tidak majemuk), serta mempunyai tipe kutikula dan filotaksis yang spesifik (Jain *et al.*, 2009).

Selain mempengaruhi keberhasilan kultur, kedewasaan perkembangan eksplan sering mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis. Embrio zigotik atau potongan kecambah merupakan eksplan yang kompeten untuk embriogenesis dan organogenesis; sebaliknya yang berasal dari tumbuhan dewasa pada umumnya kurang responsif.

Penelitian pada karika dieng (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch) menunjukkan bahwa daun yang berasal dari tumbuhan fase *juvenile* lebih responsif dalam pembentukan kalus (Gambar 2A) dibandingkan daun yang berasal dari fase dewasa (Gambar 2B) (Rahayu *et al.*, 2008; Rahayu & Fikriati, 2009). Demikian pula pada kawista (*Feronia limonia* L.), potongan akar kecambah mampu menumbuhkan tunas (Gambar 2C), namun yang berasal dari tumbuhan dewasa kehilangan kemampuan tersebut

(Rahayu & Habibah, 2014).



Gambar 2. Pengaruh umur ontogeni tanaman induk terhadap respon eksplan. A. Eksplan daun *juvenile* karika dieng (Rahayu *et al.*, 2008), B. Eksplan daun dewasa karika dieng (Rahayu & Fikriati, 2009), C. Eksplan akar kecambah kawista (Rahayu & Sumadi, 2015).

Berdasar hal tersebut perlu dilakukan rejuvenasi pada jaringan yang akan digunakan sebagai eksplan. Rejuvenasi dapat dilakukan melalui pemeliharaan organ dalam kultur *in vitro* selama periode waktu tertentu. Beberapa penelitian menunjukkan munculnya fenotipe *juvenile* dalam kultur *in vitro*, seperti ukuran daun yang kecil dan kapasitas pembentukan akar adventif (Ballester *et al.*, 1999).

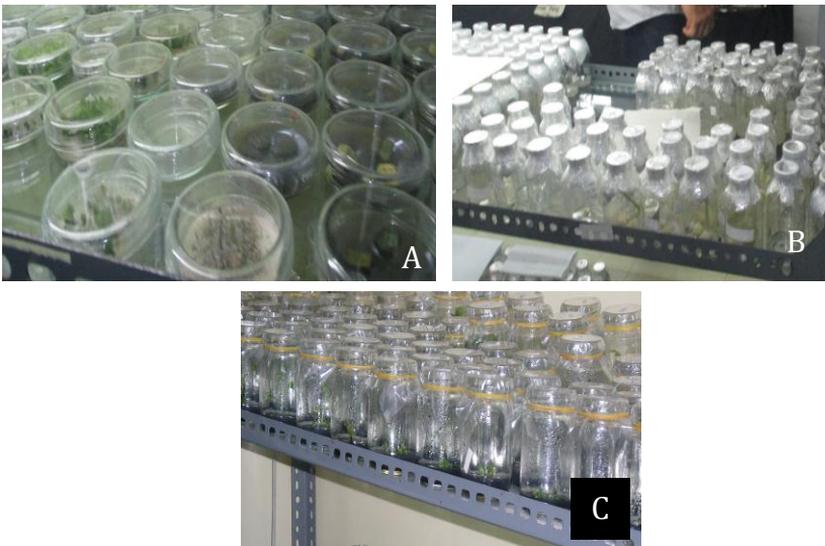
e. Iklim saat pengambilan eksplan

Faktor lain yang menentukan keberhasilan kultur *in vitro* adalah kondisi iklim atau musim saat pengambilan eksplan. Ekplan yang diambil pada musim penghujan mempunyai resiko kontaminasi yang lebih tinggi dibandingkan yang diambil dari musim kering atau kemarau. Kelembaban udara yang tinggi pada musim penghujan memberi peluang yang tinggi pula terhadap kehidupan jamur dan bakteri. Keduanya dapat menempel atau masuk ke dalam jaringan tumbuhan. Kontaminan yang masuk ke dalam jaringan lebih sulit dihilangkan sehingga sterilisasi eksplan harus dilakukan lebih intensif.

2. Faktor Eksternal

a. Bejana kultur

Ukuran dan bentuk bejana kultur dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan. Bejana yang digunakan antara lain dapat berupa cawan petri (Gambar 3A), botol bermulut sempit dengan volume 100 ml (Gambar 3B), atau botol bermulut lebar dengan volume 350 ml (Gambar 3C). Pilihan penggunaan bejana didasarkan pada ukuran awal eksplan dan prediksi ukuran akhir yang diharapkan. Pilihan yang tepat perlu dilakukan agar eksplan dapat tumbuh optimal karena ukuran bejana dan eksplan menentukan rasio eksplan:medium dan eksplan:udara. Hal ini mengakibatkan perbedaan konsentrasi oksigen, karbon dioksida, etilena dan senyawa volatil lainnya di ruang udara di dalam bejana (Tisserat & Silman, 2000).



Gambar 3. Berbagai ukuran bejana kultur dan bahan penutup. A. Cawan petri diameter 9 cm dengan penutup kaca (Rahayu *et al.*, 2009); B. Botol volume 100 ml bermulut sempit dengan penutup *aluminium foil* (Rahayu, 2007); C. Botol volume 300 ml bermulut lebar dengan penutup lembaran plastik (Rahayu & Sumadi, 2015).

Pertumbuhan berlangsung tidak optimal dalam bejana yang sangat kecil. Pada *Lactuca sativa* L. dan *Mentha spicata* L. terdapat korelasi positif antara ukuran bejana dengan berat segar, jumlah daun, jumlah akar dan jumlah tunas *plantlet*. Parameter pertumbuhan yang dicapai pada penggunaan bejana kultur 100 ml dan 150 ml lebih tinggi dibandingkan pada 25 ml atau 50 ml (Tisserat & Sillmann, 2000).

Bentuk bejana juga dapat mempengaruhi laju pertumbuhan kultur (berat segar, morfogenesis, dan tingkat proliferasi tunas aksiler) karena memodifikasi laju difusi gas. Tisserat & Sillmann (2000) menunjukkan bahwa di tabung dengan volume yang sama, pertumbuhan eksplan lebih cepat bila perbandingan panjang dan diameter bejana relatif pendek, dan sebaliknya akan melambat apabila panjang bejana meningkat terhadap diameternya. Hal ini diduga berkaitan dengan jarak dan laju difusi gas. Semakin pendek jarak, semakin tinggi laju difusi, dan semakin tinggi kecepatan metabolisme eksplan.

Ukuran dan bentuk wadah terbaik bervariasi dari satu spesies ke spesies lain, dan tergantung pada faktor-faktor lain seperti jenis penutup yang digunakan, volume medium, dan kepadatan inokulasi. Jenis penutup antara lain kaca (Gambar 3A), aluminium foil (Gambar 3B), plastik (Gambar 3C), kapas dan sebagainya.

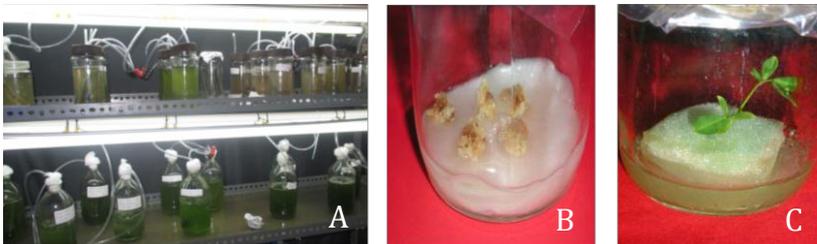
b. Medium kultur

Ada beberapa macam medium kultur *in vitro*, yaitu medium fase padat, fase cair, dan dua fase (medium cair di atas medium padat). Setiap jenis medium cocok untuk tujuan tertentu, namun sebagian besar jenis kultur menggunakan medium padat.

Medium fase padat memerlukan bahan pematat yang harus memenuhi beberapa kriteria, yaitu 1) tidak rusak oleh sterilisasi/pemanasan, 2) tidak dapat diurai enzim, dan 3) tidak bereaksi dengan dengan komponen medium. Senyawa pematat dan metode pemadatan yang digunakan tergantung pada jenis kultur dan tujuannya. Jenis bahan pematat antara lain agar,

gelrite, dan *phytagel*. Konsentrasi agar yang digunakan berkisar 7%, sedangkan konsentrasi *gelrite* biasanya berkisar 3%. Konsentrasi bahan pematid yang terlalu tinggi mengakibatkan media menjadi sangat keras sehingga difusi hara ke eksplan menjadi berkurang.

Bila menggunakan medium padat kontak eksplan dengan medium hanya pada bagian permukaan bawah. Hal ini dapat mengakibatkan eksplan kekurangan nutrisi dan ZPT. Selain itu difusi gas ke dalam dan ke luar sel-sel di dasar eksplan juga menjadi terbatas.



Gambar 4. Medium cair dan bahan penunjang pada medium cair. A. Kultur suspensi sel daun dalam medium cair (Rahayu, 2007). B. Kultur kalus dalam medium cair dengan kertas saring sebagai penunjang (Rahayu, 2007), C. Kultur tunas pada medium cair dengan spons sebagai penunjang (Rahayu, 2007),

Medium cair sangat cocok untuk kultur suspensi sel, (Gambar 4A), protoplas, organ yang sangat kecil seperti kepala sari, serta untuk diferensiasi kalus. Eksplan yang sangat kecil sering melayang pada permukaan atas medium cair sehingga dapat mengalami difusi gas secara memadai. Organ yang lebih besar seperti tunas dapat pula tumbuh dengan baik dalam medium cair apabila ada bagian tunas yang menonjol di atas permukaan medium.

Eksplan yang tenggelam dalam medium statis dapat mati karena kekurangan aerasi. Untuk membantu agar organ atau potongan kecil jaringan tidak tenggelam di bawah permukaan medium cair yang statis diperlukan materi penunjang. Bahan

penunjang dapat berupa kertas saring (Gambar 4B) atau spons (Gambar 4C). Selain menggunakan bahan penunjang, untuk menyediakan aerasi dapat pula dilakukan penggojokan. Cara ini juga dapat mencegah sel dan agregat sel mengendap, mengurangi polaritas tumbuhan, dan memungkinkan distribusi nutrisi yang seragam.

Fase medium berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplan. *plantlet Persea americana* yang dikembangkan dari medium dua fase bersifat *hyperhidric*, stomata tidak normal, dan kapasitas pengakaran rendah; sedangkan yang dikembangkan pada medium padat mempunyai karakteristik normal (de la Vina *et al.*, 2001).

c. Lingkungan fisik kultur

Seperti yang terjadi pada kondisi alamiah, pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* juga dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan, khususnya lingkungan abiotik. Beberapa aspek lingkungan abiotik yang mempengaruhi perkembangan dan pertumbuhan eksplan adalah temperatur udara, kelembaban relatif, cahaya, ketersediaan CO₂ dan O₂.

Pada teknik kultur *in vitro* konvensional eksplan dipelihara dalam bejana yang tertutup rapat untuk mencegah kontaminasi. Oleh karena itu pengaturan lingkungan internal dalam bejana kultur dilakukan secara tidak langsung melalui pengaturan lingkungan di luar bejana (Chen, 2002).

1) Temperatur udara

Dalam lingkungan alamiah, tumbuhan biasanya mengalami fluktuasi temperatur, terutama antara siang dan malam. Pertumbuhan kultur tumbuhan dapat ditingkatkan dengan memperlebar perbedaan temperatur siang dengan malam melalui penurunan temperatur di malam hari. Penurunan temperatur malam mengurangi respirasi gelap dan membantu pertukaran gas dalam tabung kultur (Cui *et al.*, 2000). Dalam ruang yang terang, temperatur di dalam bejana kultur biasanya beberapa derajat lebih tinggi dibandingkan

temperatur kamar akibat efek rumah kaca; dan bagian dasar bejana sering lebih hangat daripada bagian atas sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan (Kozai, 1991).

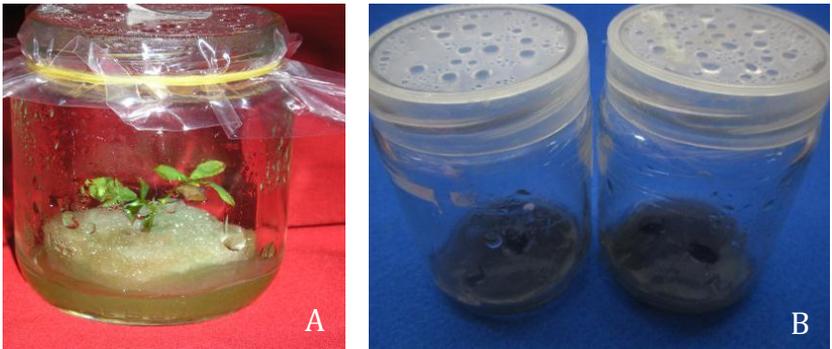
Temperatur udara di luar bejana kultur mempengaruhi secara langsung temperatur di dalam bejana (Pandey *et al.*, 2007). Fluktuasi temperatur di luar akan diikuti pula dengan fluktuasi temperatur di dalam bejana meskipun tidak berbanding lurus karena dipengaruhi oleh kelembaban udara di dalam bejana yang relatif tinggi. Oleh karena itu temperatur di ruang inkubasi tempat bejana kultur diletakkan perlu diatur agar sesuai dengan kebutuhan tumbuhan yang dipelihara.

Temperatur berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan melalui pengaruhnya terhadap aktivitas enzim. Enzim berperan sebagai biokatalisator dalam semua reaksi kimia yang terjadi di dalam sel, antara lain fotosintesis, respirasi dan sintesis protein. Sintesis protein merupakan bagian yang sangat penting karena mengekspresikan pesan-pesan dari DNA. Aktivitas-aktivitas yang terjadi pada tingkat sel tersebut membawa perubahan dalam keseluruhan bentuk dan struktur yang dikenal sebagai morfogenesis, baik pada tingkat organ maupun organisme secara keseluruhan (Taiz & Zeiger, 2010).

Enzim aktif pada rentang temperatur tertentu, yaitu antara temperatur minimum hingga maksimum. Sampai titik maksimum, semakin tinggi temperatur, semakin tinggi pula aktivitas enzim. Pada temperatur di atas titik maksimum enzim akan rusak karena protein penyusunnya mengalami denaturasi, sebaliknya pada temperatur terlalu rendah hingga titik minimum, aktivitas enzim akan menurun sehingga metabolisme berjalan lambat (Taiz & Zeiger, 2010). Hal tersebut perlu diperhatikan dalam mengatur temperatur di ruang inkubasi. Pada kultur yang bertujuan untuk perbanyakkan, temperatur diatur pada titik optimum; sedangkan bila bertujuan untuk melakukan konservasi *in vitro*, temperatur diatur di bawah titik optimum agar aktivitas enzim dan pertumbuhan dapat

dihambat (Rahayu, 2012).

Temperatur ruang inkubasi yang optimal spesifik untuk setiap spesies, namun untuk kebanyakan tanaman tropis pada umumnya berkisar 23-25°C. Temperature yang tinggi (lebih dari 25 °C) berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan eksplan. Pada temperatur tersebut kecepatan transpirasi dan respirasi relatif tinggi. Produk transpirasi berupa uap air dapat mencair menjadi titik-titik air di seluruh permukaan bejana (Gambar 5A) atau di bawah tutup tabung/botol kultur (Gambar 5B). Bila titik-titik air tersebut jatuh pada eksplan berpotensi mengakibatkan kebusukan. Selain itu respirasi juga menghasilkan energi berupa panas. Karena bejana kultur tertutup rapat maka panas akan terjebak di dalam bejana dan dapat mengakibatkan kematian jaringan tumbuhan. Oleh karena itu temperatur ruang inkubasi harus diupayakan relatif rendah.



Gambar 5. Pengembunan pada bejana kultur. A. Titik-titik air di seluruh permukaan botol (Rahayu *et al.*, 2005), B. Titik-titik air di bawah tutup botol (Rahayu *et al.*, 2011)

2) Cahaya

Cahaya di luar bejana kultur diterima secara langsung oleh eksplan karena bejana pada umumnya terbuat dari bahan gelas atau plastik putih transparan. Cahaya mempunyai tiga dimensi, yaitu kuantitas (intensitas cahaya), kualitas (panjang gelombang cahaya), dan durasi atau fotoperiodisme (rentang

waktu penerimaan cahaya selama 24 jam).

Banyak penelitian selama beberapa dekade terakhir menunjukkan bahwa variasi dalam kuantitas, kualitas dan durasi penyinaran mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan dalam kultur *in vitro*. Hal ini karena tumbuhan memiliki jaringan fotosensori yang kompleks yang berperan memantau dan menanggapi spektrum cahaya *ambient* (Folta *et al.*, 2005).

Intensitas cahaya menentukan jumlah foton atau energi yang dipancarkan yang biasanya ditunjukkan dengan satuan *lux*. Energi cahaya ini diubah menjadi energi kimia melalui proses fotosintesis untuk melakukan pertumbuhan dan perkembangan. Intensitas cahaya yang dibutuhkan tumbuhan secara umum adalah 1.000 *lux*. Intensitas cahaya dapat mempengaruhi temperatur udara sehingga harus diatur agar tidak mengakibatkan peningkatan temperatur, antara lain dengan mengatur jarak antara lampu dan botol kultur dan menggunakan lampu jenis *light emitting diodes* (LED).

Intensitas cahaya berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan *plantlet* kopi (Nguyen *et al.*, 2001), tebu (Xiao *et al.*, 2003), dan pare (Zhang *et al.*, 2009). Hasil analisis hubungan antara temperatur dan intensitas cahaya dengan beberapa parameter pertumbuhan (kecepatan asimilasi bersih, kecepatan pertumbuhan relatif, rasio berat dan luas daun) menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang signifikan antara kedua faktor lingkungan tersebut dengan semua parameter pertumbuhan (Zhang *et al.*, 2009). Oleh karena itu dalam teknik *in vitro* perlu dilakukan pengukuran intensitas cahaya yang diterima eksplan.

Panjang gelombang cahaya terutama berpengaruh dalam menentukan intensitas fotosintesis. Berbagai jenis pigmen tumbuhan, seperti klorofil, santofil, dan antosianin menyerap cahaya dengan panjang gelombang spesifik. Oleh karena itu panjang gelombang paling optimal untuk setiap jenis tumbuhan tergantung pada jenis pigmen yang dimiliki. Klorofil memiliki puncak serapan di sekitar 450 nm (cahaya biru) dan 660 nm

(cahaya merah). Karena cahaya putih terdiri atas sejumlah cahaya berwarna dengan panjang gelombang berbeda-beda maka sesuai untuk semua jenis tumbuhan (Taiz & Zeiger, 2010).

Kombinasi cahaya merah dan biru merupakan sumber cahaya yang efektif untuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan. Cahaya merah berperan dalam perpanjangan batang dan perkembangan struktur anatomi (Schuenger *et al.*, 1997). Sebaliknya, cahaya biru berperan penting dalam biosintesis klorofil, pembukaan stomata, sintesis enzim, pematangan kloroplas dan fotosintesis. Cahaya biru juga sangat diperlukan untuk pertumbuhan tumbuhan yang sehat secara morfologis (Nhut *et al.*, 2002; Nhut *et al.*, 2003). Penelitian pada berbagai tumbuhan menunjukkan bahwa panjang gelombang cahaya tertentu berpengaruh terhadap fisiologi pertumbuhan, seperti pada pisang (Nhut *et al.*, 2002), stroberi (Nhut *et al.*, 2003), dan bunga krisan (Kim *et al.*, 2004).

Durasi pemberian cahaya atau fotoperiodisme pada umumnya berpengaruh terhadap inisiasi pembungaan karena dapat menginduksi perubahan level hormon endogen atau komponen fisiologis lainnya (Adams & Langton, 2005). Pada kultur *in vitro*, durasi pencahayaan juga mempengaruhi arah perkembangan tumbuhan, antara lain pada *plantlet Rehmannia glutinosa* (Cui *et al.*, 2000). Pada sebagian besar penelitian, dua macam durasi penyinaran yang sering diteliti adalah hari pendek (8 jam) dan hari yang panjang (16 jam).

3) Kelembaban udara

Kelembaban udara merupakan besaran yang menunjukkan jumlah uap air dalam udara. Kelembaban relatif adalah jumlah uap air di udara dibandingkan dengan jumlah maksimum uap air yang dapat diikat udara tersebut pada temperatur tertentu. Kelembaban relatif ditunjukkan dalam proporsi atau persen. Sebagai contoh, udara di suatu tempat mempunyai kelembaban relatif sebesar 60% pada 27°C; ini berarti setiap kg udara mengandung 60% dari uap air

maksimum yang dapat diikat udara pada temperatur tersebut. Jadi kelembaban relatif dan temperatur udara merupakan dua faktor yang bersifat interaktif. Jumlah uap air yang terdapat di udara tergantung pada temperatur udara. Semakin tinggi temperatur udara, semakin rendah jumlah uap air.

Bejana kultur berisi nutrien yang mengandung kadar air tinggi sehingga kelembaban relatif di dalam bejana juga sangat tinggi. Karena merupakan sistem yang tertutup maka kelembaban relatif di dalam bejana menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan di dalam *green-house*.

Kelembaban relatif udara di atas medium dalam bejana kultur tergantung pada temperatur udara dan medium. Pada temperatur udara yang sama dengan temperatur medium, dalam bejana tertutup rapat kelembaban relatif secara teoritis berkisar 98,0-99,5 %. Kelembaban relatif dalam bejana kultur akan menurun jika temperatur udara lebih tinggi dibanding temperatur medium. Oleh karena itu metode yang paling efektif untuk mengurangi kelembaban relatif dalam bejana kultur adalah dengan mendinginkan rak tempat meletakkan bejana sehingga medium lebih dingin daripada udara di atasnya. Pendinginan rak dapat dilakukan dengan meletakkan campuran antigel cairan dalam pipa logam di bawah rak kultur.

Pertukaran uap air antara eksplan dengan udara di dalam bejana dan di luar bejana memainkan peran penting dalam mengatur kelembaban udara. Udara di dalam dan di luar bejana tidak berhubungan langsung sehingga kelembaban udara di dalam bejana tidak dapat diatur secara langsung dari luar. Namun karena kelembaban udara berinteraksi dengan temperatur, maka pengaturan kelembaban udara dapat dilakukan secara tidak langsung melalui pengaturan temperatur.

Kelembaban relatif 70% biasanya dianjurkan untuk ruang pertumbuhan. Kelembaban akan naik bila ruang tumbuh dilengkapi dengan unit pendingin. Oleh karena itu sebuah *humidifier* perlu ditempatkan dalam kamar pertumbuhan untuk menurunkan kelembaban.

Kelembaban yang tinggi cenderung mengakibatkan ketidaksempurnaan perkembangan fisiologi dan morfologi *plantlet*, antara lain bentuk daun abnormal, tunas *hyperhydric* (kandungan air sangat tinggi), perkembangan lapisan lilin epikutikuler sangat rendah dan stomata tidak berfungsi (Chen, 2002). Akibatnya tunas atau *plantlet* yang dihasilkan dalam kultur di bejana tertutup di bawah kelembaban tinggi sering mengalami kematian ketika dipindahkan ke lingkungan eksternal. Kematian tersebut terjadi karena *plantlet* tidak mampu beradaptasi terhadap lingkungan yang kelembabannya lebih rendah. Tingkat adaptasi dapat ditingkatkan dengan menumbuhkan tunas dalam kelembaban yang lebih rendah sebelum ditransfer ke lingkungan alamiah (Kirdmanee *et al.*, 1995; Zobayed *et al.*, 2000).

Walaupun kelembaban relatif yang tinggi mengakibatkan *plantlet* tidak adaptatif, penurunan kelembaban yang ekstrem dapat meningkatkan risiko pengeringan eksplan yang dikulturkan. Pertumbuhan tunas dan kapasitas perakaran bisa menurun secara progresif sebagai akibat penurunan kelembaban (Zobayed *et al.*, 2000).

4) Oksigen (O₂)

Semua tumbuhan membutuhkan oksigen (O₂) untuk bertahan hidup, tumbuh dan berkembang, baik dalam kondisi *in vitro* maupun *ex vitro*. Oksigen diperlukan untuk melakukan respirasi aerobik dalam rangka menghasilkan energi. Laju respirasi biasanya menurun segera setelah konsentrasi O₂ turun di bawah konsentrasi normal di udara (Taiz & Zeiger, 2010).

Pada umumnya jumlah O₂ yang memadai sangat penting untuk mendukung pertumbuhan. Jika di medium yang digunakan untuk kultur *Herreria salsaparilha*, konsentrasi O₂ berkurang di bawah tingkat kritis maka *plantlet* yang diproduksi berukuran lebih kecil (Goncalves *et al.*, 2008). Pertumbuhan akar dalam larutan hidroponik meningkat dengan aerasi, dan akar juga akan tumbuh lebih cepat jika medium cair dikocok lembut terus menerus (Kozai & Kubota, 2005c).

Di sisi lain O_2 mempunyai dampak negatif. Oksigen dapat mengakibatkan *browning* (pencoklatan) dan nekrotik pada eksplan yang berupa potongan organ. Organ yang dipotong mengeluarkan asam fenolat yang bila teroksidasi mengakibatkan kematian sel. Namun demikian beberapa peneliti mengemukakan bahwa pencoklatan jaringan dan nekrosis belum tentu merugikan morfogenesis. Afreen *et al.* (2002) menemukan bahwa embrio somatik banyak muncul berdekatan dengan daerah sel nekrotik. Kalus gembur (yang mungkin menerima lebih banyak O_2) justru kurang mampu mengembangkan klorofil.

5) Karbondioksida (CO_2)

Selain oksigen, komponen gas dari atmosfer yang berperan penting dalam kultur jaringan adalah CO_2 . Gas ini merupakan komponen utama penyusunan glukosa melalui fotosintesis. Dalam medium kultur, eksplan berkhlorofil atau *plantlet* mampu melakukan fotosintesis. Sebagai bukti, konsentrasi CO_2 dalam bejana kultur *in vitro* yang tertutup rapat turun dari 90 ppm menjadi 80 ppm setelah 2-3 jam pencahayaan (Fujiwara *et al.*, 1988). Konsentrasi CO_2 juga dapat mempengaruhi perkembangan stomata. Kadar CO_2 yang tinggi disertai temperatur yang lebih tinggi di atas optimum dapat memperbaiki karakter stomata pada mawar (Pandey *et al.*, 2007).

Bila konsentrasi CO_2 rendah peningkatan cahaya tidak akan meningkatkan *nett photosynthesis rate* (NPR) dan *plantlet* akan terdorong untuk berkembang menjadi heterotrof atau fotomiksotrof. Konsentrasi CO_2 yang rendah juga akan meningkatkan kerentanan tumbuhan terhadap stres oksidatif jika radiasi terlalu tinggi. Stres seperti ini dapat membatasi pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Kubota, 2002).

C. Keterbatasan Teknik Mikropropagasi Konvensional

Pada saat ini hasil penelitian untuk mengembangkan protokol mikropropagasi tumbuhan pertanian dan kehutanan telah berkembang luas, namun pemanfaatannya secara komersial masih terbatas. Keterbatasan ini disebabkan terutama oleh tingginya biaya investasi dan kebutuhan tenaga kerja, tingginya tingkat kontaminasi dalam kultur, dan rendahnya daya hidup *plantlet* selama aklimatisasi. Fenomena tersebut berkaitan erat dengan prinsip-prinsip dasar mikropropagasi yang menggunakan bahan organik (gula, ZPT, vitamin, dan asam amino) serta dilakukan dalam bejana kecil yang tertutup rapat.

Penggunaan bahan-bahan organik dalam medium membutuhkan biaya yang tidak kecil. Di samping itu penambahan gula sebagai sumber karbon dalam medium meningkatkan peluang kontaminasi jamur dan bakteri. Jamur dan bakteri merupakan organisme heterotrof sehingga medium yang mengandung gula dan bahan organik lain sangat mendukung pertumbuhan dan perkembangbiakannya.



Gambar 6. *Plantlet* kacang tanah hasil kultur *in vitro*. A. *Plantlet hyperhidric*, mati ketika aklimatisasi (Rahayu *et al.*, 2006). B. *Plantlet* normal, hidup vigor ketika aklimatisasi (Rahayu *et al.*, 2007).

Bejana kecil tertutup rapat yang digunakan untuk mengurangi kontaminasi membawa dampak samping pada peningkatan kelembaban relatif, penurunan konsentrasi CO₂ dan O₂, serta peningkatan etilen. Selain mendukung pertumbuhan kontaminan, kelembaban relatif yang tinggi menginduksi pertumbuhan *plantlet* yang *hyperhidric* (Gambar 6A) serta kerusakan fisiologi dan morfologi. *plantlet* yang *hyperhidric* mudah layu dan kurang adaptatif ketika dipindah ke tahap aklimatisasi sehingga tingkat kematian *plantlet* tinggi. Sebaliknya *plantlet* normal akan bersifat vigor dalam aklimatisasi (Gambar 6B).

Penurunan konsentrasi CO₂ di dalam bejana akan menurunkan pula intensitas fotosintesis. Akibatnya pertumbuhan *plantlet* menjadi tidak optimal, bahkan mungkin dapat mengakibatkan gangguan pada morfogenesis dan menginduksi terjadinya mutasi. Pada akhirnya *plantlet* yang dihasilkan abnormal dan bersifat *off-type* dibandingkan induknya.

BAB III

KULTUR FOTOAUTOTROFIK

A. Prinsip Dasar dan Perkembangan Kultur Fotoautotrofik

Beberapa keterbatasan teknik mikropropagasi yang disampaikan di depan melahirkan modifikasi yang disebut teknik fotoautotrofik. Perbedaan dengan teknik sebelumnya terutama adalah pada tipe penyediaan nutrisi. Terdapat beberapa tipe penyediaan nutrisi dalam kultur *in vitro*. Heterotrofi adalah tipe yang menyediakan karbohidrat eksogen sebagai satu-satunya sumber energy, misalnya sukrosa atau glukosa. Eksplan tanpa khlorofil tumbuh dan berkembang secara heterotrofik. Tipe yang menggunakan karbohidrat endogen sepenuhnya sebagai sumber energi disebut autotrofi. Karena karbohidrat endogen diperoleh melalui proses fotosintesis yang membutuhkan cahaya, maka autotrofi sering pula disebut sebagai fotoautotrofi. Eksplan berkhlorofil yang dipelihara dalam medium *in vitro* tanpa gula tumbuh dan berkembang secara fotoautotrofik (Kozai & Kubota, 2005a).

Di antara kedua tipe tersebut terdapat tipe kombinasi, yaitu tipe yang menyediakan nutrisi tidak hanya berupa karbohidrat endogen sebagai sumber energi melainkan juga menggunakan karbohidrat eksogen. Tipe ini disebut fotomiksotrofi. Kultur eksplan berkhlorofil yang dipelihara pada medium mengandung gula akan tumbuh dan berkembang secara fotomiksotrofik (Kozai & Kubota, 2005a; Xiao *et al.*, 2011).

Berdasarkan definisi di atas mikropropagasi fotoautotrofik adalah metode mikropropagasi yang menggunakan medium bebas gula, sehingga kebutuhan karbohidrat untuk pertumbuhan tergantung pada fotosintesis. Oleh karena itu teknik ini disebut pula sebagai mikropropagasi fotosintetik atau mikropropagasi bebas gula (Kozai & Kubota, 2005a). Dalam pemeliharaan eksplan secara fotoautotrofik, optimasi fotosintesis adalah langkah utama. Peningkatan fotosintesis dalam

kultur *in vitro* membutuhkan cahaya dan konsentrasi CO₂ yang optimal. Oleh karena itu agar mikropropagasi secara fotoautotrofik berhasil dilakukan, pemahaman tentang teknik pengendalian lingkungan *in vitro*, terutama cahaya dan CO₂, harus dikuasai.

Selain itu pemahaman tentang kapan atau pada tahap mana kultur dapat dilakukan secara fotomiksotrofik atau fotoautotrofik juga diperlukan (Kubota, 2002). Tahap inisiasi kultur yang bertujuan membebaskan patogen harus diwujudkan secara heterotrofik atau fotomiksotrofik. Sekali jaringan berkhlorofil yang dapat berfotosintesis terbentuk, maka kultur siap dipindahkan ke kondisi fotoautotrofik. Oleh karena itu sistem mikropropagasi fotoautotrofik dapat dibedakan menjadi dua tahap, yaitu 1) tahap inisiasi, dan 2) tahap multiplikasi dan pengakaran; sedangkan mikropropagasi fotomiksotrofik membutuhkan empat tahap secara terpisah, yaitu 1) inisiasi, 2) multiplikasi, 3) pengakaran, dan 4) aklimatisasi.

Konsep mikropropagasi fotoautotrofik dikembangkan melalui penelitian yang menunjukkan bahwa jaringan atau organ berkhlorofil mampu melakukan fotosintesis ketika dipelihara dalam kultur *in vitro*, dan dapat dioptimalkan dengan meningkatkan kecepatan pertukaran udara. Pada akhir 1980-an pada saat mempelajari kondisi lingkungan dalam bejana kultur *in vitro* untuk menumbuhkan *plantlet*, Fujiwara *et al.*, (1988) mengamati bahwa konsentrasi CO₂ di dalam bejana menurun tajam segera setelah periode gelap diubah menjadi periode terang. Penurunan konsentrasi CO₂ selama kultur mengalami penyinaran menunjukkan bahwa *plantlet* mampu melakukan fotosintesis dalam kultur *in vitro*. Temuan ini mengawali perkembangan konsep kultur fotoautotrofik.

Kemampuan eksplan melakukan fotosintesis di dalam kultur *in vitro* diyakinkan melalui penelitian yang mengamati pertumbuhan eksplan dalam medium dengan konsentrasi gula yang rendah. Penurunan konsentrasi sukrosa tetap dapat mempertahankan pertumbuhan *plantlet Rehmannia glutinosa*

apabila intensitas pertukaran udara dan pencahayaan ditingkatkan (Cui *et al.*, 2000); dan tetap memungkinkan fotosintesis dan transpirasi eksplan *Actidinia deliciosa* berjalan normal bila konsentrasi CO₂ ditingkatkan (Arigita *et al.*, 2002).

Pada tahun-tahun berikutnya sejumlah penelitian tentang mikropropagasi fotoautotrofik menyimpulkan bahwa *plantlet in vitro* dapat tumbuh dalam medium bebas gula apabila konsentrasi CO₂, intensitas cahaya, dan atau kapasitas pertukaran udara dalam bejana ditingkatkan. Hal tersebut dilakukan pada beberapa jenis tanaman seperti sejenis tumbuhan obat untuk gangguan syaraf *Hypericum perforatum L.* (Couceiro *et al.*, 2006), tanaman hias *Gerbera jamesonii* (Liao *et al.*, 2007), tanaman obat yang buahnya mengandung pemanis alami 300 kali lebih manis dari gula tebu dan sangat rendah kalori, yaitu *Momordica grosvenori* Swingle (Zhang *et al.*, 2009). Selain itu juga pada tanaman pangan, antara lain kentang (*Solanum tuberosum L.*) (Mohamed & Alsadon, 2010).

Dalam beberapa penelitian tersebut dihasilkan *plantlet* yang memiliki kelebihan dalam satu hingga beberapa aspek morfologi, antara lain area daun lebih luas, diameter batang lebih lebar dan sistem perakaran lebih baik. Aspek fisiologi yang meliputi kapasitas transpor elektron, kandungan klorofil, fungsi stomata, fotosintesis bersih, berat segar dan kering juga lebih tinggi dibandingkan yang ditumbuhkan dalam medium dengan gula. Selain itu kontaminasi mikroorganisme dapat ditekan dan persentase kelangsungan hidup pada kondisi *ex vitro* meningkat.

Perkembangan kultur fotoautotrofik juga didukung oleh penelitian yang mengkaji karakter fisiologi eksplan dan *plantlet* dalam berbagai kondisi yang mewujudkan kultur fotoautotrofik. Intensitas pertukaran CO₂ dan siklus pencahayaan terbukti dapat meningkatkan biomassa *plantlet* kentang (Hayashi *et al.*, 1995). Aerasi dalam medium berpengaruh positif terhadap pertumbuhan dan perkembangan ubi jalar (Afreen *et al.*, 1999), dan pengakaran beberapa spesies tanaman di Australia (Newell

et al., 2003). Pengayaan CO₂ mampu memperbaiki karakter stomata *Rosa hybrida* (Pandey *et al.*, 2007), sedangkan intensitas cahaya berpengaruh terhadap kemampuan fotosintetik dan pertumbuhan *plantlet Momordica grosvenori* (Zhang *et al.*, 2009).

Efek kondisi fotoautotrofik terhadap struktur anatomi telah diteliti pula oleh beberapa ahli. Ventilasi atau aerasi berpengaruh terhadap ultrasruktur daun eksplan *Dianthus caryophyllus* L. (Majada *et al.*, 2002) dan daun *plantlet Myrtus communis* (Lucchesini *et al.*, 2001)

Pada tahap selanjutnya optimasi produksi *plantlet* berbagai spesies tanaman dikembangkan melalui berbagai teknik. Produksi masal kopi (Afreen *et al.*, 2001), kentang (Pruski *et al.*, 2002), dan *Eucalyptus urograndis* (Tanaka *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005) dapat ditingkatkan melalui inovasi sistem kultur. Peningkatan produksi *plantlet Hypericum perforatum* (Couceiro *et al.*, 2006), *Spathiphyllum* (da Silva *et al.*, 2006), *Herreria salsaparilha* (Goncalves *et al.*, 2008) serta *Noppalea cochenilifera* (Houllou-Kido *et al.*, 2009) dilakukan dengan penggunaan bahan penutup non konvensional dan perbaikan ventilasi. Sejak itu pengembangan protokol pertumbuhan *plantlet* dalam kondisi fotoautotrofik terus berlanjut.

B. Karakteristik Kultur Fotoautotrofik

Teknik mikropropagasi fotoautotrofik diwujudkan melalui modifikasi medium dan lingkungan kultur untuk menjamin terjadinya fotosintesis yang optimal dan terbentuknya *plantlet* yang adaptatif di lingkungan *ex vitro*. Penggunaan bahan pengisi medium bersama larutan nutrien anorganik di bawah kondisi lingkungan terkendali merupakan ciri-ciri kultur fotoautotrofik (Kubota, 2002).

1. Modifikasi medium

Medium yang digunakan tidak mengandung gula (Xiao & Kozai, 2006). Untuk itu larutan nutrisi yang biasa digunakan

dalam budidaya hidroponik dapat dipilih, misalnya resep Hoagland (1950), 50% Murashige & Skoog (1962), *woody plant medium* atau WPM (Lloyd & Mc.Cown, 1981). Penggunaan agar-agar sebagai bahan pematat dikurangi atau bahkan diganti dengan substrat berpori, yaitu bahan yang mengandung pori-pori terisi udara sekalipun ketika jenuh dengan air. Tergantung pada substrat yang digunakan, pH larutan nutrisi perlu disesuaikan dalam rentang yang optimal selama periode pertumbuhan.

2. Pengendalian lingkungan fisik

Aspek-aspek lingkungan fisik yang harus dikendalikan adalah pertukaran udara dari dan ke dalam bejana, penyinaran, dan temperatur. Gas CO₂ sebagai faktor pembatas utama fotosintesis dapat ditambahkan ke dalam bejana dengan bahan kimia penghasil CO₂ atau meningkatkan pertukaran udara melalui beberapa teknik. Intensitas dan panjang gelombang cahaya perlu diatur untuk memaksimalkan NPR. Pada umumnya intensitas cahaya atau *photosynthesis photon flux (PPF)* yang diperlukan minimal 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Intensitas cahaya ini harus diukur dengan sensor kuantum dan diukur pada level tumbuhan atau pada satu individu tumbuhan secara utuh. Cahaya merah dan biru merupakan jenis cahaya yang optimal diserap oleh khlorofil sehingga sangat mendukung fotosintesis. Selain itu durasi pencahayaan juga perlu diperhatikan, tergantung pada spesies yang ditumbuh-kembangkan termasuk spesies hari panjang, hari pendek atau netral. Temperatur perlu diatur sesuai kebutuhan spesies. Untuk tumbuhan tropis pada umumnya temperatur siang 22-23°C dan temperatur malam lebih rendah, yaitu 18-21°C.

C. Kelebihan dan Keterbatasan Kultur Fotoautotrofik

Sistem mikropropagasi fotoautotrofik mempunyai kelebihan ditinjau dari aspek biologi yang berkaitan dengan kualitas *plantlet* yang dihasilkan dan dari aspek rekayasa yang berkaitan dengan proses produksi (Kubota, 2002; Kozai & Kubota,

2005a). Kelebihan aspek biologis meliputi beberapa hal, yaitu:

1. mendorong fotosintesis, pertumbuhan dan perkembangan *plantlet* yang normal,
2. menurunkan kontaminasi sehingga menurunkan pula jumlah kematian *plantlet* akibat kontaminasi. Hal ini berdampak pada peningkatan persentase hidup *plantlet* di lingkungan *ex vitro*,
3. menurunkan ketidaknormalan morfologi (seperti hiperhidrasi), fisiologi (stomata yang tidak berfungsi) dan genetik sehingga memperbaiki kualitas *plantlet*, dan
4. tidak terbentuk kalus pada bagian dasar eksplan.

Keuntungan pada bidang rekayasa adalah:

1. menggunakan zat pengatur tumbuh dan bahan organik dalam jumlah minimal,
2. menyederhanakan prosedur pengakaran dan aklimatisasi,
3. memanipulasi pertumbuhan dan perkembangan *plantlet* menjadi lebih mudah,
4. meningkatkan produktivitas tahunan per satuan luas,
5. menurunkan ongkos produksi karena menghemat tenaga kerja, dan
6. menyederhanakan system mikropropagasi sehingga memperpendek periode kultur sampai sekitar 30%.

Namun demikian, sistem ini juga mempunyai kekurangan, yaitu:

1. pengetahuan dan teknik yang dibutuhkan untuk mengendalikan lingkungan *in vitro* relatif kompleks, dan
2. pencahayaan, pengayaan CO₂ dan penurunan temperatur membutuhkan biaya awal relatif mahal.

BAB IV

MEDIUM KULTUR FOTOAUTOTROFIK

Pada hakekatnya kebutuhan tumbuhan yang dipelihara dalam kultur *in vitro* sama dengan yang dipelihara dalam kondisi alamiah. Oleh karena itu medium tumbuh dalam kultur *in vitro* mestinya identik dengan medium tumbuh alamiah yang sebagian besar berupa tanah. Komponen utama penyusun tanah adalah zarah tanah yang merupakan substrat tempat berdirinya tumbuhan dan hara mineral yang berperan sebagai nutrisi tumbuhan. Dua komponen ini perlu diadopsi dalam menentukan jenis medium untuk kultur fotoautotrofik.

1. Substrat Medium

Kemampuan membentuk akar dan melakukan fotosintesis *plantlet* biasanya dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia substrat atau bahan pengisi medium (Zobayed *et al.*, 2000). Bila agar-agar digunakan sebagai bahan pengisi medium, pertumbuhan akar beberapa tumbuhan kurang baik, akar biasanya tipis dan mudah patah. Akar-akar tersebut sering rusak sehingga mengakibatkan hambatan pertumbuhan atau kematian *plantlet* (Kozai & Kubota, 2005c). Penggunaan bahan berpori sebagai pengganti agar-agar meningkatkan konsentrasi oksigen di sekitar sistem perakaran. Hal ini meningkatkan penyerapan air dan nutrisi sehingga memperbaiki perkembangan dan anatomi akar. Oleh karena itu secara umum substrat dengan porositas udara yang baik mendorong pertumbuhan tumbuhan (Newell *et al.*, 2003).

Sistem perakaran yang dihasilkan dalam kultur *in vitro* memberikan kontribusi terhadap persentase daya hidup yang tinggi pada tahap aklimatisasi ke *green house* atau ke lapang. Oleh karena itu pemilihan bahan substrat perlu dilakukan dengan cermat. Berbagai jenis substrat dapat digunakan untuk kultur fotoautotrofik, antara lain vermikulit, *rock-wool*, *perlite*, dan *florialite*.

a. Vermikulit

Vermikulit merupakan campuran batuan mineral aluminium silikat, besi silikat dan magnesium silikat yang ringan dan memiliki bentuk seperti mika (Gambar 7A). Untuk dapat digunakan sebagai medium pertumbuhan, batuan tersebut dipanaskan pada temperatur yang sangat tinggi sehingga mengembang menjadi agregat butiran-butiran. Sebagai komponen medium tumbuh tumbuhan, vermikulit mampu memfasilitasi aerasi, pertukaran ion, dan retensi air yang tinggi. Kelebihan lainnya adalah kemampuan menyerap kelebihan hara dan melepaskan kembali secara perlahan-lahan ke tumbuhan sesuai kebutuhan. Selain itu vermikulit bersifat steril (bebas dari patogen dan hama), tidak toksik, tidak berbau, tidak menimbulkan luka pada tumbuhan, memiliki pH sekitar 7, dan tidak mudah rusak.

b. *Rockwool*

Rockwool terbuat dari bebatuan, umumnya kombinasi dari batuan *basalt*, batu kapur, dan batu bara yang dipanaskan mencapai temperatur 1.600 °C sehingga meleleh menjadi seperti lava. Dalam keadaan mencair batuan tersebut disentrifugasi membentuk serat-serat seperti kapas (Gambar 7B). Setelah dingin, kumpulan serat ini dipotong dengan ukuran yang sesuai dengan kebutuhan. Seperti vermikulit, *rockwool* juga mudah menyerap dan menahan air.

Rockwool pada awalnya dirancang untuk memfasilitasi irigasi yang harus dilakukan berkali-kali dalam produksi tumbuhan di rumah kaca. Karena *rockwool* berisi senyawa terlarut yang menghambat pertumbuhan, bahan tersebut harus dicuci sebelum digunakan. Panas tinggi dari autoklaf dapat membantu pengeluaran senyawa penghambat. Potongan *rockwool* berbentuk kubus direndam dalam air, dipanaskan dalam autoklaf selama 15 menit, dan dibiarkan sehingga mencapai temperatur yang aman. Kemudian dialiri air lagi dan ditiriskan selama 10 menit pada temperatur kamar. Cara ini biasanya cukup untuk menghilangkan senyawa penghambat tapi

mungkin perlu diulang-ulang. Setelah itu ditempatkan dalam oven kering untuk pengeringan dan selanjutnya siap untuk digunakan.

c. *Florialite*

Floriate adalah campuran vermikulit and serat selulosa. Afreen *et al.* (2001) membandingkan pertumbuhan akar *plantlet* ubi rambat yang dikultur pada beberapa macam bahan yang berbeda, yaitu *florialite*, vermikulit, *gellan gum*, dan agar-agar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *plantlet* yang ditumbuhkan pada *florialite* dengan medium cair membentuk akar cabang yang lebih banyak dibandingkan yang lain. Sistem perakaran yang berkembang baik membantu penyerapan air dan mineral dan mendorong pertumbuhan *plantlet* secara menyeluruh.

d. *Perlite*

Perlite (Gambar 7C) merupakan media tanam yang dibuat dari batuan silika yang dipanaskan pada temperatur tinggi. *Perlite* memiliki aerasi yang bagus, pH netral dan bobot yang sangat ringan (mirip busa/*styrofoam*). *Perlite* memiliki daya serap air cukup baik sehingga sesuai untuk perakaran. Dalam penggunaannya, biasanya dicampur dengan media tanam lain seperti *cocopeat* atau *vermiculite* dengan perbandingan tertentu.

Pada *Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau', 100% tunas dapat diakarkan apabila menggunakan bahan pengisi vermikulit, sedangkan bila menggunakan agar keberhasilan induksi akar hanya kurang dari 30% (Chaum *et al.*, 2011). *Rockwool* dapat digunakan dengan baik untuk induksi akar *Spathiphyllum* (Tanaka *et al.*, 1992).

Plantlet yang ditumbuhkan pada bahan pengisi medium yang berpori mempunyai daya hidup yang baik setelah dipindahkan ke lingkungan *ex vitro*. Terdapat korelasi antara perbaikan sistem perakaran, peningkatan pertumbuhan dan persentase daya hidup pada berbagai tanaman, seperti *Acacia mangium* dan *Garcinia mangostana* (Ermayanti *et al.*, 1999),

Brassica oleracea L. (Zobayed *et al.*, 2000), *Coffea arabusta* (Nguyen *et al.*, 1999, 2001), dan *Eucalyptus* (Zobayed *et al.*, 2001), dan *Hypericum perforatum* L. (Couceiro *et al.*, 2006). Tumbuhan berkayu pada umumnya sulit membentuk akar. Oleh karena itu bahan pengisi medium seperti vermikulit atau *florialite* akan menguntungkan jika digunakan.



Gambar 7. Berbagai macam bahan substrat medium kultur fotoautotrofik. A. Vermikulit, B. *Rockwool*, C. *Perlite*

2. Nutrien Anorganik

Dalam tipe penyediaan nutrisi fotoautotrofi tumbuhan tumbuh tanpa tambahan senyawa organik eksogen. Bila didefinisikan secara sempit, medium di dalam mikropropagasi fotoautotrofik harus tidak mengandung senyawa organik apapun. Seperti pada budidaya hidroponik, medium kultur fotoautotrofik hanya terdiri atas senyawa anorganik. Vitamin, zat pengatur tumbuh, dan senyawa pematid tidak ditambahkan.

Tumbuhan membutuhkan 16 senyawa nutrisi untuk pertumbuhan, yaitu karbon (C), hidrogen (H), oksigen (O), fosfor (P), kalium (K), nitrogen (N), sulfur (S), kalsium (Ca), besi (Fe), magnesium (Mg), boron (B), mangan (Mn), tembaga (Cu), seng (Zn), molibdenum (Mo), dan khlor (Cl). Senyawa-senyawa tersebut dapat diperoleh tumbuhan dari udara, air, dan medium. Kunci keberhasilan pemberian nutrisi adalah kepastian bahwa semua nutrisi tersedia dengan konsentrasi yang memadai sepanjang siklus hidup tumbuhan. Kekurangan atau kelebihan suatu senyawa nutrisi dapat mengakibatkan abnormalitas

morfologi. Jumlah hara yang berlebih menimbulkan masalah karena toksik terhadap sel (Taiz & Zeiger, 2010).

Konsentrasi nutrisi yang dibutuhkan tumbuhan bervariasi tergantung pada fase pertumbuhan dan kondisi lingkungan. Resep nutrisi anorganik yang sangat populer digunakan adalah larutan Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Larutan Hoagland menyediakan setiap jenis nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan sesuai untuk pertumbuhan berbagai macam spesies.

Tabel 1. Perbandingan komposisi senyawa nutrisi anorganik resep Hoagland, MS, WPM, dan Gamborg-B5

Komponen senyawa	Kadar senyawa (ppm)			
	Hoagland	MS	WPM	Gamborg-B5
Senyawa makro				
NH ₄ NO ₃	850,00	1.650,00	400,00	-
KNO ₃	210,00	1.900,00	-	2500,00
Ca(NO ₃) ₂	-	-	386,00	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	200,00	440,00	72,50	113,24
KH ₂ PO ₄	31,00	170,00	170,00	-
KHSO ₄	-	-	990,00	-
(NH ₄) ₃ PO ₄	-	-	-	150,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	134,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	48,00	370,00	180,70	122,09
Senyawa mikro				
H ₃ BO ₃	0,50	6,20	6,20	3,00
Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0,10	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0,025	-	0,025
KI	-	0,83	-	0,75
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,50	16,90	22,30	10,00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05	8,60	8,60	2,00
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,02	0,025	0,25	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 – 5,00	27,80	27,85	27,80
Na ₂ EDTA	-	37,30	37,30	37,26

Resep Hoagland tersebut telah dimodifikasi beberapa kali, terutama penambahan besi terkhelat Selain resep Hoagland, dapat pula digunakan resep medium dasar MS (Murashige & Skoog, 1962), WPM (Lloyd & McCown, 1980), atau Gamborg-B5 (Gamborg & Shyluk, 1981). Medium dasar adalah

komposisi medium yang hanya terdiri atas senyawa anorganik tanpa zat organik yang sesungguhnya merupakan komponen integral formula tersebut. Komposisi senyawa dalam formula-formula berbeda-beda. Pada resep Hoagland tidak terdapat senyawa kobalt-klorida, kalium-iodida, dan natrium-EDTA (Tabel 1).

Sebelum menentukan resep nutrisi anorganik, perlu dilakukan analisis air di laboratorium. Tiga hal utama yang perlu diperhatikan dalam analisis air adalah alkalinitas, konduktivitas listrik, dan konsentrasi elemen tertentu. Alkalinitas mencerminkan ukuran kemampuan air untuk menetralkan asam, yang biasanya ditunjukkan dalam konsentrasi kalsium karbonat (CaCO_3). Nilai alkalinitas berkisar dari 0 (dalam air murni atau air yang diberi perlakuan *reverse-osmosis*) hingga lebih dari 300 ppm CaCO_3 . Semakin besar alkalinitas air, semakin tinggi pH dan semakin tinggi pula daya larut nutrisi.

Nilai alkalinitas air jauh lebih penting dari pada angka pH karena alkalinitas merupakan ukuran efek pH yang berlangsung dalam jangka panjang. Dengan mengetahui nilai alkalinitas dapat ditentukan strategi pemberian nutrisi dengan tepat, yaitu formula dengan bentuk nitrogen yang bersifat asam (amonium atau urea) ataukah basa.

Konduktivitas listrik adalah ukuran jumlah total garam terlarut, termasuk elemen esensial dan elemen non-esensial (seperti natrium). Oleh karena itu, konduktivitas listrik merupakan ukuran kasar kemurnian sumber air. Analisis air laboratorium juga penting untuk mengetahui kandungan unsur dan kontaminan dalam air. Natrium dan klorida adalah kontaminan yang umum ditemui di beberapa perairan; idealnya konsentrasinya masing-masing harus kurang dari 50 dan 70 ppm.

Tergantung pada kondisi lingkungan eksternal, air suling steril perlu ditambahkan pada medium agar-agar setelah beberapa minggu kultur. Hal ini bertujuan untuk mengembalikan kehilangan air akibat penguapan. Kehilangan

air mungkin tidak tampak secara visual, tetapi mungkin pula tampak nyata. Jumlah kehilangan air dapat diperkirakan dengan membandingkan berat bejana setelah 2-3 minggu dengan berat awal. Perubahan berat dapat diduga sebagai jumlah kehilangan air. Untuk menambahkan air, harus dilakukan di ruang bersih dan menggunakan teknik steril. Lepaskan perekat, lepaskan penutup dan tambahkan 2-4 ml air suling steril menggunakan pipet dengan ujung pipet steril. Gunakan tutup baru untuk menutup bejana dan dikembalikan ke ruang pertumbuhan.

BAB V

PENGENDALIAN LINGKUNGAN FISIK DALAM KULTUR FOTOAUTOTROFIK

Sebuah bejana kultur dapat diibaratkan sebagai sebuah *greenhouse* atau ruang tumbuh dalam ukuran kecil dan eksplan yang ditumbuhkan dapat dianggap sebagai stek mini. Meskipun demikian, lingkungan fisik dalam bejana kultur *in vitro* konvensional benar-benar berbeda dengan *greenhouse*. Lingkungan fisik kultur *in vitro* konvensional, menurut Aitken-Christie *et al.* (1995), secara khusus ditandai dengan kelembaban relatif yang tinggi, temperatur yang konstan, *photosynthetic photon flux density* (PPFD) yang rendah, fluktuasi CO₂ diurnal yang besar, konsentrasi gula, garam dan ZPT dalam medium yang tinggi, dan adanya akumulasi senyawa toksik.

Penggunaan bejana tertutup dalam mikropropagasi konvensional sepenuhnya memisahkan lingkungan *in vitro* (Li) dari lingkungan *ex vitro* (Le). Lingkungan *in vitro* secara langsung maupun tidak langsung dapat dipengaruhi oleh Le. Bila terdapat sistem pertukaran gas, lingkungan udara *in vitro* dapat berhubungan langsung dengan Le. Tingkat pengaruh Le terhadap Li sangat tergantung pada intensitas pertukaran gas antara kedua lingkungan tersebut. Dengan mengendalikan Le, Li dapat diatur secara langsung maupun tidak langsung, walaupun mungkin tidak secara otomatis.

Lingkungan *in vitro* mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan *plantlet* sepanjang periode kultur. Oleh karena itu faktor-faktor tersebut harus dikendalikan pada tahap awal dan selama periode kultur agar dapat memperoleh hasil yang maksimal. Berbeda dengan faktor kimia, sebagian besar faktor fisik dapat dipertahankan pada titik yang diinginkan mulai awal hingga akhir periode kultur.

1. Pengendalian Faktor Cahaya

Terdapat berbagai jenis sumber cahaya buatan yang dapat digunakan dalam ruang tumbuh kultur *in vitro*, antara lain

lampu neon (*fluorescent*), lampu sodium tekanan tinggi, lampu halida logam, lampu pijar, dan sebagainya. Lampu-lampu tersebut memancarkan foton pada rentang spektrum yang luas, yaitu antara 350-750 nm yang sesuai dengan kebutuhan umum kultur *in vitro*, serta memberikan distribusi horizontal yang relatif seragam di seluruh ruang kultur. Di antara beberapa jenis lampu tersebut, lampu neon paling populer digunakan di ruang kultur *in vitro*.

Rentang panjang gelombang yang lebar pada lampu neon tidak sepenuhnya perlu dan kurang memacu pertumbuhan tumbuhan. Selain itu jenis lampu tersebut memakan banyak daya listrik dan menghasilkan panas di ruang tumbuh kultur *in vitro*. Akibatnya kultur tidak dapat ditempatkan dekat dengan sumber cahaya karena akan menjadi rusak atau mengalami stres panas.

Sistem pencahayaan yang ideal untuk kultur *in vitro* adalah yang mampu memberikan cahaya pada area spektrum yang dibutuhkan untuk terjadinya fotosintesis (Seabrook, 2005), direspon oleh fotoreseptor (Bourget, 2008), dan lebih efisien secara komersial (Bourget, 2008; Yeh & Chung, 2009). Tipe lampu *light emitting diodes* (LED) berbasis iluminator merupakan alternatif lampu neon yang mempunyai spektrum khusus yang dapat memenuhi kebutuhan spesifik tumbuhan (Tamulaitis *et al.*, 2005).

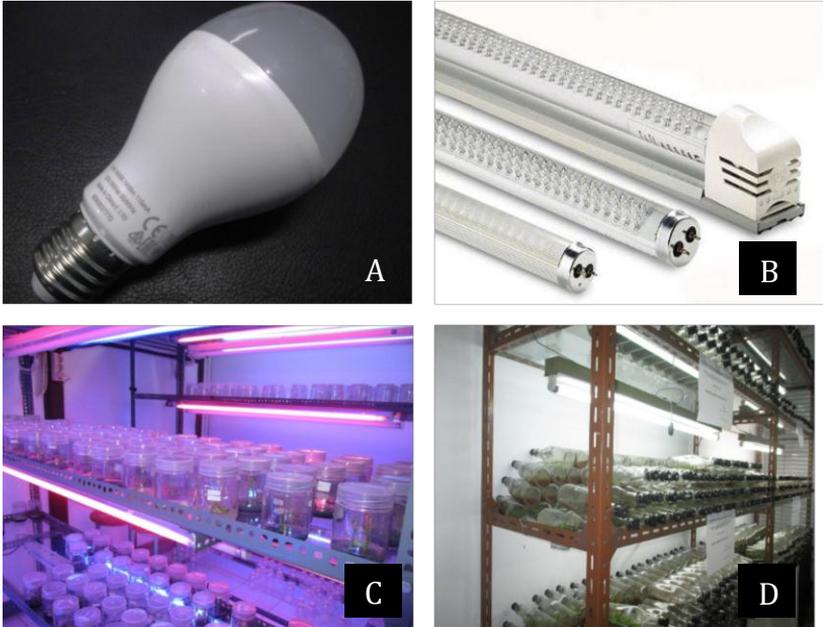
Sistem penyinaran LED dengan bahan semi-konduktor yang canggih, intensitas cahaya yang lebih terang, dan harga yang lebih murah menjadikan LED sebagai sumber cahaya yang tepat untuk sistem kultur di masa kini dan masa depan (Gupta & Jatothu, 2013). Jenis lampu ini memiliki beberapa keunggulan yang sangat penting, yaitu memiliki kekhususan panjang gelombang, awet, berukuran kecil, pancaran cahaya relatif dingin, *output* foton linier dengan arus masukan listrik, dan mampu mengendalikan komposisi spektrum (Tamulaitis *et al.*, 2005, Hogewoning *et al.*, 2007).

Sebagai sumber cahaya LED dapat digunakan dalam ruang kultur *in vitro* untuk memenuhi kebutuhan sebagian atau semua kebutuhan cahaya. Kontrol mekanis LED memungkinkan pengaturan kualitas spektrum cahaya, tingkat PPF, dan durasi penyinaran bersama-sama dengan parameter fisik lingkungan *in vitro* lainnya. Strategi distribusi cahaya di ruang kultur yang menggunakan LED dengan karakteristik optik khusus dapat meningkatkan produksi tumbuhan, bahkan LED dengan PPF rendah. Penggunaan PPF rendah dapat dikompensasikan dengan penyinaran lebih lama dan atau konsentrasi CO₂ lebih tinggi (Folta *et al.*, 2005).

Kekhususan panjang gelombang LED juga dapat digunakan untuk mempelajari sifat fisiologi dan morfologi tumbuhan (Yeh & Chung, 2009). Berbagai perubahan fisiologi dan atau morfologi, misalnya, peningkatan fotosintesis (Heo *et al.*, 2006.), modulasi morfogenesis (Kurilcik *et al.*, 2008), dan induksi pembungaan (Dewir *et al.*, 2006) dapat diinduksi di bawah pencahayaan LED.

Untuk mengendalikan fotomorfogenesis, digunakan LED yang menghasilkan cahaya biru, merah atau infra merah yang dapat memodulasi respon fitokrom. Jenis LED merah memberikan kontribusi untuk fotosintesis (Okamoto *et al.*, 1996), menunda penuaan (Rousseaux *et al.*, 1997), mempercepat de-etiolasi (Yadav *et al.*, 2002), dan meningkatkan pertumbuhan akar (Usami *et al.*, 2004). Perkembangan, akumulasi karbohidrat dan pigmen stroberi varietas 'Elkat' meningkat bila ditanam di bawah LED merah dan biru. Induksi pemanjangan batang baik batang yang berbunga maupun seluruh batang tumbuhan; dan rasio batang/akar yang lebih tinggi dapat diapcu oleh LED merah (Samuoliené *et al.*, 2010).

Dalam hampir semua penelitian, iradiasi LED dengan panjang gelombang tertentu terbukti meningkatkan mikropropagasi beberapa spesies tumbuhan (Lian *et al.*, 2002; Nhut *et al.*, 2003; Jao *et al.*, 2005; Heo *et al.*, 2006).



Gambar 8. Pencahayaan dalam ruang kultur. A. Lampu LED bentuk bolam, B. Lampu LED bentuk tabung, C. Ruang kultur dengan pencahayaan merah (Rahayu & Habibah, 2014), D. Ruang kultur dengan pencahayaan putih (Rahayu & Sumadi, 2015),

2. Pengendalian Konsentrasi Gas (O_2 dan CO_2)

Komponen udara yang berperan dalam metabolisme tumbuhan terutama adalah gas O_2 dan CO_2 . Seperti pada tumbuhan yang hidup di alam, gas-gas tersebut diperoleh melalui mekanisme difusi. Eksplan memperoleh gas-gas yang dibutuhkan dari udara di atas medium dalam bejana kultur dan dari medium.

Intensitas difusi dalam bejana kultur dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut adalah 1) gradien konsentrasi gas antara bagian dalam dan luar bejana, 2) gradien tekanan udara dan temperatur antara bagian dalam dan luar bejana; dan 3) kecepatan dan pola pergerakan udara di sekitar bejana. Kecepatan difusi atau pertukaran udara suatu bejana kultur dalam kondisi alamiah ditunjukkan dengan parameter

yang disebut jumlah pertukaran udara per jam (Fujiwara *et al.*, 1988; Kozai & Kubota, 2005b).

Konsentrasi gas di dalam bejana kultur juga dipengaruhi oleh beberapa faktor. Tiga faktor utama yang mempengaruhi konsentrasi gas adalah 1) bejana (volume dan bentuk bejana, permeabilitas dan luas membran tutup bejana); 2) *plantlet* (biomasa, jumlah, karakteristik fotosintetik *plantlet*); dan 3) lingkungan ruang kultur (konsentrasi gas dalam ruang kultur, intensitas cahaya, dan kecepatan pergerakan udara).

Konsentrasi O₂ di udara ambien biasanya sekitar 21% (volume). Konsentrasi ini dapat ditingkatkan dengan menggunakan pompa udara di luar bejana. Peningkatan konsentrasi O₂ di dalam bejana dapat mengikuti peningkatan tersebut bila digunakan tutup dari bahan membran yang permeabel terhadap gas. Dalam kultur yang tertutup rapat konsentrasi dapat menurun drastis karena penggunaan O₂ oleh kultur mengakibatkan defisit lokal. Defisit tersebut tidak dapat segera dikompensasi karena hambatan difusi bila penutupan bejana sangat rapat.

Laju difusi O₂ dari udara di dalam bejana ke dalam jaringan eksplan akan berlangsung optimal bila eksplan terpapar dalam atmosfer bejana dan tidak tenggelam. Apabila eksplan tenggelam, O₂ diperoleh dari gas yang terlarut di dalam medium kultur. Oksigen hanya sedikit terlarut dalam air, dan dalam medium kultur *in vitro* daya larutnya lebih rendah karena fenomena yang disebut 'efek penggaraman'. Garam terlarut dan senyawa non-elektrolit seperti sukrosa yang terkandung dalam medium mengurangi kelarutan gas. Selain itu, konsentrasi O₂ dalam medium kultur *in vitro* biasanya tidak akan mencapai tingkat jenuh.

Dibandingkan melalui udara, O₂ berdifusi jauh lebih lambat melalui air. Difusi O₂ dari medium cair ke dalam jaringan tumbuhan terhambat akibat tekanan antar muka air-jaringan. Resistensi untuk difusi berkurang jika air atau medium diaduk atau dikocok (Ober & Sharp, 2003). Oleh karena itu penyerapan

O₂ terjadi sangat lambat pada jaringan yang terendam di kedalaman berapapun.

Konsentrasi CO₂ *ambient* di lingkungan alamiah adalah 0,03%. Dalam bejana tertutup konsentrasi CO₂ menurun drastis pada saat ada cahaya. Oleh karena itu agar fotosintesis tetap berjalan optimal konsentrasi CO₂ harus ditingkatkan.

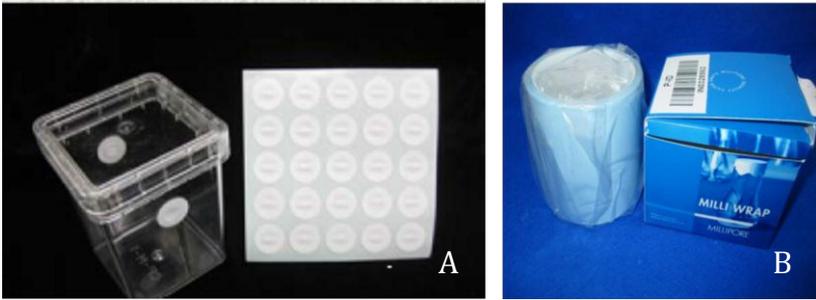
Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, untuk mengoptimal pertumbuhan dan perkembangan eksplan, konsentrasi O₂ dan CO₂ dalam bejana perlu ditingkatkan. Ada beberapa teknik peningkatan konsentrasi gas, yaitu melalui penggunaan bahan penutup, bahan bejana, *forced ventilation* (pertukaran udara yang diperkuat), dan penambahan senyawa kimia penghasil CO₂.

a. Menggunakan bahan penutup yang permeabel terhadap gas

Tanpa memperhatikan ukuran bejana, hampir semua bejana kultur sebenarnya tidak benar-benar tertutup rapat. Seberapapun kecilnya ada celah di antara mulut bejana dengan tutup yang memungkinkan terjadinya difusi. Namun demikian difusi ini tidak dapat memenuhi kebutuhan secara memadai. Oleh karena itu bahan penutup dipilih yang permeabel terhadap gas namun tidak terhadap mikroorganisme kontaminan.

Selama ini berbagai jenis bahan yang biasa digunakan untuk tutup bejana kultur jaringan adalah *aluminium foil*, logam, dan plastik (Zobayed *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2005). Bahan-bahan tersebut tidak permeabel terhadap gas. Bahan penutup khusus yang permeabel terhadap gas antara lain film *micro-polypropylene* dan filter mikropori dengan ukuran pori 0,5 µm. Filter ini tersedia dalam bentuk potongan berbentuk bulat (Gambar 9A) atau lembaran (Gambar 9B).

Kozai (2007) menemukan bahwa pertukaran udara per jam dalam bejana yang ditutup dengan *aluminium foil* paling kecil dibandingkan dengan yang ditutup plastik atau *micro-polypropylene*. Dengan menggunakan membran yang permeabel terhadap gas, difusi udara alami dalam bejana kultur dapat ditingkatkan (Cui *et al.*, 2000; Kitaya *et al.*, 2005).



Gambar 9. Filter mikropori. A. Berbentuk potongan-potongan bulat, B. Berbentuk lembaran (Rahayu & Sumadi, 2015)

Sejumlah penelitian menunjukkan manfaat penggunaan membran yang permeabel terhadap gas. Peningkatan pertukaran udara bejana mengoptimalkan pertumbuhan dan kualitas *plantlet* pisang (Nguyen & Kozai, 2001), tebu (Xiao *et al.*, 2003), *Myrtus communis* L (Lucchesini *et al.*, 2001), *Gerbera jamesonii* L. (Liao *et al.*, 2007) dan *Momordica grosvenori* (Zhang *et al.*, 2009).

b. Menggunakan bejana dari bahan yang permeabel terhadap gas

Sebagai pengganti bejana yang terbuat dari plastik dan kaca, beberapa ahli mengembangkan bejana kultur yang terbuat dari lembaran film untuk memfasilitasi penerapan kultur fotoautotrofik. Karena film mempunyai permeabilitas gas yang tinggi, lingkungan udara di dalam bejana kultur ditingkatkan melalui pertukaran udara alami antara di dalam dan di luar bejana.

Tanaka *et al.* (1992) mengembangkan bejana kultur yang terbuat dari polimer-pentana dan polipropilena yang disebut Vitron. Vitron terdiri dari bingkai tiga dimensi yang terbuat dari polipropilena dengan bahan penutup dari film polimer-pentana yang tahan panas di semua sisi kecuali bagian penutup. Penutup bejana terbuat dari polikarbonat.

Dengan menggunakan bejana Vitron pertumbuhan dan kualitas *plantlet Eucalyptus* yang dikultur dalam medium cair

bebas gula sangat meningkat (Tanaka *et al.* 2005). DaSilva *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa pertumbuhan terbaik dari *Spathiphyllum* cv. Merry diperoleh pada kultur *plantlet* di medium cair bebas gula menggunakan bejana Vitron.

Selanjutnya Tanaka *et al.* (1998) mengembangkan lagi bejana kultur yang disebut "*culture-pack*" (CP). Fitur penting CP adalah kemampuannya mentransmisikan cahaya yang lebih tinggi. Sistem CP terbukti cocok untuk pertumbuhan di bawah kondisi CO₂ diperkaya dengan intensitas cahaya rendah (45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) dalam medium bebas gula pada *Spathiphyllum* (Tanaka *et al.*, 1992), *Azadirachta excelsa* (Kool *et al.*, 1999), pisang (*Musa* spp.) (Nhut *et al.*, 2002), dan stroberi (Nhut *et al.*, 2003).

Pada PPF yang relatif rendah 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, beberapa tumbuhan tersebut dapat mencapai tingkat fotosintesis bersih yang tinggi. Bila menggunakan PPF tinggi maka biaya listrik untuk penerangan juga tinggi dan terbentuk panas tambahan di ruang kultur, sehingga memerlukan mekanisme pendinginan yang meningkatkan biaya tambahan.

c. Forced ventilation pada bejana besar

Forced ventilation adalah metode pertukaran udara yang melibatkan penggunaan kekuatan mekanik untuk menambah udara. Penambahan dilakukan melalui pompa atau kompresor udara untuk menghembuskan campuran udara tertentu secara langsung ke dalam bejana. Pemompaan dilakukan melewati filter mikroporus untuk mencegah masuknya mikroorganisme. Dengan system ini komposisi gas (CO₂, uap air, dan lain-lain) yang masuk dan kecepatannya dapat dikendalikan relatif tetap (Jeong *et al.*, 1995; Kozai & Zobayed, 2000).

Forced ventilation dapat dengan mudah dikontrol selama masa produksi dengan menggunakan pengatur aliran udara. Kontrol pertukaran udara merupakan bagian penting untuk mencapai kondisi optimal pertumbuhan *plantlet*. Tingkat pertukaran udara harus disesuaikan dengan besarnya tingkat fotosintesis bersih *plantlet* di dalam bejana kultur sehingga

memaksimalkan pertumbuhan (Kozai & Kubota, 2005b).

Untuk meningkatkan efisiensi, beberapa ahli menerapkan sistem *forced ventilation* dalam suatu bejana yang berukuran besar. Fujiwara *et al.* (1988) menggunakan sistem *forced ventilation* dalam bejana kultur berukuran 60 cm x 30 cm x 10 cm. Gas CO₂ dipompa ke dalam bejana dengan kecepatan tertentu. Hal ini mirip dengan sistem mikro-hidroponik aseptik dengan sistem kontrol nutrisi. Heo & Kozai (1999) memodifikasi sistem yang dikembangkan Fujiwara (1988) dengan menggunakan bejana berisi nampan multisel yang banyak digunakan untuk produksi bibit. Sel-sel diisi dengan medium vermikulit atau selulosa steril.

Dengan sistem ini pertumbuhan fotoautotrofik ubi jalar (*Ipomoea batatas*) beberapa kali lebih besar dibandingkan pertumbuhan pada kondisi fotomiksotrofik dengan tabung kultur konvensional kecil yang mengandung gula dan dengan pertukaran udara alami (Heo & Kozai, 1999). Zobayed *et al.* (2000) dan Heo *et al.* (2001) menyempurnakan penerapan *forced ventilation* dalam bejana besar dengan menambahkan pipa distribusi udara. Tujuan utama sistem ini adalah untuk memberikan pola pertukaran udara yang memungkinkan distribusi konsentrasi CO₂ dan kelembaban relatif yang seragam. Dengan demikian pertumbuhan *plantlet* juga seragam.

Kelayakan sistem *forced ventilation* telah diuji pada *Eucalyptus* (Zobayed *et al.*, 2000, 2001) dan *Coffea* (Nguyen *et al.*, 2001). Fotosintesis bersih meningkat, stomata menutup dan membuka secara normal, dan kandungan lilin epikutikular pada daun secara signifikan lebih tinggi dibandingkan yang terjadi pada kultur fotomiksotrofik konvensional (Zobayed *et al.*, 2001).

Sistem *forced ventilation* menggunakan lima bejana kultur besar (volume masing-masing 120 liter) berhasil meningkatkan produksi komersial *plantlet Zantedeschia elliottiana*. Periode kultur untuk memproduksi *plantlet* dalam sistem tersebut berkurang 50%, dibandingkan dengan sistem

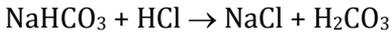
konvensional fotomiksotrofik. Persentase hidup *plantlet* yang dihasilkan sistem inovatif ini adalah 95%, sedangkan yang dihasilkan sistem konvensional hanya 60% (Xiao & Kozai, 2004).

Sistem *forced ventilation* juga telah diterapkan untuk produksi komersial *plantlet* gerbera (Xiao *et al.*, 2005). Dibandingkan pada *plantlet* yang tumbuh pada kultur konvensional; jumlah daun, luas daun, berat kering batang dan akar dari *plantlet* yang tumbuh pada kultur dengan sistem *forced ventilation* masing-masing 1,7; 5,2; 4,6; dan 3,8 kali lebih besar. Tingkat fotosintesis bersih dan kandungan klorofil masing-masing 9,2 dan 2,2 kali lebih besar. Persentase pembentukan akar secara *in vitro* dan persentase kelangsungan hidup dalam lingkungan *ex vitro* masing-masing 98% dan 95% untuk sistem *forced ventilation*, dan 62% dan 57% untuk sistem konvensional. Oleh karena itu, sistem *forced ventilation* dapat digunakan untuk menghasilkan sejumlah besar *plantlet* berkualitas tinggi dengan sistem yang sederhana.

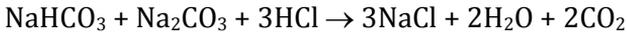
d. Menggunakan senyawa penghasil CO₂

Selain menggunakan bahan bejana dan penutup yang permeabel terhadap gas serta bejana besar dengan *forced ventilation*, pengayaan CO₂ dapat pula dilakukan dengan menggunakan bahan kimia yang menghasilkan CO₂ di dalam ruang kultur, seperti NaHCO₃ atau Na₂CO₃ (Vyas & Purohit, 2006; Rahayu & Habibah, 2014).

Secara teoritis, NaHCO₃ dan Na₂CO₃ hanya dapat menghasilkan gas CO₂ bila dalam kondisi asam, oleh karena itu penggunaannya harus ditambah asam, misalnya HCl. Senyawa Na₂CO₃ lebih sulit menghasilkan gas CO₂ bila dibandingkan dengan NaHCO₃ karena Na₂CO₃ membutuhkan 2H⁺ untuk membentuk H₂CO₃, sehingga asam yang digunakan harus lebih banyak atau lebih kuat. Garam (sebagai hasil samping) yang dihasilkan-pun lebih banyak dengan hasil CO₂ yang sama.



NaHCO_3 dan Na_2CO_3 dapat digunakan bersamaan, dengan reaksi sebagai berikut.



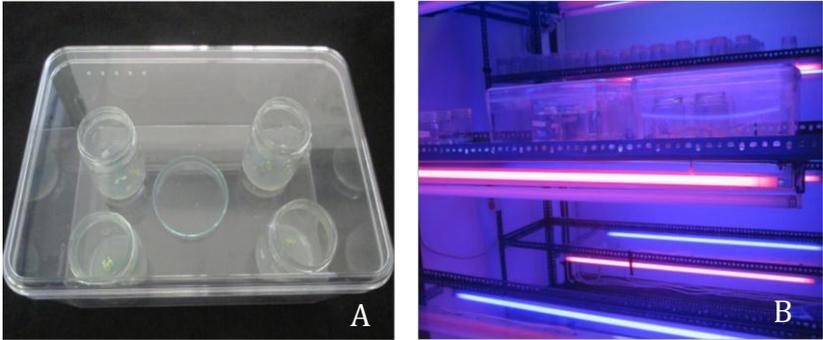
Berdasarkan reaksi di atas, bila NaHCO_3 dan Na_2CO_3 digunakan bersamaan perbandingan koefisien masing-masing untuk NaHCO_3 , Na_2CO_3 , HCl , dan CO_2 yang dihasilkan adalah 1:1:3:2. Perbandingan tersebut dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan jumlah NaHCO_3 dan Na_2CO_3 bila diinginkan kadar CO_2 tertentu (Tabel 2) (Rahayu & Habibah, 2014).

Tabel 2. Perbandingan NaHCO_3 , Na_2CO_3 , dan HCl yang digunakan untuk menghasilkan berbagai kadar CO_2

Perbandingan senyawa (M)				Perbandingan senyawa (g/l)			
NaHCO_3	Na_2CO_3	HCl	CO_2	NaHCO_3	Na_2CO_3	HCl	CO_2
0,007	0,007	0,021	0,014	0,588	0,742	0,756	0,60
0,068	0,068	0,204	0,136	5,712	7,208	7,344	6,00

- berat molekul CO_2 , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , dan HCl berturut-turut adalah 44, 84, 106, dan 36

Campuran senyawa-senyawa tersebut dimasukkan dalam cawan petri yang diletakkan di antara beberapa botol kultur yang terbuka di dalam kotak akrilik tertutup (Gambar 10A). Botol-botol kultur ditanami eksplan diletakkan di dalam kotak akrilik steril yang telah diatur kadar CO_2 -nya, kemudian ditutup rapat sedemikian sehingga tidak berhubungan dengan udara luar. Kotak-kotak akrilik diletakkan di dalam ruang inkubasi yang diberi pencahayaan merah dan biru (Gambar 10B).



Gambar 10. Penambahan CO₂ melalui bahan kimia penghasil CO₂, A. Bejana kultur terbuka dan petridish berisi NaHCO₃ atau Na₂CO₃ di dalam kotak akrilik (Rahayu & Habibah, 2014). B. Kotak-kotak akrilik diletakkan di bawah cahaya merah dan biru (Rahayu & Habibah, 2014).

3. Pengendalian Kelembaban Udara Relatif dan Temperatur

Dalam sistem kultur *in vitro* konvensional, kelembaban udara relatif di dalam bejana dapat mencapai 95%-100%. Kondisi ini mengakibatkan abnormalitas morfologi dan fisiologi *plantlet*. Penurunan kelembaban relatif terbukti meningkatkan transpirasi sehingga meningkatkan pula serapan air dan hara eksplan (Aitken-Christie *et al.*, 1995), meningkatkan pembentukan lilin kutikula dan fungsi stomata, serta memperbaiki toleransi terhadap stres air (Zobayed *et al.*, 2001).

Oleh karena itu kelembaban udara dalam bejana kultur perlu diturunkan. Dalam kondisi ventilasi alamiah, kelembaban udara di dalam bejana ditentukan oleh dua faktor utama, yaitu 1) aktivitas metabolik dan luas area daun, dan 2) pertukaran udara antara bagian dalam dan luar bejana (ruang kultur).

Untuk menurunkan kelembaban udara, faktor pertama yang perlu diperhatikan adalah kepadatan eksplan dalam bejana kultur. Jumlah eksplan yang ditanam diupayakan tidak terlalu padat, apalagi eksplan yang aktivitas metaboliknya tinggi dan dengan banyak daun. Respirasi dan transpirasi yang dilakukan jaringan eksplan mengeluarkan uap air dan berakibat

meningkatkan kelembaban udara di dalam ruang kultur.

Faktor kedua adalah kapasitas pertukaran udara ke luar bejana. Hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan bejana dan atau tutupnya yang terbuat dari bahan yang permeabel terhadap gas. Dengan demikian uap air yang terakumulasi di dalam atmosfer bejana dapat berdifusi ke luar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan tutup bejana berpori mikro mendorong terjadinya difusi uap air di sekitar eksplan ke luar bejana sehingga menurunkan kelembaban relatif di dalam bejana dari hampir 100 % hingga 85-90% (Kitaya *et al.*, 2005).

Keuntungan lain peningkatan pertukaran udara adalah menurunkan konsentrasi etilen di dalam bejana. Etilen adalah fitohormon berbentuk gas yang mempengaruhi diferensiasi, perkembangan, morfologi dan pertumbuhan tumbuhan (Taiz & Zeiger, 2010). Namun bila jumlahnya terlalu tinggi dapat mengakibatkan gangguan fisiologis atau morfologi seperti hiperhidrasi.

Pengendalian temperatur di dalam bejana dilakukan dengan mengatur temperatur di dalam ruang kultur. Hal ini dilakukan dengan menggunakan *air conditioner* (AC). Selain itu penggunaan jenis lampu juga dapat mempengaruhi temperatur. Untuk intensitas cahaya yang sama, lampu LED tidak menaikkan temperatur seperti pada jenis lampu lainnya.

BAB VI

MIKROPROPAGASI TUMBUHAN BERKAYU SECARA FOTOAUTOTROFIK

Secara umum tumbuhan berkayu sulit diregenerasikan dalam kondisi *in vitro* sehingga teknik mikropropagasi komersial untuk tumbuhan berkayu masih terbatas. Mikropropagasi tumbuhan berkayu secara konvensional juga membutuhkan biaya yang tinggi karena 1) waktu yang diperlukan untuk setiap tahap kultur relatif lama, 2) kecepatan multiplikasi rendah, 3) resiko kehilangan *plantlet* tinggi akibat kontaminasi, kerusakan fisiologis dan abnormalitas morfologi, 4) persentase kematian *plantlet* relatif tinggi, dan 5) biaya infrastruktur, bahan kimia dan energi tinggi (Kozai, 1991; Nguyen & Kozai, 2001).

Keberhasilan mikropropagasi secara *in vitro* sangat ditentukan oleh kompetensi eksplan. Kompetensi adalah kemampuan sel atau jaringan untuk memberikan respon terhadap rangsang lingkungan, baik berupa rangsang kimia (hormon, nutrisi dan sebagainya) maupun fisik (terutama cahaya, temperatur, dan kadar CO₂). Respon yang diberikan dapat berupa aktivitas metabolisme, pembelahan sel, embriogenesis atau organogenesis. Berdasar kompetensinya, sel dapat dibedakan menjadi dua, yaitu sel yang rekalsitran dan kompeten. Sel yang rekalsitran tidak atau sulit memberikan respon terhadap rangsang lingkungan, sebaliknya sel yang kompeten bersifat responsif (Gahan, 2007).

A. Karakteristik Eksplan Tumbuhan Berkayu

Kesulitan mikropropagasi tumbuhan berkayu disebabkan oleh beberapa hal. Pertama, organ tumbuhan berkayu pada umumnya tetap bersifat rekalsitran ketika dikulturkan secara *in vitro* dan membutuhkan kondisi yang sangat spesifik untuk mengubahnya menjadi kompeten. Kemampuan sel-sel merespon rangsang dipengaruhi oleh fase siklus sel ketika diambil sebagai

eksplan dari tumbuhan induk. Sel rekalsitrasi dapat terjadi karena sel telah mengalami diferensiasi lanjut, atau berada di fase G0 dalam siklus sel yang tidak mungkin memberi respon terhadap rangsang. Sebaliknya, sel-sel yang berada pada fase G1 dalam siklus sel bersifat kompeten dan mampu memberi respon. Dengan demikian keberhasilan mikro-propagasi tumbuhan berkayu sangat dipengaruhi oleh umur ontogenetik eksplan.

Kedua, eksplan yang berasal dari pohon-pohon dewasa sering mengeluarkan eksudat fenolat ke dalam medium. Hal ini dapat menyebabkan sulitnya proliferasi tunas dalam kultur *in vitro* karena senyawa fenolat bersifat autotoksik. Bila senyawa fenolat teroksidasi akan mengakibatkan *browning*.

Ketiga, proses perkembangan tumbuhan berkayu bersifat kompleks; lebih kompleks dibandingkan tumbuhan herba. Hal ini menambah tingkat kesulitan aplikasi teknologi mikropropagasi. Makin jauh tahap perkembangan, proses dediferensiasi makin sulit dan lama. Akibatnya tingkat pertumbuhan dan kemampuan membentuk akar makin menurun, dan memunculkan fenomena abnormal.

B. Faktor-faktor Keberhasilan Mikropropagasi Tumbuhan Berkayu

Berdasarkan karakteristik kultur tumbuhan berkayu seperti disebutkan di atas, menurut Nguyen & Kozai (2001), beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam mikropropagasi tumbuhan berkayu adalah pemilihan jenis eksplan, pemilihan formula dan bahan pengisi media, serta penentuan lingkungan fisik yang tepat.

1. Pemilihan eksplan

Pemilihan eksplan yang tepat merupakan faktor kunci keberhasilan mikropropagasi tumbuhan berkayu. Pemilihan ini harus memperhatikan tahap perkembangan tumbuhan induk (*juvenile* atau dewasa) dan umur fisiologis organ. Dalam sebagian besar spesies, inisiasi tunas lebih berhasil bila

menggunakan eksplan organ muda; namun beberapa laporan menunjukkan eksplan organ dewasa juga dapat mengakibatkan organogenesis yang baik. Selain itu, lingkungan tumbuhan induk sumber eksplan juga perlu diperhatikan. Mikropropagasi eksplan yang berasal dari lingkungan yang mengalami cekaman abiotik lebih sulit untuk bersifat kompeten (Rathore *et al.*, 2004).

2. Pemilihan formula dan bahan pengisi medium

Terdapat berbagai macam formula medium kultur *in vitro*. Lebih dari 10 formula medium dapat cocok untuk pertumbuhan tumbuhan berkayu. Kadar makronutrien dalam setiap jenis formula medium bervariasi, namun semua formula mengandung makronutrien esensial secara lengkap. Banyak spesies berkayu memberikan respon baik terhadap medium MS (Murashige & Skoog, 1962), tetapi beberapa yang lain lebih responsif terhadap formula medium yang mengandung kadar garam rendah, seperti WPM (Lloyd & McCown, 1980) atau medium B5 (Gamborg & Shyluk, 1981).

Nitrogen mempunyai peran yang sangat penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman berkayu dalam kultur *in vitro*. Dalam beberapa spesies bentuk nitrogen tereduksi (amonia) terbukti secara khusus meningkatkan morfogenesis. Kebanyakan medium kultur jaringan tanaman berkayu menggabungkan nitrat dan garam amonium sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhan.

Jumlah relatif ion NH_4^+ dan NO_3^- mempengaruhi beberapa parameter pertumbuhan *Rosa canina*. Tunas tertinggi dan jumlah nodus terbanyak dicapai pada NH_4^+ dan NO_3^- dengan rasio 20:45. Khlorosis daun berkurang pada NH_4^+ dan NO_3^- dengan rasio 15:35 dan 20:45. Bila NO_3^- lebih tinggi dibanding NH_4^+ panjang tunas dan jumlah nodus akan bertambah dan khlorosis berkurang. Makin tinggi level nitrogen, pertumbuhan tunas dan nodus makin tinggi, sebaliknya khlorosis makin rendah. Persentase tunas aksiler dipengaruhi oleh konsentrasi NH_4NO_3 , dan mencapai tertinggi pada konsentrasi 20 mM.

Meningkatnya KNO_3 meningkatkan pula nekrosis pada daun dan pembentukan kalus pada tepi potongan eksplan (Shirdel *et al.*, 2011). Sumber nitrogen organik (misalnya asam amino dan kasein hidrolisat) kadang-kadang perlu ditambahkan untuk merangsang pertumbuhan sel-sel.

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa kebutuhan ZPT dalam kultur tumbuhan berkayu sangat bervariasi sehingga tidak mudah untuk memberikan rekomendasi tentang penggunaan ZPT yang optimal. Selain berpengaruh langsung terhadap pembelahan sel dan morfogenesis melalui modulasi aktivitas gen, ZPT juga diketahui secara tidak langsung mempengaruhi penyerapan berbagai ion anorganik dan organik dari medium. Untuk pengakaran tunas, sebagian besar spesies memerlukan tambahan auksin dan kelembaban relatif di bawah 100%. Pada spesies 'bandel', infeksi *Agrobacterium rhizogenes* dilaporkan juga dapat membantu (Rathore *et al.*, 2004).

Penambahan bahan aditif medium diperlukan untuk mengatasi eksudasi fenolat yang menyebabkan *browning*. Bahan aditif yang dapat ditambahkan misalnya *potasium citrate* (Onuoha *et al.*, 2011), vitamin C (Ndakidemi *et al.*, 2014), dan atau polivinil pirolidon dan arang aktif (Shimelis *et al.* 2015), atau disimpan dalam temperatur rendah dan kondisi gelap (Jing-Hong *et al.*, 2015). Penambahan bahan aditif tersebut dapat mendorong pertumbuhan karena mampu melakukan adsorpsi senyawa beracun dari medium kultur. Bila tidak diserap senyawa beracun dapat menurunkan ketersediaan unsur makro dan mikro dengan mekanisme yang tidak terduga.

Komponen medium yang lain yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan adalah jenis senyawa pengisi medium. Penggunaan bahan pengisi berserat atau berpori terbukti bermanfaat dalam meningkatkan konsentrasi CO_2 , pembentukan akar, pertumbuhan dan kualitas tanaman berkayu secara keseluruhan (Nguyen *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002; Chaum *et al.*, 2011).

3. Penentuan faktor lingkungan fisik

Faktor-faktor fisik lingkungan yang optimal bersifat spesifik spesies. Tidak ada rekomendasi khusus yang dapat diberikan untuk optimasi parameter ini. Umumnya, kultur *in vitro* tanaman berkayu dipelihara dalam kisaran temperatur yang sempit (22-28 °C) dan durasi pencahayaan 12 jam atau 16 jam.

Selain faktor-faktor di atas, frekuensi sub-kultur memegang peran penting dalam mikropropagasi tanaman berkayu. Frekuensi sub-kultur setiap 1 atau 2 hari pada 2 minggu pertama perlu dilakukan untuk mengurangi efek eksudasi fenolat. Walaupun sudah hidup dengan baik, kultur harus ditransfer ke medium segar setiap 2 minggu. Jika dilakukan setiap 3 minggu, pertumbuhan eksplan akan menurun; dan jika 1 bulan sekali dapat segera mati. Setelah waktu tersebut, kultur lebih mudah dipelihara dan hanya membutuhkan sub-kultur setiap 7 minggu (Bairu *et al.*, 2009).

C. Efektivitas Kultur Fotoautotrofik Tumbuhan Berkayu

Kultur fotoautotrofik efektif dalam meningkatkan mikropropagasi terutama pada tahap pengakaran dan aklimatisasi. Kedua tahap ini merupakan penentu keberhasilan teknik kultur jaringan dalam menghasilkan plantlet.

Pengakaran secara *in vitro* konvensional sulit dilakukan pada banyak spesies tanaman berkayu, dan aplikasi ZPT atau bahan kimia lainnya dalam medium kurang berhasil mendorong pengakaran. Dengan kultur fotoautotrofik, pembentukan akar meningkat. Struktur anatomi akar yang ditumbuhkan dalam kondisi fotoautotrofik menunjukkan kesamaan dengan akar dari tumbuhan yang diperbanyak secara vegetatif di rumah kaca (Nguyen & Kozai, 2001). Komposisi medium, penyinaran dan pertukaran udara terbukti mempengaruhi pengakaran *in vitro* (Mills *et al.*, 2009).

Aklimatisasi didefinisikan sebagai adaptasi *plantlet* hasil mikropropagasi secara *in vitro* ke lingkungan baru, yaitu rumah

kaca atau lapangan. Selama aklimatisasi, lingkungan tanaman berubah secara bertahap sejalan dengan waktu, dimulai dengan kondisi yang 'dekat' kondisi lingkungan *in vitro* dan diakhiri dengan kondisi yang 'dekat' dengan kondisi dalam rumah kaca atau lapangan. Aklimatisasi yang dilakukan di rumah kaca atau di lapang di bawah naungan disebut aklimatisasi *ex vitro*. Dalam mikropropagasi fotoautotrofik, aklimatisasi hampir sepenuhnya dapat dilakukan di dalam bejana sehingga disebut aklimatisasi *in vitro*.

Dalam mikropropagasi fotomiksotrofik konvensional, *plantlet* harus dibersihkan dengan hati-hati dari medium yang mengandung gula sebelum dipindah ke kondisi *ex vitro*. Dalam mikropropagasi fotoautotrofik, *plantlet* bersama bahan pendukung dapat ditransplantasikan bersama-sama ke tanah di rumah kaca atau lapangan. Teknik tersebut mempunyai resiko kontaminasi bakteri dan jamur yang lebih kecil, asalkan bahan pendukung bebas gula, hanya terdiri dari komponen anorganik, dan permukaannya kering. Menanam *plantlet* bersama dengan bahan pendukungnya mengurangi kemungkinan kerusakan akar dan menghemat biaya tenaga kerja.

Dalam teknik fotoautotrofik, tanaman mampu mengendalikan transpirasi sehingga tidak terjadi kehilangan air dan kelayuan saat dipindah ke lingkungan *ex vitro* walaupun tanpa aklimatisasi secara khusus (Kozai & Zobayed, 2000, Lucchesini *et al.*, 2001). Hal ini diduga karena pada teknik fotoautotrofik: 1) tingkat fotosintesis bersih lebih tinggi sehingga akumulasi karbohidrat lebih besar, 2) tingkat transpirasi dan penyerapan mineral dalam medium lebih tinggi, dan 3) porositas udara dari bahan pengisi memberikan konsentrasi oksigen terlarut lebih tinggi di sekitar dasar tunas sehingga pertumbuhan akar lebih optimal.

D. Contoh Aplikasi Kultur Fotoautotrofik dalam Mikropropagasi Tumbuhan Berkayu

Mikropropagasi beberapa spesies tumbuhan berkayu telah dapat dilakukan dalam kondisi fotoautotrofik. Spesies-spesies tersebut antara lain *Coffea arabusta* (Nguyen *et al.*, 2001), *Persea americana* Mill (de la Vina *et al.*, 2001), apel (Li *et al.*, 2001), *Annona* (Zobayed *et al.*, 2002), *Eucaliptus tereticornis* (Khan *et al.*, 2002), *Achras zapota* (Dave & Purohit, 2004), *Samanea saman* Merr. (Mosaleeyanon *et al.*, 2004), *Eucaliptus uro-grandis* (da Silva *et al.*, 2006), *Myrtus communis* (Lucchesini *et al.*, 2001), *Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau' (Chaum, 2011), dan *Feronia limonia* (Rahayu & Habibah, 2014).

1. Coffea arabusta (Nguyen *et al.*, 2001)

Penelitian ini menggunakan sistem *forced ventilation* dengan memompa udara yang mengandung CO₂ kadar tinggi menggunakan pompa udara (3,5 Watt, Model 4000 SW, Nisso Chikara Co, Jepang). Udara dipompa ke dalam kotak *bio-safe carrier* (Nalge Co, USA) melalui cakram kertas penyaring (diameter 5 mm) dan ukuran pori 0,5 µm (Millipore, Tokyo, Jepang). Jumlah pertukaran udara pada hari ke-8, pada saat mulai menggunakan pompa udara, diperkirakan 1,1/jam. Pertukaran udara secara bertahap ditingkatkan setiap 5-6 hari menggunakan pengontrol aliran udara (Model RK 1150, Kofloc Co, Jepang). Konsentrasi CO₂ di sekitar bejana adalah 1000-1200 µmol/mol. Jumlah pertukaran udara dalam perlakuan aliran rendah sekitar 2,7/jam pada hari ke-23, dan dipertahankan pada tingkat yang sama sampai hari ke-40. Pada perlakuan aliran tinggi, jumlah pertukaran udara 5,9/jam dan dipertahankan pada tingkat ini sampai hari ke-40.

Intensitas cahaya atau PPF untuk semua perlakuan adalah 50 µmol m⁻² s⁻¹ dari hari pertama sampai hari ke-3, dan meningkat menjadi 100 µmol m⁻² s⁻¹ selama 4 hari berikutnya. Mulai hari ke-8 sampai hari ke-15, PPF ditingkatkan menjadi 150 µmol m⁻² s⁻¹. Pada hari ke-16 sampai akhir periode kultur,

ada dua tingkat PPF yang diberikan, yaitu 150 dan 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ untuk perlakuan *forced ventilation*, sedangkan untuk kontrol tetap 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sumber cahaya adalah lampu neon putih yang "cool" (National Co, Jepang).

Baik pada ventilasi alamiah maupun *forced ventilation*, *plantlet* ditanam pada medium cair 50% tanpa gula, vitamin dan ZPT dengan bahan pengisi media florialite. Pada perlakuan ventilasi alamiah eksplan ditanam dengan kepadatan dua eksplan dalam bejana kecil ($3,5 \times 10^2 \text{ plantlet/m}^2$). Pada perlakuan *forced ventilation* 21 eksplan ditanam dalam bejana besar ($3,2 \times 10^2 \text{ plantlet/m}^2$). Kultur dipelihara pada temperatur kamar 24°C, kelembaban relatif $70 \pm 5\%$ dan 16 jam pencahayaan. Kadar CO_2 dalam ruang kultur diatur 1400-1500 $\mu\text{mol/mol}$ selama kultur.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat basah, berat kering, luas area daun, tinggi, panjang akar, dan kecepatan fotosintesis bersih setiap *plantlet* pada perlakuan pertukaran udara dengan kecepatan aliran tinggi nyata lebih besar dibandingkan pada pertukaran udara alamiah dan aliran rendah. Intensitas cahaya menurunkan pertumbuhan tinggi batang namun memacu pemanjangan akar. Teknik mikropropagasi fotoauto-trofik yang dikembangkan pada tanaman kopi ini membuktikan bahwa pengendalian konsentrasi CO_2 di dalam bejana kultur yang sesuai dengan kebutuhan pertumbuhan mudah dilakukan dengan sistem *forced ventilation*.

2. *Eucalyptus tereticornis* Smith (Khan *et al.*, 2002).

Eksplan yang digunakan adalah stek satu nodus berukuran 1-2 cm dengan dua daun yang berasal dari kultur fotomiksotrofik. Eksplan ditanam dengan kepadatan empat eksplan dalam bejana berukuran 370 ml yang terbuat dari polycarbonate. Medium nutrisi untuk fotoautotrofik terdiri atas garam mineral MS (Murashige & Skoog, 1962) tanpa ZPT, vitamin dan sukrosa, dengan bahan pengisi florialite (10 g per bejana) (Nisshinbo Industries, Jepang), pH medium diatur 5,7. Media dituangkan ke dalam botol vial berukuran 70 ml dan

diautoklaf pada suhu 120 °C dan tekanan 1,06 kg cm⁻² selama 20 menit.

Pertukaran gas diatur dengan cara yang sama seperti pada Zobayed (2000), namun pada penelitian ini kadar CO₂ diperkaya dengan memberi udara yang mengandung CO₂ 1400-1500 μmol/mol⁻¹ di seluruh ruang pertumbuhan (di luar bejana) selama 28 hari. Udara *ambient* (alamiah) mengandung CO₂ 400-450 μmol/mol⁻¹. Semua kultur diinkubasi pada temperatur 22 ± 2 °C di bawah cahaya neon putih selama 16 jam per hari di ruang pertumbuhan. Intensitas cahaya ditingkatkan 125 μmol m⁻² s⁻¹ (yang diukur pada rak kosong), lebih tinggi dibandingkan kondisi alamiah 60 μmol m⁻² s⁻¹. Kelembaban relatif di ruang pertumbuhan antara 80 - 85%.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa kecepatan fotosintesis bersih dan pertumbuhan yang memuaskan dalam kondisi fotoautotrofik tercapai pada kondisi PPF yang tinggi, konsentrasi CO₂ yang tinggi dan menggunakan florialite sebagai bahan penunjang medium. Namun demikian, tidak satupun dari kondisi tersebut mendukung pembentukan akar. Hal ini mungkin berkaitan dengan tingkat perkembangan fotoautotrofi yang rendah pada spesies ini yang memerlukan penelitian lebih lanjut.

3. *Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau' (Chaum et al., 2011)

Eksplan adalah nodus juvenil dari tunas yang baru muncul dari batang *Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau' yang tumbuh pada pot. Eksplan yang telah steril ditumbuhkan pada media padat MS (Murashige & Skoog 1962), 88 mM sukrosa, pH 5,7, di dalam bejana kaca 250 ml. Eksplan dikultur pada temperatur udara 25 ± 2 °C, kelembaban relatif 60 ± 5%, dan PPF 60 ± 5 μmol/m² s⁻¹ yang diperoleh dari lampu neon (TLD 36W / 84 Cool White 3350 Im, Philips, Bangkok, Thailand) selama 16 jam per hari.

Sebagai perlakuan pendahuluan, tunas tunggal (1,5 ± 0,2 cm) yang dipotong dari hasil multiplikasi dipindahkan ke media MS pada yang ditambah 9,84 μM IBA selama 1 minggu.

Tunas tersebut kemudian dikultur pada bejana dengan dua kondisi, yaitu *forced ventilation* dan udara alamiah. Jumlah pertukaran udara pada *forced ventilation* adalah 2,32/jam dengan membuat lubang (diameter 1 cm) di tutup plastik dan menutupinya dengan filter berpori mikro (ukuran pori 0,20 μm ; Nihon Millipore Ltd, Tokyo, Jepang). Bahan pengisi medium adalah vermiculite atau agar-agar.

Aklimatisasi dilakukan di bawah kondisi fotoautotrofik atau fotomiksotrofik dengan penambahan CO_2 yang berbeda. *Plantlet* yang telah diberi perlakuan pendahuluan dipindahkan ke media MS cair yang mengandung 0 (kondisi fotoautotrofik), 29, 58, atau 88 mM sukrosa (kondisi fotomiksotrofik), menggunakan vermiculit sebagai bahan pengisi dalam bejana dengan pengayaan CO_2 . Kadar CO_2 pada perlakuan *forced ventilation* $1.000 \pm 50 \mu\text{mol CO}_2/\text{mol}$, sedangkan pada kondisi alamiah sebesar $350 \pm 50 \mu\text{mol CO}_2/\text{mol}$. Kultur dilakukan pada temperatur $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, kelembaban relatif $60 \pm 5\%$, dan cahaya $120 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ yang berasal dari lampu neon selama 35 hari.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan sukrosa 29-88 mM ke dalam medium kultur menurunkan penampilan batang dan akar *plantlet* baik pada konsentrasi CO_2 alamiah maupun yang diperkaya. Kadar khlorofil a, khlorofil b dan karotenoid total pada jaringan daun *plantlet* yang dihasilkan dari sistem fotoautotrofik dengan pengayaan CO_2 meningkat signifikan dibanding kontrol. Hal ini mempengaruhi kecepatan fotosintesis. Dari penelitian ini dihasilkan protokol induksi akar makadamia yang efektif dengan mengimplementasikan pengayaan CO_2 pada sistem fotoautotrofik.

4. *Juglans regia* L. (Hassankhah et al., 2014)

Penelitian bertujuan untuk meningkatkan kandungan khlorofil dan kemampuan fotosintetik tunas *in vitro*, serta memperbaiki adaptasi *plantlet* walnut. Peningkatan dilakukan melalui manipulasi kadar sukrosa (0, 15, 30 dan 45 g/l) dan ventilasi atau pertukaran udara (dengan atau tanpa ventilasi)

Eksplan yang digunakan adalah kuncup apikal berdaun, ditumbuhkan pada medium dasar DKW (Driver & Kuniyuki) ditambah IBA (0,01 mg/l), BAP (1 mg/l) dan fitagel (2,2 mg/l) ditambah sukrosa dengan kadar sesuai perlakuan. Empat eksplan ditanam pada bejana yang berisi 50 ml medium. Bejana 600 ml ditutup dengan plastik polipropilen bening.

Ventilasi dikondisikan dengan dua cara, yaitu dengan dua filter *syringe* dan dengan membran polipropilen mikropori 0,45 μm (diameter 25 mm: CHM® SCA). Kultur diinkubasi selama 24 hari pada suhu $25\pm 2^\circ\text{C}$ pencahayaan 16 jam/hari ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Setelah terbentuk tunas, induksi pengakaran dilakukan pada medium MS yang ditambah IBA 4 mg/l selama 3 hari dalam gelap dilanjutkan 27 hari dalam cahaya. Medium induksi akar adalah vermikulit dicampur fitagel yang disiram medium DKW 25%

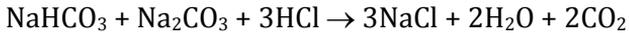
Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan bejana yang berventilasi dengan medium yang mengandung sukrosa 15% dan kadar CO_2 alamiah di ruang tumbuh berhasil menginduksi pertumbuhan *plantlet* yang sehat. *Plantlet* yang ditumbuhkan pada kadar sukrosa rendah dalam bejana berventilasi mempunyai berat kering dan daun dengan anatomi yang berkembang normal. Hal ini menyebabkan keberhasilan aklimatisasi *plantlet* di lingkungan *ex vitro*.

Ventilasi alamiah meningkatkan kadar khlorofil secara signifikan. Stomata yang berkembang pada perlakuan ventilasi berbentuk elip dan sedikit terbuka, sedangkan yang berkembang pada kondisi tanpa ventilasi berbentuk *spherical* atau membulat dan terbuka lebar.

5. *Feronia limonia* L. (Swingle) (Rahayu & Habibah, 2014; Rahayu & Sumadi, 2015)

Eksplan yang digunakan adalah *cotyledonary node* dari kecambah kawista yang diperoleh secara *in vitro*. Unit percobaan adalah dua eksplan yang ditanam pada 30 ml medium padat dalam botol kultur volume 300 ml.

Pengayaan CO₂ dilakukan menggunakan bahan kimia yang menghasilkan CO₂, yaitu NaHCO₃ dan Na₂CO₃, ditambah asam kuat untuk mempercepat reaksi. Perbandingan senyawa penghasil CO₂, asam, dan CO₂ yang dihasilkan diketahui berdasarkan reaksi sebagai berikut.



Botol kultur dibiarkan terbuka, dimasukkan dalam kotak akrilik yang di dalamnya diletakkan cawan petri berisi campuran ketiga senyawa di atas. Kultur dilakukan di bawah pencahayaan cahaya merah dan biru pada siang hari dan putih pada malam hari menggunakan lampu neon. Temperatur dipertahankan $25 \pm 2^\circ\text{C}$ menggunakan *air conditioner*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa dalam medium, kadar CO₂ dalam ruang kultur dan interaksinya berpengaruh terhadap terhadap multiplikasi tunas kawista. Medium yang mengandung sukrosa 20% dalam ruang kultur dengan 0,03% CO₂ merupakan perlakuan terbaik yang menghasilkan jumlah tunas/eksplan terbanyak, tunas tertinggi, dan jumlah daun majemuk relatif banyak.

6. *Carica papaja* L. (Perez et al., 2015)

Tujuan penelitian untuk menentukan pengaruh konsentrasi sukrosa dan IBA terhadap pengakaran dan daya hidup dalam aklimatisasi *in vitro* yang menggunakan bahan pengisi zeolit dan bejana kultur berventilasi. Perlakuan konsentrasi sukrosa (0, 10 dan 20 g/l) dikombinasikan auksin (IBA 9,8 μM dan tanpa IBA). Sebagai kontrol adalah pengakaran dalam medium agar-agar selama 17, 27 and 37 hari.

Eksplan yang digunakan adalah tunas pepaya yang diregenerasikan dari embrio somatik. Tunas sepanjang 3-5 cm dengan tiga helai daun ditanam pada medium MS yang mengandung kadar sukrosa dan IBA sesuai perlakuan.

Ke dalam setiap bejana kultur ditambahkan 97 g zeolit yang telah disterilisasi dalam oven bersuhu 180°C selama 2 jam. Bejana kultur yang digunakan terbuat dari kaca dengan volume

250 ml diisi 30 ml medium cair, ditutup dengan aluminium foil setebal 20 μm . Setelah 3 hari kultur, ventilasi ditingkatkan dengan membuka lubang pada aluminium foil yang menutup bejana pada berbagai perlakuan. Sebuah lubang kedua dibuat 3 hari setelah pembukaan lubang pertama. Sebagai perlakuan control adalah medium pengakaran 50% MS + 9,8 μM IBA, pada bejana yang berukuran sama namun ditutup menggunakan plastik polikarbonat.

Bejana kultur diletakkan dalam ruang tumbuh pada temperatur $27 \pm 2^\circ\text{C}$ dengan cahaya matahari dan fotoperiode 13 jam terang 11 jam gelap, intensitas cahaya antara 48,0 – 62,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ diukur menggunakan *light meter* EXTECH 401,025 (USA). Kelembaban relatif di dalam bejana kultur yang ditutup aluminium foil dengan dua lubang adalah 72 – 68%, sedangkan yang ditutup plastik 90 - 85%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase pengakaran tertinggi dicapai pada 37 hari setelah perlakuan medium tanpa sukrosa dan IBA, kelembaban relatif 80% dan penambahan zeolite sebagai bahan pendukung. Fotosintesis tertinggi dicapai bila tunas ditanam pada medium yang mengandung auksin, dengan berbagai kadar sucrose. Hal yang sama juga terjadi pada hari ke-17 tanpa auksin dan IBA. Kombinasi pengaruh zeolit, auksin (IBA), bebas sukrosa, dan peningkatan ventilasi merupakan implementasi teknik fotoautotrofik yang meningkatkan pengakaran, kualitas dan daya hidup *plantlet* pepaya.

BAB VII

PENUTUP

Kultur fotoautotrofik adalah tipe kultur *in vitro* yang memberi kondisi agar eksplan berkhlorofil dapat melakukan fotosintesis secara optimal. Akibatnya kebutuhan bahan organik, sebagian atau seluruhnya, dapat dipenuhi secara endogen. Kondisi yang diberikan berkait dengan kondisi medium dan lingkungan fisik kultur.

Komposisi medium dalam kultur fotoautotrofik terdiri atas bahan pengisi dan senyawa nutrisi. Bahan pengisi dipilih yang mempunyai porositas memadai sehingga dapat memaksimalkan aerasi dalam medium. Senyawa nutrisi terutama adalah senyawa anorganik. Bahan organik ditiadakan atau diminimalkan.

Perbaikan lingkungan fisik *in vitro* dilakukan terutama pada kadar CO₂ dan intensitas cahaya. Pengayaan kadar CO₂ dilakukan melalui penggunaan bahan tutup dan bejana yang permeabel terhadap gas, pemompaan udara dan penambahan bahan kimia penghasil CO₂. Intensitas cahaya ditambah dan panjang gelombang cahaya dikhususkan sesuai kebutuhan fotosintesis menggunakan jenis lampu LED.

Kultur fotoautotrofik efektif dalam mikropropagasi tumbuhan berkayu. Dengan mengendalikan komposisi nutrisi, CO₂ dan pencahayaan yang tepat, pertumbuhan dan perkembangan tanaman berkayu dapat ditingkatkan secara signifikan. Teknik ini memungkinkan untuk menggunakan bejana kultur besar dengan resiko kontaminasi mikroorganisme minimal. Penerapan bejana kultur besar dengan sistem pasokan nutrisi juga memungkinkan untuk mengontrol pH, komposisi dan volume larutan nutrisi di dalam bejana. Pengaturan tingkat pertumbuhan tanaman relatif mudah dalam sistem tersebut. Penggunaan bejana kultur besar dengan *forced ventilation* dapat mengurangi biaya tenaga kerja hampir 50 % dibandingkan dengan bejana konvensional.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams SR & Langton FA. 2005. Photoperiod and plant growth: a review. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. 80(1): 2–10.
- Afreen F, Zobayed SMA, Kubota C & Kozai T. 1999. Supporting material affects the growth and development of *in vitro* sweet potato *plantlets* cultured photoautotrophically. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**. 35: 470–474.
- Afreen F, Zobayed SMA & Kozai, T. 2001. Mass-propagation of coffee from photoautotrophic somatic embryos. **Proceedings of International Wood Biotechnology Symposium**, Narita, Japan.
- Afreen F, Zobayed SMA & Kozai, T. 2002. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**. 90: 11–19.
- Aitken-Christie J, Kozai T & Smith MAL. 1995. **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 574 p.
- Arigita L, González A, Sánchez & Tame's R. 2002. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actidinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**. 115:166–173.
- Bairu MW, Stirk WA & van Staden J. 2009. Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 98:239–248.
- Ballester A, San-José MC, Vidal N, Fernández-Lorenzo JL & Vieitez AM. 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. **Annals of Botany**. 83:619–629.
- Bourget MC. 2008. An introduction to light emitting diodes. **HortScience**. 43:1944–1946.
- Cham S, Chanseetis C, Chintakovid W, Pichakum A & Supaibulwatana K. 2011. Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keauu') *plantlets* using CO₂-enriched photoautotrophic

- conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 106: 435–444.
- Chen J, Henny RJ & McConnell DB. 2002. Development of new foliage plant cultivars. **Florida Agricultural Experimental Sta. Journal**. R-08541: 117-121.
- Couceiro MA, Afreen F, Zobayed SMA & Kozai T. 2006. Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**. 42:278–282.
- Cui YY, Hahn EJ, Kozai T & Paek KY. 2000. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 62:219–226.
- da Silva T, Giang DDT & Tanaka M. 2006. Photoautotrophic micropropagation of *Spathiphyllum*. **Photosynthetica**. 44:53–61.
- Dave N & Purohit SD. 2004. *in vitro* growth and shoot multiplication of *Achras zapota* in a controlled carbon dioxide environment. **Biologia Plantarum**. 48 (4): 621-624.
- de la Viña G, Barcelo'-Muñoz A & Pliego-Alfaro F. 2001. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 65: 229–237.
- Dewir YH, Chakrabarty D, Hahn EJ & Paek KY. 2006. Flowering of *Euphorbia millii* plantlets *in vitro* as affected by paclobutrazol, light emitting diodes (LEDs). **Acta Horticulturae**. 764: 169–173.
- Ermayanti TM, Imelda M, Tajuddin T, Kubota C & Kozai T. 1999. Growth promotion by controlling *in vitro* environment in micropropagation of tropical plant species. **Proc. of The Tokyo International Forum on Conservation and Sustainable Use of Tropical Bioresources**. NEDO and IBA, Tokyo, 10-25.
- Folta KM, Lawrence LK & McMorrow R. 2005. Design and fabrication of adjustable red-green-blue LED light arrays for plant research. **Plant Biology**. 5: 17-23.

- Fujiwara K, Kozai T & Watanabe. 1988. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or *plantlets* at rooting and acclimatization stages. **Acta Horticulturae**. 230:153-158.
- Gahan PB. 2007. Totipotency and the cell cycle. In SM Jain & H. Häggman (Eds.) **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Gamborg OL & Shyluk JP. 1981. Nutrition, Media and Characteristics of Plant Cell and Tissue Cultures. In: Thorpe TA (Ed.) **Plant Cell Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture**. New York: Academic Press, Inc. 21-44.
- Goncalves LA, Geraldine RM, Picoli EAT, Vendrame WA, de Carvalho CR & Otoni WC. 2008. *in vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 92:243-250.
- Gupta SD & Jatothu B. 2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**. 7:211-220.
- Hassankhah A, Vahdati K, Lotfi M, Mirmasoumi M, Preece J & Assareh MH. 2014. Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and *plantlet* anatomy of micropropagated persian walnut plants. **International Journal of Horticultural Science and Technology**. 1 (2): 111-120.
- Hayashi M, Fujiwara K, Kozai T, Tateno M & Kitaya Y. 1995. Effect of lighting cycle on daily CO₂ exchange and dry weight increase of potato *plantlets* cultured *in vitro* photoautotrophically. **Acta Horticulturae**. 393: 213-218.
- Hazarika BN. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**. 85:1704-1712.
- Hazarika BN. 2006. Morphophysiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**. 108:105-120.
- Heo JW & Kozai T. 1999. Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth, and development of sweetpotato *plantlets*. **Environmental**

Control Biology. 37:83-92.

- Heo JW, Wilson SB & Kozai T. 2001. A forced ventilation micropropagation system for photoautotrophic production of sweetpotato plug *plantlets* in a scaled-up culture vessel: 1. Growth and uniformity. **Horticultural Technology** 11: 90-94.
- Heo JW, Shin KS, Kim SK & Paek KY. 2006. Light quality affects *in vitro* growth of grape 'Teleki 5BB7'. **Journal of Plant Biology.** 49(4): 276-280.
- Hoagland DR & Arnon DI. 1950. The water-culture method of growing plants without soil. Berkeley, California: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station.
- Hogewoning SW, Trouwborst G, Ruijsch J & van Kooten O. 2007. Plant physiological acclimation to irradiation by light-emitting diodes (LEDs). **Acta Horticulturae.** 7 (61):183-192.
- Houllou-Kido LM, Silva KS, Rivas R, Dias ALF, & Alves GD. 2009. Viability of *Noppalea cochenilifera* (cv. IPA Sertania) photoautotrophic micropropagation. **Acta Horticulturae.** 811: 309-313.
- Jain N, Bairu MW, Stirk WA & van Staden J. 2009. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. **South African Journal of Botany.** 75:117-121.
- Jao R-C, Lai C-C, Fang W & Chang S-F. 2005. Effects of red light on the growth of *Zantedeschia plantlets in vitro* and tuber formation using light-emitting diodes. **HortScience.** 40(2): 436-438.
- Jeong BR, Fujiwara K & Kozai T. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. **Horticultural Review.** 17:125-172.
- Jing-hong L, Chun-yu Y, Ming Y, Yan-li L, Wei-bo M, Zhong-hui C, Xiao-hu H, Yu-jing L, Zhen-rong H & Xiao M. 2015. A preliminary study on explants browning of two medicinal plants in tissue culture. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.** 7(3): 2251-2254.

- Khan PSS, Kozai T, Nguyen QT, Kubota C & Dhawan V. 2002. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 71: 141-146.
- Kim SJ, Hahn EJ, Heo JW & Paek KY. 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum *plantlets in vitro*. **Scientia Horticulturae**. 101: 143-151.
- Kitaya Y, Ohmura Y, Kubota C & Kozai T. 2005. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on *plantlets* photosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 83:251-257.
- Kirdmanee C, Kitaya Y & Kozai T. 1995. Rapid acclimatization of *Eucalyptus plantlets* by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity. **Environmental Control in Biology**. 33:123-132.
- Kool LT, Keng CL & Toe CTK. 1999. *in vitro* rooting of Sentang shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the *plantlets*. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**. 35:396-400.
- Kozai T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: PC Debergh and RH Zimmerman (eds.) **Micropropagation: Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 447-469.
- Kozai T & Zobayed S. 2000. Acclimatization. In: RE Spier (ed.), **Encyclopedia of Cell Technology**. John Wiley and Sons, Inc. 1-12.
- Kozai T & Kubota C. 2005a. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. Dalam Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (Eds.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Dordrecht, Netherlands: Springer. 19 - 30.
- Kozai T & Kubota C. 2005b. *in vitro* aerial environments and their effects on growth and development of plants. Dalam Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (Eds.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Dordrecht, Netherlands: Springer.

31 – 52.

- Kozai T & Kubota C. 2005c. *in vitro* root zone environments and their effects on growth and development of plants. Dalam Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (Eds.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Dordrecht, Netherlands: Springer. 53 – 60.
- Kozai T. 2007. Propagation, grafting and transplant production in closed systems with artificial lighting for commercialization in Japan. **Propagation of Ornamental Plants** 7:145–149.
- Kubota C. 2002. Photoautotrophic micropropagation: importance of controlled environment in plant tissue culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society**. 52: 609-613.
- Kurilcik A, Canova MR, Dapkuniene S, Zilinskaite S, Kurilcik G, Tamulaitis G, Duchovskis P & Zukauskas A. 2008. *In vitro* culture of *Chrysanthemum plantlets* using light emitting diodes. **Central European Journal of Biology**. 3:161–167.
- Lian ML, Murthy HH & Paek KY. 2002. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro'. **Scientia Horticulturae**. 94: 365–370.
- Lloyd G & McCown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceeding of International Plant Propagation Society**. 30: 421–427.
- Lucchesini M, Mensuali-Sodi A, Massai R & Gucci R. 2001. Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. **Biologia Plantarum**. 44:167–174.
- Liao F, Wang B, Zhang M, Xu F & Lian F. 2007. Response to sucrose- free culture and diffusive ventilation of *plantlets in vitro* of *Gerbera jamesonii* and photoautotrophic growth potential. **Acta Horticulturae**. 764:257–264.

- Li RY, Murthy HN, Kim SK & Paek KY. 2001. CO₂-enrichment and photosynthetic photon flux affect the growth of *in vitro*-cultured apple *plantlets*. **Journal of Plant Biology**. 44 (2): 87-91.
- Majada JP, Fall MA, Tadeo F & Sa'nchez-Tame's R. 2002. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured *in vitro*. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**. 38:272-278.
- Marks TR & Simpson SE. 2000. Interaction of explant type and indole-3- butyric acid during rooting *in vitro* in a range of difficult and easy- to-root woody plants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 62:65-74.
- Mills D, Yanqing Z & Benzioni A. 2009. Effect of substrate, medium composition, irradiance and ventilation on jojoba *plantlets* at the rooting stage of micropropagation. **Scientia Horticulturae**. 121:113-118.
- Mohamed MAH & Alsadon AA. 2010. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato *plantlets*. **Scientia Horticulturae**. 123: 295-300.
- Mosaleeyanon K, Cha-um S & Kirdmanee C. 2004. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) *plantlets in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**. 103:51-63.
- Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15: 473-494.
- Ndakidemi CF, Mneney E, Ndakidemi PA. 2014. Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in *in vitro* culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments. **American Journal of Plant Science**. 5: 187-191.
- Newell C, Growns D & McComb J. 2003. The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 75: 131-142.
- Nguyen QT, Korai T & Nguyen UV. 1999. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee *plantlets*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 58:51-57.

- Nguyen QT, Kozai T, Heo J & Thai DX. 2001. Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee *plantlets* to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 66: 217-225.
- Nguyen QT & Kozai T. 2001. Photoautotrophic micropropagation of tropical and subtropical woody plants. Progress in Biotechnology. **Molecular Breeding of Woody Plants** 18: 335-344.
- Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Murakami A, Murakami K & Tanaka M. 2002. Sugar-free micropropagation of *Eucalyptus citriodora* using light-emitting diode (LEDs) and film-rockwool culture system. **Environmental Control Biology**. 40:147-155.
- Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K & Tanaka M. 2003. Responses of strawberry *plantlets* cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 73: 43-52.
- Ober ES & Sharp RE. 2003. Electrophysiological response of maize roots to low water potentials: relationship to growth and ABA accumulation. **Journal of Experimental Botany**. 54:813 - 824.
- Okamoto K, Yanagi T & Takita S. 1996. Development of plant growth apparatus using blue and red led as artificial light source. **Acta Horticulturae**. 440: 111-116.
- Onuoha CI, Eze CJ & Unamba CIN. 2011. *In vitro* prevention of browning in plantain culture innocent chimereze. **Online Journal of Biological Sciences**. 11 (1): 13-17.
- Pandey R, Chacko PM, Choudhary ML, Prasad KV & Madan P. 2007. Higher than optimum temperature under CO₂ enrichment influences stomata characters in rose (*Rosa hybrida*). **Scientia Horticulturae**. 113: 74-81.
- Pérez LP, Montesinos YP, Olmedo JG, Sánchez RR, Montenegro ON, Rodríguez RB, Ribalta OH, Escriba RCR, Daniels D & Gómez-Kosky R. 2015. Effects of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin indole-butyric acid on the *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support. **African**

- Journal of Biotechnology.** 14(35): 2622-2635.
- Pruski K, Astatkie T, Mirza M & Nowak J. 2002. Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank Potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 69: 197-200.
- Rahayu, ES, Sudarsono & Guhardja E. 2005. PEG dalam media *in vitro* menyebabkan kondisi cekaman yang menghambat tunas kacang tanah. **Berkala Penelitian Hayati.** 11 (1): 39-48.
- Rahayu, ES, Sudarsono & Iljas S. 2006. Seleksi *in vitro* embrio somatik kacang tanah pada media dengan PEG yang menstimulasi cekaman kekeringan. **Biosfera.** 23 (1): 15-23.
- Rahayu, E.S. 2007. Induksi variasi somaklonal dan seleksi *in vitro* untuk peningkatan toleransi kacang tanah terhadap cekaman kekeringan. **Disertasi.** Program Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Rahayu ES, Habibah NA & Budiyanto K. 2008. Induksi kalus embriogenik pepaya lokal dieng (*Carica pubescens* Lenne & K.Koch) pada berbagai eksplan, hormon dan pencahayaan. **Laporan Hasil Penelitian Dasar.** Lembaga Penelitian Unnes.
- Rahayu ES. 2009. Kompetensi antera dan tunas lateral dalam induksi kalus embriogenik karika dieng dengan perlakuan BA, NAA dan pencahayaan. **Makalah** disampaikan pada Konggres Nasional XIV Perhimpunan Biologi Indonesia dan Seminar Nasional Biologi XX. Malang, 25 Juli 2009.
- Rahayu ES & Fikriati UI. 2009. Induksi kalus embriogenik dari eksplan daun karika dieng dengan penambahan BA dan NAA. **Biosaintifika.** 1 (2): 121-129.
- Rahayu ES, Habibah NA & Retnoningsih A. 2011. Peningkatan periode sub-kultur pada penyimpanan *in vitro* karika dieng (*Carica pubescens* Lenne & K.Koch) melalui reduksi nutrisi dan kondisi fisik kultur. **Laporan Hasil Penelitian Program Hibah Bersaing.** Lembaga Penelitian Unnes.
- Rahayu ES. 2012. **Monograf:** Konservasi karika dieng secara *in vitro*. FMIPA Unnes. 67 hal.

- Rahayu ES & Habibah NA. 2014. Optimasi metode mikropropagasi *Feronia limonia* (L.) Swingle (kawista) melalui kultur fotoautotrofik dan media aklimatisasi dengan penambahan mikoriza. **Laporan Hasil Penelitian Fundamental**. Lembaga Penelitian Unnes.
- Rahayu ES & Sumadi. 2015. Optimasi metode mikropropagasi *Feronia limonia* (L.) Swingle (kawista) melalui kultur fotoautotrofik dan media aklimatisasi dengan penambahan mikoriza.. **Laporan Hasil Penelitian Fundamental (LANJUTAN)**. Lembaga Penelitian Unnes.
- Rathore JS, Rathore V, Shekhawat NS, Singh RP, Liler G, Phulwaria M & Dagla HR. 2004. Micropropagation of Woody Plants. In PS Srivastava, A. Narula and S. Srivastava (Eds.). **Plant Biotechnology and Molecular Markers. Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium (IWBS)**. Anamaya Publishers, New Delhi, India.
- Rousseaux MC, Ballare CL, Jordan ET & Vierstra RD. 1997. Directed overexpression of PHYA locally suppresses stem elongation and leaf senescence responses to far-red radiation. **Plant Cell and Environment**. 20: 1551–1558.
- Samuolienė G, Brazaitytė A, Urbonavičiūtė A, Šabajevienė G & Duchovskis P. 2010. The effect of red and blue light component on the growth and development of frigo strawberries. **Zemdirbyste-Agriculture**, 97 (2): 99–104.
- Schuerger AC, Brown CS & Stryjewski EC. 1997. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**. 79: 273–282.
- Seabrook JEA. 2005. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: a review. **American Journal of Potato Research**. 82(5): 353–367.
- Shimelis D, Bantte K & Feyissa T. 2015. Effects of polyvinyl pyrrolidone and activated charcoal to control effect of phenolic oxidation on *in vitro* culture establishment stage of micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Advance Crop Science and Technology**. 3 (4): 1-4.

- Shirdel M, Motallebi-Azar A, Masiha S, Mortazavi N, Matloobi M, Sharafi Y. 2011. Effects of inorganic nitrogen source and $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio on proliferation of dog rose (*Rosa canina*). **Journal of Medicinal Plants Research**. 5(18): 4605-4609.
- Tamulaitis G, Duchovskis P, Bliznikas Z, Breivė K, Ulinskaitė R, Brazaitytė A, Novičkovas A & Žukauskas A. 2005. High-power light-emitting diode based facility for plant Culture. **Journal of Physics D: Applied Physics**. 38 (3): 182–187.
- Tanaka M, Nagae S, Fukai S & Goi M. 1992. Growth of tissue cultured Spathiphyllum on rockwool in a novel film culture vessel under high CO₂. **Acta Horticulturae**. 314:139–146.
- Tanaka M, Takamura T, Watanabe H, Endo M, Yanagi T & Okamoto K. 1998. *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. 73(1): 39–44.
- Tanaka M, Dam TTG & Murakami A. 2005. Application of a novel disposable film culture system to photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus uro-grandis* (*Urophyllia x grandis*). **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**. 41:173–180
- Taiz L & Zeiger E. 2010. **Plant Physiology**. Massachusetts: Sinauer Associated Inc.Publishers.
- Teixeira JA, Da Silva D, Giang D, Tanaka M. 2005. Novel Micropropagation system for *Eucalyptus uro-grandis*. **Bragantia Campinas**. 64 (3): 349-359.
- Tisserat B & Silman R. 2000. Interactions of culture vessels, media volume, culture density, and carbon dioxide levels on lettuce and spearmint shoot growth *in vitro*. **Plant Cell Reports**. 19:464–471.
- Usami T, Mochizuki N & Kondo M. 2004. Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light. **Plant Cell Physiology**. 45: 1798–1808.

- Vyas S & Purohit SD. 2006. Effect of controlled carbon dioxide on *in vitro* shoot multiplication in *Feronia limonia* (L.) Swingle. **Acta Physiologiae Plantarum**. 28 (6): 605-611.
- Xiao Y, Lok Y & Kozai T. 2003. Photoautotrophic growth of sugarcane *in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**. 39:186-192.
- Xiao Y & Kozai T. 2004. Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: *plantlet* growth and production cost. **HortScience**. 39: 1387-1391.
- Xiao Y, He L, Liu T & Yang Y. 2005. Growth promotion of gerbera *plantlets* in large vessels by using photoautotrophic micropropagation system with forced ventilation. **Propagation of Ornamental Plants**. 5:179-185.
- Xiao Y & Kozai T. 2006. *in vitro* multiplication of statice *plantlets* using sugar-free media. **Scientia Horticulturae**. 109:71-77.
- Xiao Y, Niu G & Kozai T. 2011. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 105:149-158
- Yadav V, Kundu S & Chattopadhyay D. 2002 Light regulated modulation of Z-box containing promoters by photoreceptors and downstream regulatory components, COP1 and HY5 in *Arabidopsis*. **Plant Journal**. 31:741-753.
- Yeh H & Chung JP. 2009. High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant culture. **Renewable Sustainable Energy Rev**. 13:2175-2180.
- Zhang M, Zhao D, Ma Z, Li X, Xiao Y. 2009. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori plantlets* grown photoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**. 44:757-763.
- Zobayed SMA, Afreen-Zobayed F, Kubota C & Kozai T. 2000. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**. 85:587-592.

- Zobayed SMA, Afreen, F. and Kozai, T. 2001. Physiology of *Eucalyptus plantlets* grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**. 37:807–813.
- Zobayed SMA, Afreen F, Kubota C & Kozai T. 2001. Large-scale photoautotrophic micropropagation in a scale-up vessel. **Proceedings of International Wood Biotechnology Symposium**, Narita. Japan.
- Zobayed SMA, Armstrong J & Armstrong W. 2002. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 69:155–165.

GLOSARIUM

- Aklimatisasi : Proses pemeliharaan tumbuhan hasil kultur *in vitro* dalam kondisi peralihan antara kondisi *in vitro* dan kondisi alamiah
- Aseptik : Bebas mikroorganisme pengganggu, salah satu karakteristik utama teknik *in vitro*
- Auksin : Salah satu fitohormon yang berperan mengendalikan pembentangan sel sehingga berpengaruh terhadap pertumbuhan tumbuhan
- Autoklaf : Alat yang berfungsi untuk sterilisasi dalam kondisi temperatur dan tekanan tinggi dengan memanfaatkan uap air
- Browning* : Gejala perubahan warna eksplan menjadi coklat yang terjadi sebagai akibat terbentuknya senyawa fenolik
- Dediferensiasi : Proses perubahan organ yang telah terdeferensiasi menjadi meristematik kembali
- Durasi cahaya : Rentang waktu (jam) pencahayaan setiap 24 jam
- Eksplan : Bahan tumbuhan yang ditumbuh-kembangkan atau dipelihara dalam kultur *in vitro*
- Ex vitro* : Lingkungan alamiah di luar ruang kultur *in vitro*
- Fotoautotrofik : Teknik kultur *in vitro* yang hanya menggunakan energi internal dari hasil fotosintesis eksplan
- Fotomiksotrofik : Teknik kultur *in vitro* yang menggunakan energi internal dari hasil

	: fotosintesis eksplan dan energi eksternal berupa gula dari medium
<i>Gas permeable</i>	: Dapat dilewati gas melalui mekanisme difusi
Gula sukrosa	: Salah satu jenis disakarida yang tersusun atas glukose dan fruktose yang dapat digunakan sebagai sumber karbon dan energi
Heterotrofik	: Teknik kultur <i>in vitro</i> yang hanya menggunakan energi eksternal berupa gula dari medium
Intensitas cahaya	: Besaran yang menentukan jumlah foton atau energi yang dipancarkan yang ditunjukkan dengan satuan lux atau $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<i>In vitro</i>	: Teknik menumbuhkembangkan bagian tumbuhan di luar tubuh tumbuhan dengan modifikasi medium dan lingkungan fisik
<i>Juvenile</i>	: Fase perkembangan tumbuhan yang hanya membentuk organ-organ vegetative
Kalus	: Kumpulan sel yang belum mengalami diferensiasi
Kelembaban relatif	: Jumlah relatif uap air di udara dibandingkan jumlah maksimum yang terdapat pada udara pada temperatur tertentu
Khlorosis	: Gejala pertumbuhan abnormal akibat terhambatnya pembentukan khloroplas sehingga tumbuhan tampak pucat
Kompetensi	: Kemampuan suatu jaringan/organ untuk ditumbuhkembangkan dalam kultur <i>in vitro</i>

Kontaminasi	: Adanya mikroorganisme (biasanya jamur dan bakteri) yang hidup dalam medium kultur
Kualitas cahaya	: Panjang gelombang cahaya
LED	: Tipe lampu <i>light emitting diodes</i> berbasis iluminator yang mempunyai spektrum khusus yang dapat memenuhi kebutuhan spesifik tumbuhan
Lingkungan fisik	: Faktor-faktor lingkungan di dalam ruang kultur yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan, meliputi cahaya, konsentrasi gas, kelembaban relatif dan temperature
Makronutrien	: Nutrisi anorganik yang dibutuhkan tumbuhan dalam jumlah relatif besar dan pada umumnya berfungsi sebagai penyusun sel
Meristematik	: Sifat sel/jaringan yang berpotensi melakukan pembelahan sel terus menerus
Mikronutrien	: Nutrisi anorganik yang dibutuhkan tumbuhan dalam jumlah relatif kecil dan pada umumnya berfungsi sebagai aktivator enzim
Mikropropagasi	: Perbanyakkan jaringan/organ/plantlet dalam kultur <i>in vitro</i>
Nekrosis	: Gejala pertumbuhan abnormal akibat matinya sebagian jaringan sehingga tumbuhan tampak kering coklat
Nutrien esensial	: Senyawa nutrisi yang mutlak dibutuhkan oleh tumbuhan; bila kekurangan akan menunjukkan gejala defisiensi
<i>Off type</i>	: Sifat individu yang menyimpang dari sifat induknya

<i>Ontogeny</i>	: Perkembangan organisme mulai dari tahap paling awal (embrio/sel) sampai menjadi organisme dewasa
<i>Plantlet</i>	: Tunas berakar yang merupakan tumbuhan dalam ukuran kecil sebagai hasil kultur <i>in vitro</i>
<i>Perlite</i>	: bahan yang dibuat dari batuan silika yang dipanaskan pada temperatur tinggi.
Porositas medium	: Sifat yang menunjukkan intensitas pori atau ruang antar partikel dalam bahan medium
Regenerasi	: Tahap perkembangan menjadi tumbuhan utuh melalui pembentukan tunas dan akar
<i>Rock-wool</i>	: Bahan yang terbuat dari kombinasi bebatuan <i>basalt</i> , batu kapur, dan batu bara yang dipanaskan mencapai temperatur 1.600 °C, kemudian disentrifugasi membentuk serat-serat seperti kapas
Sitokinin	: Salah satu jenis fitohormon yang berperan mengendalikan pembelahan sel
Sterilisasi	: Proses membebaskan alat/bahan/eksplan/lingkungan agar terbebas dari mikroorganisme pengganggu
Sub-kultur	: Proses pemindahan bahan tumbuhan ke medium sejenis yang baru untuk mempertahankan ketersediaan nutrisi dan air
Substrat medium	: Bahan pengisi medium dalam kultur fotoautotrofik
Temperatur inkubasi	: Temperatur udara di ruang pemeliharaan atau penyimpanan kultur

- Tunas apikal : Jaringan primordial batang dan daun yang terdapat di ujung batang/cabang
- Tunas lateral : Jaringan primordial batang dan daun yang terdapat pada nodus atau tidak di ujung batang/cabang
- True to type* : Sifat individu yang sama dengan sifat induknya
- Vermikulit : campuran batuan mineral aluminium silikat, besi silikat dan magnesium silikat yang ringan dan memiliki bentuk seperti mika
- Viabilitas : Daya tumbuh suatu tumbuhan yang ditunjukkan dengan kemampuan melakukan pertumbuhan normal
- Hiperhydric* : Tumbuhan dengan kadar air sel yang tinggi sehingga tampak transparan dan rentan terhadap kerusakan
- Zat pengatur tumbuh (ZPT) : Senyawa organik yang dapat mengendalikan arah dan kecepatan pertumbuhan tumbuhan

