

2. Tahapan Kultur Jaringan

a. Pembuatan Media

Merupakan faktor penentu dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak. Media yang digunakan biasanya terdiri dari garam mineral, vitamin, dan hormon. Selain itu, diperlukan juga bahan tambahan seperti agar, gula, dan lain-lain. Zat pengatur tumbuh (hormon) yang ditambahkan juga bervariasi, baik jenisnya maupun jumlahnya, tergantung dengan tujuan dari kultur jaringan yang dilakukan. Media yang sudah jadi ditempatkan pada tabung reaksi atau botol-botol kaca. Media yang digunakan juga harus disterilkan dengan cara memanaskannya dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 45 menit.

b. Sterilisasi eksplan Inisiasi kultur (Culture Establishment)

Sterilisasi eksplan merupakan bagian yang paling sulit dalam proses produksi bibit melalui kultur jaringan. Sterilisasi biasanya dilakukan dalam beberapa tahap. Pertama-tama eksplan dicuci dengan deterjen atau bahan pencuci lain, selanjutnya direndam dalam bahan-bahan sterilan baik yang bersifat sistemik atau desinfektan. Bahan-bahan yang biasa digunakan untuk sterilisasi antara lain clorox, kaporit atau sublimat. Sebagai contoh, sterilisasi eksplan tanaman dapat dilakukan sebagai berikut: tunas yang akan digunakan sebagai eksplan dicuci dengan deterjen sampai betul-betul bersih. Setelah itu, tunas diambil dan direndam berturut-turut dalam benlate (0,5%) selama 5 menit, alkohol (70%) selama 5 menit, clorox (20%) selama 20 menit, dan HgCl₂ (0,2%) selama 5 menit. Akhirnya eksplan dibilas dengan aquades steril (3-5 kali) sampai larutan bahan kimia hilang. Apabila kontaminan tetap ada maka konsentrasi dan lamanya perendaman sterilan dapat ditingkatkan.

Bahan yang digunakan serta metode sterilisasi biasanya berbeda untuk setiap bahan tanaman, sehingga bahan dan cara tersebut belum tentu berhasil apabila diaplikasikan pada bahan yang berbeda serta waktu yang berlainan. Dengan demikian, setiap pekerjaan kultur jaringan, cara sterilisasi eksplan harus dicoba beberapa kali.

c. Penumbuhan eksplant dalam media cocok.

Setelah disterilkan eksplan ditumbuhkan dalam media kultur. Media yang banyak digunakan sampai saat ini adalah media MS. Untuk mengarahkan biakan pada organogenesis yang diinginkan, ke dalam media ditambahkan zat pengatur tumbuh.

d. Multiplikasi atau perbanyakkan planlet

Proses penggandaan tanaman dimana tanaman dipotong-potong pada bagian tertentu menjadi ukuran yang lebih kecil kemudian ditanam kembali ke media agar yang telah disiapkan. Proses ini dilakukan secara berulang setiap tanggal waktu tertentu. Pada setiap siklusnya tanaman dipotong dan menghasilkan perbanyakkan dengan tingkat RM (Rate Of Multiplication) tertentu yang berbeda-beda untuk setiap tanaman.

Kemampuan multiplikasi akan meningkat apabila biakan disubkultur berulang kali. Namun perlu diperhatikan, walaupun subkultur dapat meningkatkan faktor multiplikasi dapat juga meningkatkan terjadinya mutasi. Untuk itu, biakan perlu diistirahatkan pada media MS0, yaitu tanpa zat pengatur tumbuh. Banyaknya bibit yang dihasilkan oleh suatu laboratorium tergantung kemampuan multiplikasi tunas pada setiap periode tertentu. Semakin tinggi kemampuan kelipatan tunasnya maka semakin banyak dan semakin cepat bibit dapat dihasilkan.

e. Pemanjangan tunas, induksi dan perkembangan akar.

Merupakan proses induksi (perangsangan) bagi sistem perakaran tanaman. Hasil dari proses ini adalah tanaman dari kondisi sempurna. Tahapan ini tidak berlaku untuk semua jenis tanaman.

Pengakaran adalah fase dimana planlet akan menunjukkan adanya pertumbuhan akar yang mana biasanya hanya berupa penambahan zat pemacu pertumbuhan dari golongan auxin. Dalam fase ini biasanya tunas ditanam dalam media yang mengandung zat pengatur tumbuh (IAA, IBA atau NAA).

Perakaran umumnya dilakukan pada tahap akhir dalam suatu periode perbanyakkan kultur jaringan, yaitu apabila jumlah tunas *in vitro* sudah tersedia sesuai dengan jumlah bibit yang akan diproduksi.

f. Aklimatisasi planlet kelingkungan luar

Aklimatisasi adalah proses penyesuaian planlet dari kondisi mikro dalam botol (heterotrof) ke kondisi lingkungan luar (autotrof).

Planlet yang dipelihara dalam keadaan steril dalam lingkungan (suhu dan kelembaban) optimal, sangat rentan terhadap lingkungan luar (lapang). Planlet yang tumbuh dalam kultur di laboratorium memiliki karakteristik daun yang berbeda dengan planlet yang tumbuh di lapang. Daun dari planlet pada umumnya memiliki stomata yang lebih terbuka, jumlah stomata tiap satuan luas lebih banyak, dan sering tidak memiliki lapisan lilin pada permukaannya. Dengan demikian, planlet sangat rentan terhadap kelembaban rendah. Mengingat sifat-sifat tersebut, sebelum ditanam di lapang, planlet memerlukan aklimatisasi. Aklimatisasi dapat dilakukan di rumah kaca atau pesemaian, baik di rumah kaca atau pesemaian. Dalam aklimatisasi, lingkungan tumbuh (terutama kelembaban) berangsur-angsur disesuaikan dengan kondisi lapang.

Pemindahan dilakukan secara hati-hati dan bertahap, yaitu dengan memberikan sungkup. Sungkup digunakan untuk melindungi bibit dari udara luar dan serangan hama penyakit karena bibit hasil kultur jaringan sangat rentan terhadap serangan hama penyakit dan udara luar. Setelah bibit mampu beradaptasi dengan lingkungan barunya maka secara bertahap sungkup dilepaskan dan pemeliharaan bibit dilakukan dengan cara yang sama dengan pemeliharaan bibit generatif.