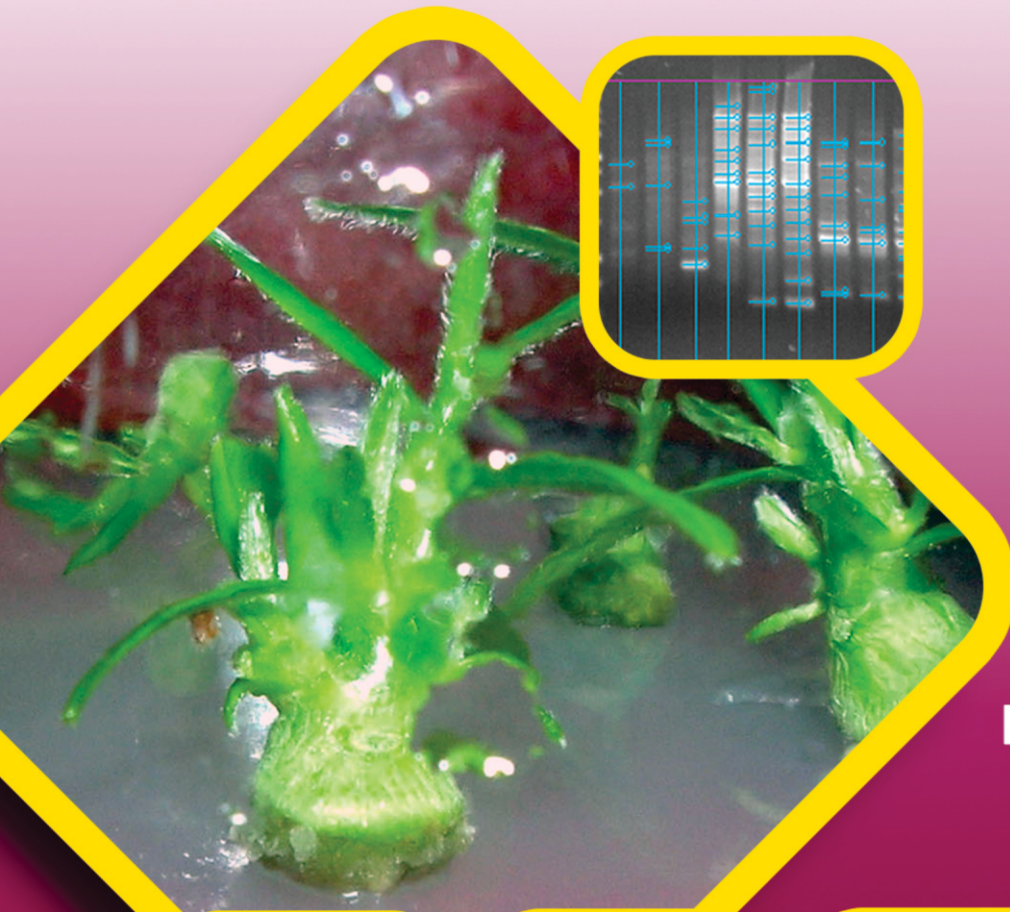


Buku Panduan

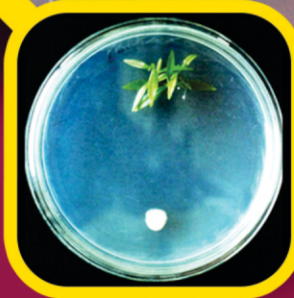
PRAKTIK

TEKNOLOGI KULTUR JARINGAN

DI LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI



Dewi Rahmawati
Edhi Sandra



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN TEKNOLOGI
SEKRETARIAT JENDERAL
SOUTHEAST ASIAN REGIONAL CENTRE FOR TROPICAL BIOLOGY
(SEAMEO BIOTROP)
2021

Buku Panduan Praktik Teknologi Kultur Jaringan di Laboratorium Bioteknologi

Dewi Rahmawati

Edhi Sandra



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN TEKNOLOGI
SEKRETARIAT JENDERAL
SOUTHEAST ASIAN REGIONAL CENTRE FOR TROPICAL BIOLOGY
(SEAMEO BIOTROP)
2021

Buku Panduan Praktik Teknologi Kultur Jaringan di Laboratorium Bioteknologi

ISBN: 978-979-8275-97-5

Copyright © 2021 SEAMEO BIOTROP

Penulis : Dewi Rahmawati, MSi dan Ir Edhi Sandra, MSi

Editor : Sri Ismawati Soerianegara, MSc

Desain sampul: Dani Yudi T.
Dewi Rahmawati, MSi

Cetakan Pertama: September 2021

Buku ini diterbitkan dengan dana DIPA SEAMEO BIOTROP 2021

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang.

Dilarang memperbanyak buku ini tanpa izin tertulis dari penerbit.

Diterbitkan oleh:

SEAMEO BIOTROP (Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology)

Jalan Raya Tajur, Km. 6, Bogor 16134, Indonesia

Phone : +62-251-8323848

Fax : +62-251-8326851

Website : <http://www.biotrop.org>

Email : kmd@biotrop.org

Berbagai foto yang terdapat di cover depan, cover belakang dan di dalam buku ini merupakan koleksi dari tim penulis buku ini.



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena hanya dengan kasih sayang dan rahmat-Nya, maka Buku Panduan Praktik Teknologi Kultur Jaringan di Laboratorium Bioteknologi ini dapat diselesaikan dengan baik. Buku panduan ini disusun bagi kalangan pengguna laboratorium dengan tujuan untuk meningkatkan pemahaman dan *skill*/keterampilan dalam hal teknik-teknik dasar di laboratorium, terutama di bidang teknologi *in vitro*. Kami menyadari bahwa sangatlah penting koneksi yang saling mendukung antara teori dan praktik dalam proses pembelajaran.

Buku panduan ini, selain untuk digunakan di kalangan internal SEAMEO BIOTROP, juga dapat digunakan oleh kalangan eksternal yang memerlukan informasi *best practices* mengenai teknologi kultur jaringan. SEAMEO BIOTROP setiap tahun menerima mahasiswa-mahasiswa magang dari berbagai universitas di Indonesia. Dengan demikian, buku panduan ini dapat digunakan sebagai pedoman ketika pertama kali masuk ke dalam laboratorium kultur jaringan, karena buku panduan ini membahas secara rinci sejak dari pengenalan alat hingga praktik *in vitro* yang dilengkapi dengan alur kerja dan gambar-gambar, sehingga mudah dipahami oleh pembacanya. Komoditas yang digunakan dapat disesuaikan dengan kebutuhan. Namun, prinsip dasar teknologi kultur jaringan adalah sama, yaitu menjaga kondisi steril (*aseptic*) yang merupakan salah satu syarat keberhasilan dalam pekerjaan teknologi kultur jaringan.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada para *reviewers* atas masukan yang sangat membangun dan berbagai pihak yang telah memberikan kontribusi dalam penyusunan buku panduan ini. Penulis berharap semoga buku panduan ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan menjadi pahala yang terus mengalir bagi penyusunnya. Penulis menyadari bahwa buku panduan ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, saran dan masukan yang membangun sangat kami harapkan untuk terus meningkatkan kualitas buku panduan ini di masa mendatang.

Bogor, September 2021

Dewi Rahmawati
Edhi Sandra

SAMBUTAN DIREKTUR SEAMEO BIOTROP

SEAMEO BIOTROP merupakan salah satu dari 26 *regional centres* di bawah SEAMEO yaitu Organisasi Menteri-menteri Pendidikan Negara-negara Asia Tenggara (*The Southeast Asian Ministers of Education Organization*), yaitu sebuah organisasi antar pemerintah regional Asia Tenggara yang bertujuan untuk menggalang kerja sama regional dalam pendidikan, sains dan budaya. SEAMEO beranggotakan 11 negara yaitu: Indonesia, Malaysia, Brunei Darussalam, Myanmar, Kamboja, Thailand, Filipina, Singapura, Vietnam, Laos dan Timor Leste. SEAMEO BIOTROP sebagai *regional centre* dalam bidang biologi tropika mempunyai visi sebagai "Pusat terdepan dalam memperkaya dan mempromosikan nilai-nilai nyata biologi tropis di Asia Tenggara" melalui tiga mandatnya, yaitu: penelitian, pelatihan, dan diseminasi informasi dalam bidang biologi tropika. Untuk menjalankan mandatnya, SEAMEO BIOTROP berada di bawah koordinasi Sekretariat Jenderal Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia.

Sebagai sebuah lembaga di bawah Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi, maka SEAMEO BIOTROP berperan mencerdaskan kehidupan bangsa, salah satu caranya adalah dengan menyediakan buku panduan tentang pembelajaran dan penerapan bioteknologi di lingkungan sekolah, universitas dan lembaga pendidikan lainnya. SEAMEO BIOTROP juga berperan aktif dalam program penelitian, pelatihan, dan penyebaran informasi. Oleh karena itu, penerbitan Buku Panduan Praktik Teknologi Kultur Jaringan di Laboratorium Bioteknologi ini adalah juga sebagai salah satu upaya untuk menyebarkan informasi mengenai hasil-hasil penelitian, khususnya untuk lebih memperkenalkan serta memasyarakatkan manfaat dan penerapan teknologi kultur jaringan.

Seiring dengan semakin meningkatnya kebutuhan akan ketersediaan bibit unggul, konservasi dan *save biodiversity*, maka peningkatan pengetahuan dan keterampilan dalam hal teknologi kultur jaringan semakin dirasa penting. Pengetahuan biologi dan bioteknologi dibutuhkan untuk mengimbangi pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang pertanian. Buku Panduan Praktik Teknologi Kultur Jaringan di Laboratorium Bioteknologi merupakan salah satu jembatan sinkronisasi antara teori dan praktik kultur jaringan, karena buku panduan ini memuat gambaran dan penjelasan yang lebih aplikatif.

Saya berterima kasih kepada para *reviewers* atas masukan yang membangun dan berbagai pihak yang telah berupaya maksimal untuk menyelesaikan Buku Panduan Praktik Teknologi Kultur Jaringan di Laboratorium Bioteknologi tepat pada waktunya. Berbagai masukan yang membangun senantiasa terbuka untuk penyempurnaan buku panduan ini di masa mendatang.

Semoga buku panduan ini bermanfaat bagi para penggunanya untuk meningkatkan wawasan dan kompetensi, khususnya dalam bidang teknologi kultur jaringan.

Bogor, September 2021
Direktur SEAMEO BIOTROP

Dr. Zulhamsyah Imran

TESTIMONI PEMBACA

1. Nama : Samuel Setiono
Jurusan : Biologi
Universitas : Universitas Pelita Harapan

Buku ini merupakan panduan yang baik untuk dapat digunakan menjadi panduan belajar tentang kultur jaringan. Secara keseluruhan buku ini sudah cukup mudah untuk dapat dipahami sebagai panduan praktik. Hal tersebut dikarenakan pemaparan yang sudah sangat jelas hingga ke detailnya dan disertai dengan beberapa contoh yang terbaru. Penambahan latihan pada akhir bab juga merupakan sebuah tambahan yang menurut saya penting jika ingin digunakan sebagai buku panduan praktikum kultur jaringan. Penambahan bab tentang cara pembuatan *hand sanitizer* juga merupakan hal baik karena dapat menunjukkan SEAMEO BIOTROP yang tetap *terupdate* tentang keadaan yang sedang terjadi dan membantu pembaca untuk dapat membuat *hand sanitizer* sendiri.

2. Nama : Jonathan Suciono Purnomo
Jurusan : Biologi
Universitas : Universitas Pelita Harapan

Buku ini menyediakan panduan untuk memulai proses kultur jaringan secara lengkap, sangat jelas, informatif dan mudah dimengerti, bahkan untuk orang tanpa pengetahuan dasar kultur jaringan.

3. Nama : Dr (Kandidat) I Putu Wahyu Sanjaya, S.P., M.Si.
Jurusan : Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Fakultas Pertanian
(Program Doktorat)
Universitas : Institut Pertanian Bogor

Secara menyeluruh, buku ini sangat lengkap, dari mulai proses pengenalan kultur jaringan, teknik mempersiapkan eksplan, pemeliharaan, aklimatisasi, *treatment* limbah kultur jaringan, hingga ke pemanfaatan kultur jaringan dan analisis lanjut dari tanaman hasil kultur jaringan. Urutan bab pada buku sangat baik sehingga mudah dipahami. Konten buku tidak hanya berupa teknis pelaksanaan tetapi juga dilengkapi dengan teori sehingga pembaca dapat mengetahui alasan dalam setiap pelaksanaannya. Banyak informasi baru yang saya dapatkan walaupun saya sudah lama bekerja di bidang kultur jaringan.

4. Nama : Meisya Then Septian
Jurusan : Bioteknologi
Universitas : Universitas Esa Unggul

Buku panduan ini sangat mudah dipahami dari segi tata bahasa dan penggunaan kalimatnya dan dilengkapi dengan gambar sehingga memudahkan dalam mengerti tahapan kultur jaringan serta tidak menimbulkan ambiguitas. Jika dibaca atau diikuti sesuai buku panduan maka untuk orang awam juga mudah dipahami.

5. Nama : Amenia Kahfi
Jurusan : Bioteknologi
Universitas : Universitas Esa Unggul

Secara keseluruhan, buku ini mudah dipahami dari segi bahasa yang digunakan, serta dilengkapi dengan gambar-gambar yang sangat membantu dalam memahami alur kultur jaringan.

6. Nama : Shafira Adzra Erminabilah
Jurusan : Agroteknologi
Universitas : Universitas Padjadjaran

Buku ini sangat bermanfaat sekali untuk mahasiswa seperti saya yang mempunyai minat dalam mempelajari kultur jaringan, namun masih memiliki pengetahuan yang kurang dan sedikit memahami hal-hal mendasarnya. Di dalam buku ini dijelaskan banyak sekali istilah-istilah, pengertian, maupun tahapan menggunakan bahasa yang mudah dimengerti, sehingga buku ini sangat direkomendasikan sekali untuk dibaca. Gambar-gambar yang ditampilkan pun cukup jelas. Penjelasan dari pembuatan bahan dan fungsi alat-alatnya pun sangat detail, sehingga buku ini sangat cocok untuk mahasiswa seperti saya.

7. Nama : Putri Kania Nur Tahera
Jurusan : Rekayasa Pertanian, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati
Universitas : Institut Teknologi Bandung

Buku ini sangat informatif, pilihan katanya mudah dipahami, dan tidak membosankan untuk dipelajari karena seimbang antara porsi tulisan dan gambarnya. Cocok untuk dibaca oleh kalangan umum dan teman-teman mahasiswa yang sedang mempelajari teknik-teknik kultur jaringan.

- 8. Nama : Anisah Nur Fatimah**
Jurusan : Rekayasa Pertanian, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati
Universitas : Institut Teknologi Bandung

Sebagai mahasiswa, buku ini sangat membantu meningkatkan pemahaman dan kompetensi praktik di laboratorium untuk pembuatan kultur jaringan yang dapat menjadi penunjang pembelajaran di kampus serta menjadi bekal saat terjun ke dunia kerja pada masa yang akan datang. Buku ini sangat menarik dan terperinci, dilengkapi dengan gambar serta ilustrasi sehingga mudah untuk dipahami bagi masyarakat umum. Buku ini dapat menjadi inspirasi dan pedoman bagi masyarakat untuk melakukan budidaya secara *in vitro* dan mendukung produksi bibit unggul di Indonesia.

- 9. Nama : Anton Agus Pratomo**
Jurusan : Rekayasa Pertanian, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati
Universitas : Institut Teknologi Bandung

Buku hebat yang secara luar biasa menggambarkan konsep, memaparkan potensi, dan menawarkan cara yang bisa dipahami dan dipraktikkan dengan mudah untuk segala elemen pembaca. Buku ini layak menjadi bacaan wajib setiap institusi dan siapapun yang terlibat dalam Teknologi Kultur Jaringan.

DAFTAR ISTILAH

- Aklimatisasi adalah proses adaptasi dan pemindahan tanaman hasil kultur *in vitro* dari kondisi terkontrol (dalam laboratorium) ke kondisi *ex vitro* (lapangan) dengan bantuan manusia.
- Anorganik berkaitan dengan benda tidak hidup seperti elemen yang meliputi air, gas, asam, dan mineral serta non hayati lainnya.
- Aseptik adalah menumbuhkan jaringan tanaman pada kondisi bebas kontaminasi mikroba.
- Auksin adalah kelompok hormon yang di dalam kultur jaringan berfungsi merangsang pertumbuhan dan pemanjangan akar. Auksin ada yang alami (fitohormon) maupun sintetik. Auksin secara alami dihasilkan pada ujung tunas.
- Autotrof adalah kemampuan menguraikan bahan anorganik menjadi molekul kompleks bahan organik.
- Aquadest* atau air distilasi adalah air (H₂O) yang dihasilkan dari proses penyulingan dengan tingkat kemurnian tinggi sehingga bebas dari mineral atau senyawa organik.
- Bakteri asimtomatik adalah suatu kondisi bakteri yang sudah menyerang tanaman, namun tidak menimbulkan gejala apapun terhadap tanaman tersebut.
- Browning* (pencokelatan eksplan) adalah terjadinya perubahan warna bahan tanaman yang dikultur secara *in vitro* dari warna yang menunjukkan kondisi normal menjadi warna coklat hingga kehitaman yang disebabkan oleh adanya senyawa fenolik yang dihasilkan oleh sel/jaringan tanaman yang dapat menyebabkan terjadinya kematian bahan tanaman yang dikultur secara *in vitro*.
- Buku (*node*) adalah jaringan meristematik di mana terdapat aktivitas pembelahan sel yang menghasilkan tunas lateral, daun, cabang atau bunga.
- Dekontaminasi adalah tindakan menghilangkan pencemaran (kontaminasi) pada alat, ruangan laboratorium atau sterilan.
- Diferensiasi adalah pertumbuhan sel/jaringan dengan fungsi spesifik.
- Disinfeksi adalah proses mengurangi jumlah mikroorganisme.
- Disinfektan adalah bahan yang digunakan untuk proses disinfeksi.
- Disinfestasi adalah proses menghilangkan kontaminan dari permukaan eksplan yang kemungkinan dapat tumbuh di lingkungan kultur jaringan dan berakibat mematikan eksplan.
- Eksplan adalah bahan tanaman yang digunakan di dalam kultur *in vitro*, berupa potongan bagian tanaman seperti daun, batang, akar, tunas pucuk, embrio, nodus, spadik, anther, dan lain-lain.
- Elisitor adalah suatu senyawa biologis dan non biologis yang dapat menyebabkan peningkatan produksi fitoaleksin jika ditambahkan pada tumbuhan atau kultur sel tumbuhan. Ada dua jenis elisitor yaitu elisitor biotik dan abiotik.

Elongasi adalah tahap memanjangkan tunas untuk mendapatkan ukuran tumbuhan yang lebih besar dan agar tunas menjadi kokoh, sehingga ketika memasuki tahapan aklimatisasi *plantlet* telah mampu berfotosintesis.

Eksudasi adalah keluarnya substansi dari jaringan eksplan akibat jaringan tanaman terluka, dengan cara pemotongan atau perlakuan bahan kimia seperti larutan klorin, reaksi fisiologis yang terjadi pada sel di sekitar luka sehingga memproduksi bahan biokimia atau sebagai produk pecahan atau sintesa sebagai mekanisme perlindungan.

Embriogenesis adalah proses pembentukan embrio yang berasal dari sel somatik, baik secara langsung maupun tak langsung.

Endosperma adalah jaringan kaya nutrisi yang terbentuk melalui penyatuan sebuah sel sperma dengan dua nukleus polar selama fertilisasi ganda yang menyediakan makanan bagi embrio yang sedang berkembang.

Enkapsulasi adalah teknik pembungkusan eksplan dengan suatu pembungkus khusus sehingga eksplan tidak mudah rusak selama masa penyimpanan. Eksplan dapat berupa embrio somatik, meristem atau tunas pucuk.

Ex vitro adalah menumbuhkan organisme di luar wadah kaca dan pada lingkungan yang terkendali.

Ex situ adalah pelestarian keanekaragaman hayati di luar habitat aslinya.

Fenolik adalah senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jaringan tanaman.

Fusi protoplas adalah salah satu metode persilangan atau hibridisasi tanaman dengan memanfaatkan rekayasa genetika konvensional.

Generatif adalah perkembangbiakan tumbuhan secara kawin atau pembuahan.

Greenhouse (rumah kaca) adalah sebuah bangunan terbuat dari gelas/kaca atau plastik yang digunakan sebagai tempat pembudidayaan tanaman. *Greenhouse* mendapatkan panas dari radiasi elektromagnetik yang datang dari cahaya matahari untuk memanaskan tumbuhan, tanah, dan barang lainnya di dalam bangunan ini.

Hardening in vitro adalah tahap pra-aklimatisasi untuk mengkondisikan *plantlet* yang masih berada di dalam botol kultur agar *plantlet* terbiasa dengan suhu udara di luar ruangan, sehingga dapat meningkatkan keberhasilan aklimatisasi.

Heterotrof adalah tidak dapat mensintesis bahan anorganik menjadi organik sehingga bergantung pada makanan dari luar.

Inisiasi adalah pengambilan eksplan dari bagian tanaman yang akan dikulturkan.

In vitro adalah kultur organ atau sel pada medium pertumbuhan yang mengandung nutrisi, di dalam suatu wadah terbuat dari kaca/gelas (Erlenmeyer, botol kaca, tabung dan lain-lain) dalam kondisi lingkungan yang terkontrol.

Internode/Internodus (ruas) adalah daerah di antara dua node/nodus yang akan memanjang sehingga tanaman bertambah tinggi.

Kriopreservasi adalah teknik penyimpanan materi genetik (organel, sel, jaringan, matriks ekstraseluler, organ, atau konstruksi biologis lainnya) dengan cara pendinginan pada suhu yang rendah di dalam nitrogen cair (-196 °C). Materi genetik yang disimpan adalah materi genetik yang rentan terhadap kerusakan akibat kinetika kimiawi yang tidak diatur.

Kalus adalah suatu kumpulan sel *amorphous* (tidak berbentuk dan belum terdiferensiasi) yang terjadi dari sel-sel jaringan tanaman yang membelah diri secara terus-menerus.

Kultur adalah kegiatan menanam eksplan pada media kultur jaringan dalam kondisi aseptik.

Kultur embrio adalah pengambilan embrio dari biji dan mengencambangkannya di dalam kondisi aseptik.

Kontaminasi adalah hadir atau tumbuhnya mikroorganisme pengganggu di sekitar eksplan atau pun di atas media. Mikroorganisme pengganggu (kontaminan) dapat berupa fungi atau bakteri yang diakibatkan oleh tidak berhasilnya proses sterilisasi eksplan atau cara kerja yang ceroboh. Kontaminan tersebut akan mengganggu keberhasilan kultur jaringan.

Media adalah campuran bahan organik maupun anorganik yang dapat mendukung pertumbuhan eksplan. Media tanam dapat berbentuk padat (solid), semi solid atau cair.

Media prekondisi adalah media yang digunakan dalam suatu perlakuan, tetapi bukanlah media perlakuan yang sebenarnya. Perbedaan media prekondisi dengan media perlakuan adalah komposisi dan kandungan dari medianya.

Meristem adalah bagian tanaman yang terdapat pada titik tumbuh baik terminal (meristem pucuk) maupun lateral (meristem interkalar) yang aktif membelah diri secara terus menerus.

Metabolit sekunder adalah golongan senyawa yang terkandung di dalam tubuh makhluk hidup yang terbentuk melalui proses metabolisme sekunder yang disintesis dari banyak senyawa metabolisme primer seperti asam amino, asetil koenzim A, asam mevalonat dan senyawa antara dari jalur shikimate.

Mikropropagasi adalah perbanyakan mikro dari galur tanaman yang terpilih melalui teknik kultur jaringan.

Mikroorganisme endofit adalah organisme yang hidup di dalam sel atau ruang antar sel tanaman yang sering merupakan biota dari tanaman sumber eksplan.

Multiplikasi adalah penggandaan eksplan dalam kultur jaringan yang bersifat seragam.

Nodus adalah buku-buku yang menjadi bagian batang atau ruas pada batang tanaman di mana akan tumbuh daun, tunas dan cabang yang terdiri dari jaringan meristem.

Organik berkaitan dengan zat yang berasal dari makhluk hidup (hewan, tumbuhan, mikroba, dan lain-lain).

Organogenesis adalah terbentuknya organ, seperti tunas, akar dan sebagainya.

Perbanyakan/penggandaan tanaman adalah proses melipatgandakan jumlah bahan tanaman yang dikulturkan dengan tujuan untuk produksi massal.

- Pengakaran adalah menginduksi pembentukan akar pada eksplan dengan media pengakaran.
- Plantlet* adalah tanaman kecil hasil kegiatan kultur *in vitro* yang telah memiliki akar, batang dan daun secara lengkap.
- Plasma nutfah adalah substansi pembawa sifat keturunan yang dapat berupa organ utuh atau bagian dari tumbuhan.
- Pra-perlakuan adalah kegiatan pra-sterilisasi yang dilakukan di luar *laminar air flow cabinet*.
- Proliferasi adalah pertumbuhan yang luar biasa dari sel, tunas, atau embrio mikropropagasi.
- Protoplas adalah sel tanaman tanpa bagian dinding sel.
- Rejuvenasi adalah pengembalian dari sifat sel/jaringan dewasa ke juvenil (peremajaan).
- Sitokinin adalah kelompok hormon tumbuhan yang secara umum berfungsi untuk pembelahan sel (sitokinesis). Dalam teknik kultur jaringan, sitokinin berfungsi untuk menginduksi pertumbuhan tunas. Sitokinin ada yang bersifat sintetik dan alami. Sitokinin alami dihasilkan di bagian akar tanaman.
- Steril adalah suatu keadaan di mana suatu zat *bebas* dari *mikroba* hidup, baik yang bersifat patogen maupun tidak patogen, baik dalam bentuk vegetatif maupun dalam bentuk spora.
- Sterilisasi adalah suatu proses untuk membuat benda atau ruangan menjadi bebas dari mikroba hidup (steril).
- Sterilisasi alat dan media adalah upaya yang dilakukan untuk membersihkan alat maupun media dari pengaruh kontaminan (penyebab kontaminasi) melalui berbagai tindakan, di antaranya aplikasi pemanasan menggunakan autoklaf.
- Sterilisasi eksplan adalah kegiatan membebaskan bahan tanaman dari adanya mikroorganisme pengganggu dengan menggunakan disinfektan, seperti: Alkohol, HgCl₂, NaOCl, dan lain-lain yang dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Mikroorganisme pengganggu dapat berupa bakteri atau fungi.
- Subkultur adalah menanam kembali eksplan pada medium yang baru, baik medium cair maupun semi padat. Eksplan yang ditanamkan dapat berupa eksplan pada kondisi awal atau hasil kultur jaringan.
- Tajuk adalah bagian tanaman yang melingkupi batang utama.
- Tanaman donor adalah tanaman sumber materi atau eksplan yang akan digunakan di dalam kultur jaringan.
- Totipotensi sel adalah kemampuan sel untuk beregenerasi dan membentuk tanaman secara lengkap.
- Tunas adventif adalah tunas yang berasal dari sel somatik tanaman yang dapat diinduksi dan diregenerasi untuk membentuk tanaman secara utuh.
- Tunas aksiler (tunas lateral) adalah tunas yang berada pada bagian titik tumbuh di bagian samping/nodus tanaman.
- Tunas pucuk adalah tunas yang berada pada bagian titik tumbuh apikal tanaman.

Unsur hara makro adalah unsur hara yang sangat berperan dalam proses pertumbuhan tanaman dan dibutuhkan dalam jumlah yang cukup banyak. Unsur hara makro meliputi unsur nitrogen (N), fosfor (P), kalium/potassium (K), kalsium (Ca), sulfur (S), dan magnesium (Mg).

Unsur hara mikro adalah unsur hara yang dibutuhkan dalam jumlah yang sedikit. Unsur hara mikro meliputi unsur besi (Fe), tembaga (Cu), mangan (Mn), seng (Zn), boron (B), molybdenum (Mo), dan kobalt (Co).

Variasi somaklonal adalah perubahan eksplan/*plantlet*/embrio, baik perubahan penampilan (fenotipik) maupun genetik, yang terjadi di dalam kultur jaringan sebagai akibat dari penggunaan hormon atau aktivitas subkultur yang berlebihan.

Vegetatif adalah perkembangbiakan tumbuhan tanpa melalui perkawinan dengan cara menggunakan bagian tubuh induknya.

Vitrifikasi adalah kondisi tanaman yang sel-selnya mengandung air berlebihan sehingga terjadi kerusakan secara fisiologis. Vitrifikasi ditandai dengan fenotip organ yang bening (*glassy*).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah bahan organik; baik alami maupun sintesis yang mampu mempengaruhi proses fisiologi tumbuhan. Dalam kultur jaringan, ZPT yang populer adalah golongan auksin, sitokinin, giberelin dan asam absisat.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
SAMBUTAN DIREKTUR	v
TESTIMONI PEMBACA	vii
DAFTAR ISTILAH	xi
DAFTAR ISI	xvii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR TABEL	xxiii
TATA TERTIB LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI	xxv
BAB 1. Sekilas tentang Teknologi Kultur Jaringan	1
BAB 2. Pengenalan Peralatan Kultur Jaringan dan Fungsinya	9
BAB 3. Sanitasi Ruangan Laboratorium	27
BAB 4. Pembuatan <i>Hand Sanitizer</i>	33
BAB 5. Prosedur Penggunaan dan Pemeliharaan <i>Laminar Air Flow (LAF)</i>	41
- Instruksi Penggunaan LAF	44
- Instruksi Perawatan LAF	47
BAB 6. Sterilisasi Peralatan Gelas, Alat Diseksi, <i>Aquadest</i> Steril dan Media Kultur	49
- Instruksi Sterilisasi Peralatan Gelas, Alat Diseksi dan <i>Aquadest</i> Steril	55
- Instruksi Pemeliharaan Autoklaf	58
BAB 7. Penyiapan Sumber Eksplan di Lapangan	61
BAB 8. Sterilisasi Eksplan	67
BAB 9. Preparasi Pembuatan Larutan Stok dan Media Kultur Jaringan	89
BAB 10. Induksi Multiplikasi Eksplan	113
- Induksi Multiplikasi Tunas dari Media Pra-kondisi	116
- Induksi Multiplikasi Tunas dari Eksplan Tanaman Kultur Jaringan	121
BAB 11. Elongasi Eksplan	125
BAB 12. Induksi Perakaran Eksplan	129
BAB 13. Pemeliharaan Eksplan di Ruangan Inkubasi Laboratorium	135
BAB 14. Penanganan Kontaminasi	139
BAB 15. Aklimatisasi	149
BAB 16. Pemanfaatan Teknologi Kultur Jaringan	157
- Interaksi Kultur Ganda <i>In Vitro</i>	159
- Mikrografting <i>In Vitro</i>	167
- Variasi Genetik <i>Plantlet</i> dengan Marka Molekuler RAPD	176
DAFTAR PUSTAKA	185
Tentang Penulis	191

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Skema alur mikropropagasi melalui teknik kultur jaringan	1
Gambar 2.	Tahapan yang dilakukan dalam proses mikropropagasi melalui kultur jaringan	2
Gambar 3.	Skema proses perubahan eksplan dalam kultur jaringan tanaman	3
Gambar 4.	Variasi mikroorganisme yang mengkontaminasi ruangan laboratorium	29
Gambar 5.	Bagian-bagian <i>Laminar Air Flow</i> (LAF)	42
Gambar 6.	Bagian-bagian autoklaf untuk sterilisasi	51
Gambar 7.	Diagram tahapan cara kerja menggunakan autoklaf untuk sterilisasi	52
Gambar 8.	Sumber eksplan berupa tunas muda (a) dan bagian tunas yang dapat diambil untuk mikropropagasi (b)	63
Gambar 9.	Alur kerja sterilisasi eksplan di luar laminar	69
Gambar 10.	Alur kerja sterilisasi eksplan di dalam laminar	70
Gambar 11.	Contoh hasil sterilisasi eksplan <i>A. mangium</i> yang bebas kontaminasi: (a) tunas; (b) biji; dan (c) eksplan yang sudah berdaun	72
Gambar 12.	Media kultur jaringan yang dibutuhkan oleh eksplan	89
Gambar 13.	Konsentrasi relatif antara auksin dan sitokinin yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan morfogenesis tanaman	96
Gambar 14.	Skema pembuatan media kultur jaringan	97
Gambar 15.	Label bahan kimia yang ditempel di botol yang berisi larutan stok	102
Gambar 16.	Contoh percobaan eksplan <i>A. mangium</i> yang ditanam pada media pra-kondisi, kemudian diinduksi pada media multiplikasi eksplan	114
Gambar 17.	Hasil induksi eksplan pada <i>Aquilaria crasna</i> berumur 4 minggu (a) dan berumur 6 minggu (b)	115
Gambar 18.	Ilustrasi perbanyakan <i>in vitro</i> tunas adventif	115
Gambar 19.	Hasil elongasi tunas pada <i>plantlet Aquilaria filaria</i>	126
Gambar 20.	Perakaran <i>plantlet Aquilaria malaccensis</i> yang menggunakan ½ konsentrasi media MS modifikasi + IBA 2 mg/L: (a) di dalam botol jar; (b) di dalam tabung reaksi sehingga panjang akar <i>A. malaccensis</i> dapat diukur	130
Gambar 21.	Kondisi pemeliharaan <i>plantlet</i> di dalam ruangan inkubasi kultur	136
Gambar 22.	Perendaman eksplan di dalam bakterisida dan fungisida selama 24 jam	140
Gambar 23.	Eksudat eksplan yang keluar dari sel/jaringan dan mengkontaminasi media kultur	141
Gambar 24.	Variasi kontaminasi bakteri pada eksplan <i>A. mangium</i> berupa (a) lendir, (b) gumpalan putih, (c) bening putih, (d) kuning, dan (e) merah	142
Gambar 25.	Variasi kontaminasi fungi pada eksplan <i>A. mangium</i>	142
Gambar 26.	Contoh kontaminasi (a) fungi pada <i>plantlet</i> anggrek, (b) bakteri pada <i>plantlet</i> gaharu, dan (c) fungi pada <i>plantlet</i> krisan	143

Gambar 27. Contoh <i>browning</i> : (a) pada seluruh eksplan <i>A. mangium</i> ; (b) pada bagian atas eksplan; dan (c) tersebar pada media di sekitar eksplan	145
Gambar 28. Uji potensi fungi dan induksi metabolit sekunder tanaman dengan persiapan inokulum fungi yang sudah diremajakan dari: (a) tabung reaksi ke cawan Petri; (b) stok lini eksplan; dan (c) IKG	159
Gambar 29. Seleksi <i>in vitro</i> beberapa isolat <i>Acremonium</i> sp. (MP1, Sr3, Sr7 dan LM2) yang berpotensi menggunakan teknik Interaksi Kultur Ganda (IKG) dengan eksplan gaharu jenis <i>A. malaccensis</i>	160
Gambar 30. Uji Interaksi Kultur Ganda (IKG) <i>in vitro</i> antara lini-lini eksplan gaharu jenis <i>A. malaccensis</i> dengan isolat <i>Acremonium</i> sp. strain F menunjukkan bahwa ada respons dengan eksplan gaharu jenis <i>A. malaccensis</i> yang diuji	160
Gambar 31. Puncak-puncak kromatografi dari senyawa utama gaharu alami yang digunakan sebagai standar uji untuk senyawa gaharu yang dikandung di dalam lini-lini <i>plantlet</i>	161
Gambar 32. Puncak-puncak dari senyawa gaharu pada <i>A. malaccensis</i> yang diinteraksikan dengan <i>Acremonium</i> Sr6	162
Gambar 33. Seleksi isolat <i>Acremonium</i> sp. dan lini eksplan gaharu jenis <i>Aquilaria</i> sp. unggul menggunakan teknik Interaksi Kultur Ganda (IKG)	163
Gambar 34. Pembentukan tetesan minyak pada kalus gaharu (a) dan daun gaharu (b), setelah ditanam pada media <i>in vitro</i> dan diberi elisitor biotik fungi	163
Gambar 35. Alur ekstraksi dan analisis kualitatif eksplan gaharu hasil inokulasi	167
Gambar 36. Beberapa tipe sambungan untuk mikrografting <i>in vitro</i> yang digunakan yaitu: (a) berbentuk V; (b) potong miring; dan (c) <i>cleft grafting</i>	169
Gambar 37. Ilustrasi tipe sambungan V pada teknik mikrografting antara <i>A. malaccensis</i> dan <i>A. crassna</i>	169
Gambar 38. Mikrografting tanaman gaharu dengan tipe sambungan berbentuk V pada <i>plantlet</i> gaharu	170
Gambar 39. Penampang melintang dan membujur <i>plantlet</i> gaharu umur 8 minggu, tanpa mikrografting (a dan b), setelah mikrografting <i>in vitro</i> (c dan d) pada pembesaran 40x	171
Gambar 40. Penampang melintang (a) dan membujur (b) <i>plantlet</i> gaharu gv/am umur 8 minggu setelah mikrografting <i>in vitro</i> pada pembesaran 40x	172
Gambar 41. Seleksi primer pada <i>plantlet</i> gaharu (<i>Aquilaria</i> sp.) yang mampu menghasilkan pita-pita polimorfis	178
Gambar 42. Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPD 03	178
Gambar 43. Dendrogram hasil analisis RAPD untuk variasi genetik <i>plantlet</i> klon gaharu ..	179

Gambar 44. Alur kerja isolasi DNA	182
Gambar 45. Alur kerja pembuatan gel agarose 1%	183
Gambar 46. Alur kerja elektroforesis	183
Gambar 47. Pola terjemahan pita DNA	184

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Peralatan umum yang digunakan di dalam teknologi kultur jaringan	10
Tabel 2.	Pengelompokkan peralatan kultur jaringan berdasarkan kegiatannya	24
Tabel 3.	Pengelompokkan peralatan teknologi kultur jaringan berdasarkan penempatan di ruangan peralatan	25
Tabel 4.	Formula 1 L stok <i>hand sanitizer</i> berdasarkan pedoman WHO dan dimodifikasi	35
Tabel 5.	Jenis sinar ultraviolet (UV)	50
Tabel 6.	Volume media dan waktu sterilisasi media yang dianjurkan	53
Tabel 7.	Teknik sterilisasi yang digunakan dalam kegiatan kultur jaringan	54
Tabel 8.	Kisaran konsentrasi agen sterilan dan lama waktu perendaman di dalam proses sterilisasi	72
Tabel 9.	Contoh perbandingan agen sterilan dan waktu perendaman pada kultur tunas	79
Tabel 10.	Hasil sterilisasi eksplan dengan berbagai perlakuan konsentrasi desinfektan dan lama perendaman yang berbeda pada 4 MST	81
Tabel 11.	Komposisi medium dasar MS (Murashige dan Skoog)	95
Tabel 12.	Komposisi bahan untuk pembuatan hormon dan penambahan asam basa	102
Tabel 13.	Pelarut asam dan basa untuk pembuatan hormon	103
Tabel 14.	Komposisi pembuatan vitamin Morell	103
Tabel 15.	Komposisi pembuatan vitamin Melamine	103
Tabel 16.	Kombinasi konsentrasi dua macam ZPT sebagai perlakuan induksi dalam media dasar MS	120
Tabel 17.	Kriteria penetapan skor pada eksplan berkalus	120
Tabel 18.	Pengaruh media perlakuan induksi terhadap kemunculan kalus, kematian eksplan dan kontaminasi eksplan	120
Tabel 19.	Pengaruh perlakuan induksi terhadap kemunculan tunas pada eksplan berumur 8 MST	121
Tabel 20.	Komponen senyawa gaharu pada sampel ekstrak yang terdeteksi dengan gas kromatografi (GLC)	162
Tabel 21.	Matriks kemiripan genetik <i>plantlet</i> gaharu	179
Tabel 22.	Komponen bahan yang digunakan dalam reaksi PCR	184
Tabel 23.	Tahapan dalam proses PCR	184

TATA TERTIB LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI

Tata tertib yang berlaku di dalam laboratorium bioteknologi tujuan umumnya adalah untuk mengatur kelancaran penggunaan laboratorium bioteknologi dan menjaga keselamatan kerja di dalam laboratorium. Adapun tujuan spesifiknya adalah untuk: 1. Memastikan penggunaan laboratorium bioteknologi SEAMEO BIOTROP sesuai dengan kebijakan dan aturan yang berlaku di SEAMEO BIOTROP; dan 2. Menjaga keselamatan kerja para pengguna laboratorium bioteknologi SEAMEO BIOTROP.

Pelaksanaan tata tertib laboratorium bioteknologi, mewajibkan pengguna laboratorium untuk:

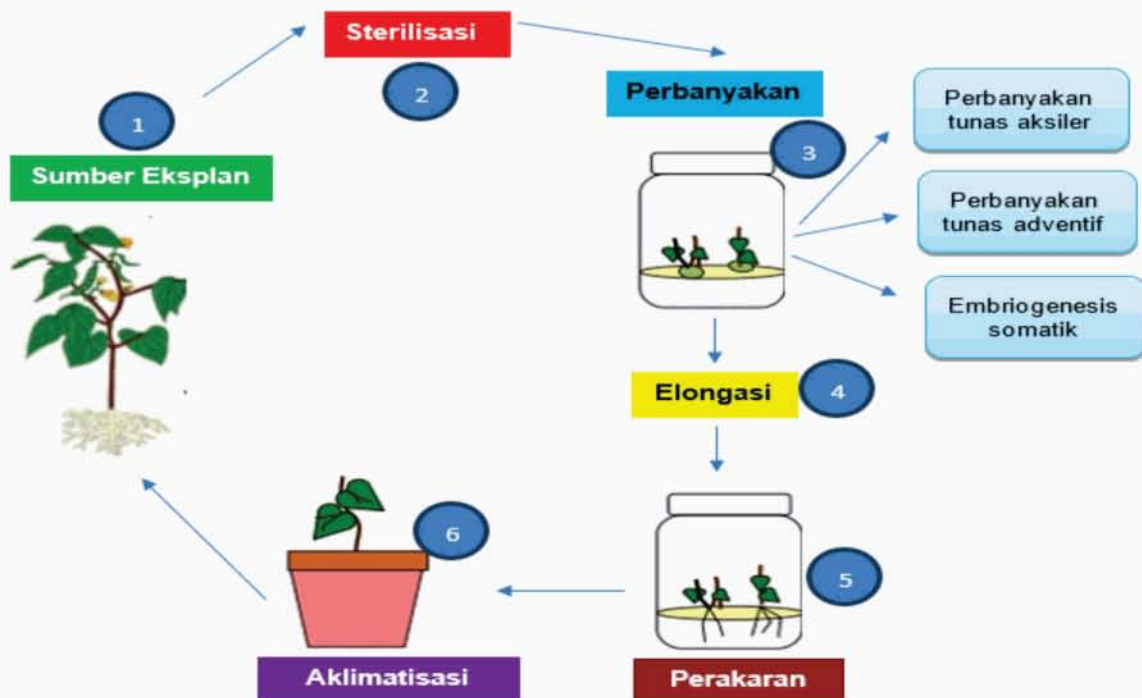
1. Mengisi formulir penggunaan laboratorium.
2. Mengganti alas kaki yang digunakan di luar laboratorium dengan alas kaki yang bersih untuk di dalam laboratorium.
3. Mengisi *logbook* pemakaian alat-alat laboratorium sebelum dan sesudah bekerja di laboratorium.
4. Memperhatikan keselamatan kerja di dalam laboratorium.
5. Tidak membawa makanan/minuman ke ruangan laboratorium. Tidak makan, minum, merokok, dan melakukan kegiatan lain yang tidak berhubungan dengan pekerjaan laboratorium di dalam laboratorium.
6. Membaca buku manual dan/atau SOP alat yang akan digunakan. Alat-alat/bahan praktikum harus digunakan sesuai dengan petunjuk penggunaan (instruksi kerja).
7. Mempelajari metode atau jenis pekerjaan yang akan dilakukan di laboratorium.
8. Memakai peralatan proteksi diri, seperti jas laboratorium, masker, kacamata pelindung, dan sarung tangan.
9. Memperhatikan keselamatan diri sendiri, orang lain dan keamanan fasilitas laboratorium.
10. Mencuci tangan sebelum dan setelah bekerja di dalam laboratorium.
11. Mengganti peralatan dan atau *glasswares* laboratorium sesuai dengan ketentuan yang tertulis di dalam SOP (*Standard Operating Procedures*) tentang kerusakan peralatan dan *glasswares* laboratorium, jika merusak atau memecahkan peralatan dan atau *glasswares* laboratorium.
12. Memberi label yang jelas pada semua bahan kimia yang meliputi: nama bahan, informasi tentang keamanan, pemilik, dan tanggal pembuatan bahan kimia. Label bahan kimia yang rusak/hilang harus segera diganti.
13. Menjaga kebersihan dan membuang sampah pada tempatnya. Membersihkan dan merapikan peralatan dan *glasswares* laboratorium setelah digunakan serta menjaga fasilitas laboratorium.
14. Mengetahui tindakan awal jika terjadi keadaan darurat (*emergency*).

15. Jika terjadi kebakaran di dalam laboratorium, maka singkirkanlah semua barang dari api dan gunakanlah alat pemadam kebakaran yang tersedia untuk memadamkan api. Jika jas laboratorium terbakar, maka segera lepaskanlah jas laboratorium tersebut dan padamkan apinya dengan alat pemadam kebakaran.
16. Meletakkan bahan kimia sesuai dengan standar keamanan bahan.
17. Menuliskan kerusakan alat yang digunakan, jika ada.
18. Memastikan ada asisten laboratorium yang berada di dekat laboratorium, ketika alat sedang bekerja.
19. Mengembalikan peralatan, *glasswares* dan bahan kimia ke tempat penyimpanan semula dalam keadaan lengkap, bersih dan siap pakai, setelah digunakan. Kebersihan peralatan dan *glasswares* laboratorium adalah tanggung jawab pengguna.
20. Membersihkan meja laboratorium, meletakkan kursi di tempat semula, menutup rapat keran air dan gas, serta mencabut kontak listrik atau mematikan saklar listrik, sebelum meninggalkan ruangan laboratorium.
21. Kegiatan percobaan di laboratorium dilakukan hanya pada jam kantor saja. Jika kegiatan percobaan memerlukan tambahan waktu di hari kerja atau pada hari libur, maka harus mendapatkan izin dari asisten laboratorium.
22. Pengguna laboratorium bertanggung jawab untuk membersihkan laboratorium dan membuang sisa sampel termasuk limbah penelitiannya, setelah kegiatan penelitian berakhir.

BAB 1 SEKILAS TENTANG TEKNOLOGI KULTUR JARINGAN

Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tumbuhan seperti protoplasma, sekelompok sel, jaringan atau organ serta menumbuhkannya di dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali. Teknik ini sering kali disebut kultur *in vitro*, sebagai lawan dari *in vivo*. Dikatakan *in vitro* (bahasa Latin, berarti "di dalam kaca") karena jaringan dibiakkan di dalam tabung inkubasi, botol atau cawan Petri (*Petri dish*) dari bahan kaca atau material tembus pandang lainnya.

Dasar teknologi kultur jaringan adalah sifat totipotensi sel tanaman yaitu kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang membentuk tanaman lengkap di dalam medium aseptik yang mengandung unsur hara dan zat pengatur tumbuh yang sesuai. Sifat totipotensi disebabkan oleh kemampuan sel, jaringan atau organ yang digunakan untuk tumbuh dan berkembang sesuai arahan dan tujuan budidaya *in vitro*. Sifat totipotensi lebih banyak dijumpai di bagian tanaman yang masih *juvenile*, muda dan di daerah-daerah meristematik. Sifat totipotensi antara satu tanaman dengan tanaman lain sangat berbeda. Perbedaan juga bisa terjadi pada tanaman yang sejenis. Alur mikropropagasi melalui teknik kultur jaringan dimulai dari sumber eksplan yang terpilih dan disterilisasi, kemudian masuk tahap induksi multiplikasi/perbanyakan, induksi akar dan terakhir aklimatisasi (Gambar 1).

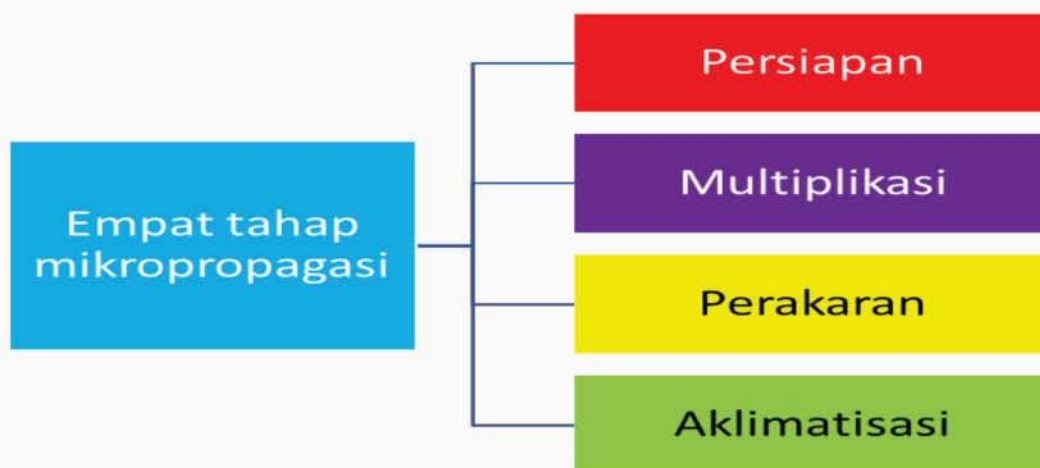


Gambar 1 Skema alur mikropropagasi melalui teknik kultur jaringan

Teknologi kultur jaringan merupakan prosedur laboratorium aseptik yang membutuhkan fasilitas unik dan keahlian khusus. Perbanyak tanaman dengan cara konvensional tidaklah efektif untuk mendapatkan bibit unggul dan seragam dalam waktu yang relatif singkat. Teknologi kultur jaringan digunakan untuk mengupayakan pemuliaan dan pembenihan yang mengarah pada ketersediaan bibit yang berkualitas, seragam dan stabil. Tanaman yang diperbanyak dengan teknik kultur jaringan dinilai lebih baik karena dapat menghasilkan bibit tanaman berkualitas unggul, yaitu memiliki sifat genetik yang sama dengan pohon induknya serta dapat diperbanyak dalam skala besar dalam waktu yang relatif singkat. Kegiatan kultur jaringan di dalam laboratorium dibagi dalam 3 kelompok:

1. Persiapan dimulai dari penyiapan tanaman sebagai sumber eksplan yang ditanam di *greenhouse* (rumah kaca). Kemudian menyiapkan alat-alat, botol-botol kultur dan pembuatan medium (meracik, merebus dan membaginya ke dalam botol-botol sampai pada sterilisasi).
2. Inokulasi dan penanaman. Inokulasi meliputi sterilisasi, pengambilan/pengirisian bagian tanaman yang akan dijadikan sebagai eksplan. Selanjutnya menanam eksplan di dalam atau di atas medium buatan yang sudah disediakan.
3. Pemeliharaan/inkubasi penyimpanan kultur. Setelah diinokulasi, botol kultur diletakkan di rak-rak pemeliharaan di ruangan inkubasi untuk mengetahui pertumbuhan dan perkembangannya sampai menjadi *plantlet*.

Masing-masing kegiatan harus terpisah satu dengan yang lainnya, baik dalam hal peralatan maupun ruangan masing-masing. Secara umum ada 4 tahapan dalam melakukan mikropropagasi melalui kultur jaringan (Gambar 2).

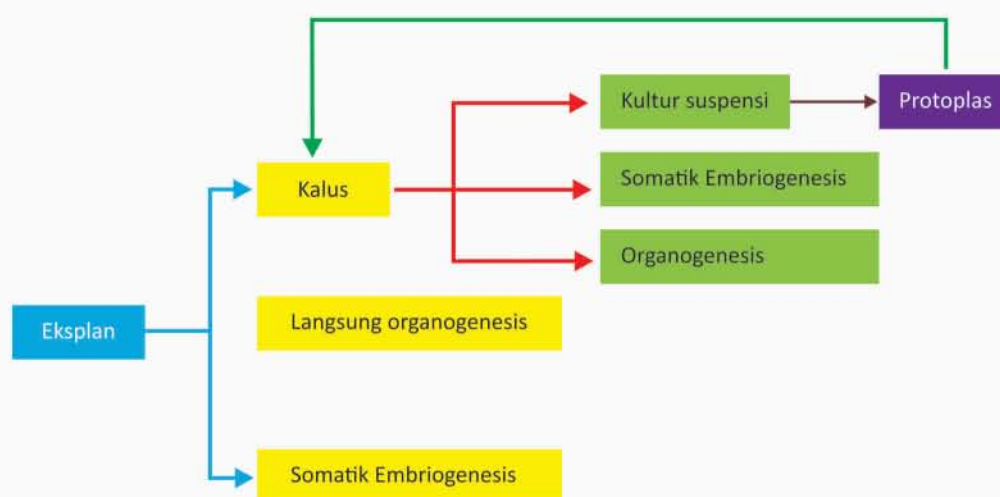


Gambar 2 Tahapan yang dilakukan dalam proses mikropropagasi melalui kultur jaringan

Eksplan untuk mikropropagasi dengan teknologi kultur jaringan dapat ditumbuhkan dengan beberapa cara, antara lain dengan pembentukan kalus, langsung melalui organogenesis, atau somatik embriogenesis. Dari kalus dapat dibentuk kultur suspensi, somatik embriogenesis dan organogenesis dan seterusnya, seperti tersaji pada Gambar 3.

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis tanaman melalui teknologi kultur jaringan antara lain:

1. Genotif, menyangkut semua sifat genetik dari tanaman.
2. Substrat yaitu komposisi media dan Zat Pengatur Tumbuh.
3. Lingkungan kultur.
4. Eksplan.



Gambar 3 Skema proses perubahan eksplan dalam kultur jaringan tanaman

Pemanfaatan kultur jaringan untuk memperbanyak secara vegetatif telah banyak dilakukan untuk berbagai jenis tanaman tahunan, karena tanaman tahunan lebih sulit dikembangkan secara konvensional. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk memperbanyak tanaman tahunan dengan teknik kultur jaringan, seperti *Aquilaria agallocha* (He *et al.* 2005), hibrid akasia (Sunarti 2009), induksi kalus dari eksplan *Aquilaria malaccensis* (Saikia 2012), induksi eksplan dari tunas ulin, *Eusideroxylon zwageri* (Dewanto 2014), sengon (Priadi & Hartati 2015), ramin (Putri *et al.* 2017), mikropropagasi tunas *Acacia mangium* secara *in vitro* (Gantait *et al.* 2018), serta masih banyak komoditas lainnya.

Elbasheer dan Osman (2017) telah melakukan penelitian efektivitas dan efisiensi berbagai jenis dan konsentrasi senyawa antimikroba untuk sterilisasi eksplan akasia yang akan diperbanyak dengan teknik kultur jaringan. Hal ini menunjukkan bahwa dengan berbagai kelebihan yang dimiliki, teknologi kultur jaringan sangat potensial untuk dikembangkan

sebagai teknik perbanyak tanaman terutama untuk keperluan tanaman yang seragam dan berkualitas. Kelebihan teknologi kultur jaringan antara lain:

- a. Tidak tergantung pada musim dan faktor lingkungan lainnya.
- b. Tidak memerlukan daerah pembibitan yang luas.
- c. Hanya bagian kecil dari tanaman asal yang dipergunakan sebagai sumber inokulum.
- d. Membantu dalam usaha eliminasi patogen.
- e. Dapat memproduksi tanaman dalam jumlah besar dalam waktu yang singkat dan mempunyai sifat unggul.
- f. Dapat memproduksi metabolit sekunder.
- g. Melestarikan plasma nutfah yang hampir punah.
- h. Dapat merekayasa genetik tanaman.

Teknik kultur jaringan di antaranya dimanfaatkan untuk perbanyak tanaman, modifikasi genotip (*plant breeding*), produksi metabolit sekunder, pemeliharaan dan pelestarian plasma nutfah, fusi protoplas, kultur endosperma, serta penyelamatan embrio (*embryo rescue*).

Teknologi kultur jaringan memerlukan dana yang cukup besar karena harus didukung oleh penggunaan bahan kimia, fasilitas dan peralatan laboratorium yang tergolong mahal. Oleh karena itu, pada umumnya tanaman-tanaman yang dipropagasi menggunakan teknologi kultur jaringan adalah:

1. Tanaman yang bernilai ekonomi tinggi.
2. Tanaman yang bersifat langka atau terancam punah.
3. Tanaman yang mempunyai persentase perkecambahan biji yang tergolong rendah, jika dipropagasi secara alami.
4. Tanaman hibrida yang berasal dari tetua yang menunjukkan sifat *male sterility* atau *sterile hybrid* yang tidak dapat bereproduksi secara seksual.
5. Tanaman hibrida yang unik dan unggul.
6. Pohon elit dan/atau pohon untuk batang bawah dan tanaman yang selalu diperbanyak secara vegetatif.
7. Tanaman yang sulit dibudidayakan secara konvensional.
8. Tanaman yang lambat berkembang secara umum (*slow-growing species*).
9. Tanaman superior yang sudah terseleksi untuk diperbanyak secara massal.
10. Tanaman yang unik.

Aplikasi teknologi kultur jaringan pada berbagai bidang antara lain:

1. Kultur jaringan dalam bidang kelautan/perairan

Dengan kemajuan sains dan teknologi, kultur jaringan meluas di bidang kelautan. Wilayah Indonesia terdiri dari 70% laut dengan pantai yang kaya akan sumber hayati. Spesies tumbuhan laut yang telah berhasil diperbanyak dengan teknik kultur *in vitro* adalah: alga

merah (*Gracilaria verrucosa*), anggur laut (*Caulerpa lentilifera*), rumput laut Kotoni (*Kappaphycus alvarezii*), dan alga cokelat (*Sargassum duplicatum*). Rumput laut atau *seaweed* merupakan jenis tumbuhan laut yang tergolong makro alga yang hidup melekat di dasar perairan. Metode penyediaan bibit rumput laut secara konvensional memiliki beberapa kelemahan di antaranya ketersediaan bibit yang sangat tergantung dari kondisi alam, adanya potensi penurunan kualitas rumput laut karena pemakaian bibit yang berulang-ulang dalam beberapa kali siklus budidaya, umur bibit yang melebihi standar, dan tidak adanya perbaikan kualitas bibit. Penggunaan bibit dari alam memiliki permasalahan pada variasi fisiologinya, seperti pertumbuhan dan kandungan agar. Budidaya rumput laut memiliki peranan penting dalam usaha meningkatkan produksi perikanan, memenuhi kebutuhan pangan dan gizi, memenuhi kebutuhan pasar di dalam dan luar negeri, memperluas kesempatan kerja, meningkatkan pendapatan dan kesejahteraan nelayan, serta menjaga kelestarian sumber daya hayati perairan. Teknik kultur jaringan *in vitro* dapat diterapkan untuk propagasi tanaman hias air untuk estetika (*aquascape*) dan obat herbal alami baru untuk penyakit ikan. Mikropropagasi tanaman air perlu dilakukan mengingat ketersediaan tanaman air yang diminati belum mencukupi permintaan yang ada. Kegiatan perbanyak tanaman air perlu memperhatikan berbagai faktor pendukung pertumbuhan tanaman yang meliputi faktor genetik, lingkungan, fisiologi dan morfologi tanaman, serta manajemen perbanyak tanaman. Faktor genetik mempengaruhi tingkat kemudahan suatu jenis tanaman untuk diperbanyak. Faktor lingkungan meliputi intensitas cahaya dan durasi penyinaran, suhu, serta suplai karbondioksida dan oksigen. Selanjutnya faktor fisiologi dan morfologi tanaman meliputi umur tanaman induk, ukuran tanaman, dominasi hormonal, dan cadangan makanan. Terakhir, manajemen perbanyak diperlukan untuk keberhasilan pemasaran.

2. Kultur jaringan dalam bidang pertanian, kehutanan dan perkebunan

Teknologi kultur jaringan sering dimanfaatkan di dalam bidang pertanian, kehutanan dan perkebunan yaitu untuk pemuliaan tanaman secara *in vitro* (teknik mikropropagasi, keragaman somaklonal, pembungaan *in vitro*, pengumbian *in vitro*, dan pemuliaan tanaman molekuler), penyediaan bibit dalam jumlah besar, produksi bibit unggul, bibit yang bebas hama dan penyakit, serta perbaikan sifat tanaman. Perbaikan sifat tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan pemuliaan mutasi (mutagenesis *in vitro*) dan fusi protoplas. Pemuliaan mutasi dilakukan dengan menggunakan mutagen kimia atau mutagen fisik. Sedangkan fusi protoplas merupakan penggabungan protoplas tanaman untuk menghasilkan sifat-sifat yang diinginkan dari tanaman tersebut. Penerapan kultur jaringan dengan teknik fusi protoplas ini bisa menghasilkan tanaman berukuran besar (poliploidi) dan produksi tanaman haploid. Tanaman poliploidi diperoleh dengan menggunakan perlakuan kolkisin, sedangkan tanaman haploid dapat dihasilkan melalui kultur antera maupun kultur ovul. Perbaikan sifat tanaman juga dapat dilakukan dengan transfer gen yang dilakukan melalui bantuan *Agrobacterium*

tumefaciens, sehingga dimungkinkan terjadinya perakitan gen-gen tanaman sesuai dengan hasil yang diharapkan. Teknologi transformasi gen dapat menghasilkan tanaman dengan varietas bibit unggul, menghasilkan tanaman bebas virus, fungi, dan bakteri, tanaman dengan kandungan senyawa berkhasiat lebih tinggi, tanaman tahan terhadap salinitas (perlakuan dengan media yang mengandung NaCl), tahan terhadap kekeringan (perlakuan dengan media sorbitol, manitol atau Polietilen Glikol), tanaman yang tahan terhadap keracunan unsur besi (Fe) dengan cara *in vitro screening* ketahanan galur, maupun tanaman yang tahan terhadap cekaman (*stress*) lingkungan lainnya.

3. Kultur jaringan dalam bidang kesehatan/farmasi

Teknologi kultur jaringan *in vitro* merupakan salah satu cara yang efisien untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat untuk obat-obatan. Kultur *in vitro* dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk memperoleh metabolit sekunder melalui modifikasi media, zat pengatur tumbuh, dan sumber karbon untuk menghasilkan metabolit yang diperlukan. Selain itu, kelebihan penggunaan kultur *in vitro* untuk produksi alkaloid adalah produksinya dapat diatur, kualitas dan hasil produksi lebih konsisten, biaya produksi lebih kecil, serta mengurangi penggunaan lahan yang luas. Contohnya tanaman kina (*Cinchona* sp.) telah lama dikenal sebagai penghasil metabolit sekunder, yaitu alkaloid kuinolin. Teknik mikropropagasi memegang peranan penting dalam konservasi dan manajemen koleksi tanaman obat. Beberapa tanaman obat langka dan potensial di Indonesia telah berhasil diperbanyak melalui teknik kultur jaringan dengan tingkat multiplikasi relatif tinggi. Beberapa contoh tanaman yang penting dalam skala industri untuk pengobatan antara lain: Ginseng Cina atau Notoginseng (*Panax notoginseng*), Tapak Dara (*Catharanthus roseus*), Siloto (*Dioscorea deltoidea*), dan Cemara Sumatera (*Taxus sumatrana/Taxus wallichiana*). Dalam skala besar, teknik kultur sel dan kultur rambut akar (*hairy root*) digunakan untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang berkhasiat obat. Keuntungan menggunakan kultur akar rambut antara lain: relatif seragam, memiliki kestabilan genetik yang tinggi, dan dapat menggunakan medium tanpa penambahan zat pengatur, serta mudah dimanipulasi untuk meningkatkan produktivitasnya.

4. Kultur jaringan dalam bidang konservasi

Pemanfaatan teknik kultur *in vitro* sangat besar dalam perbaikan cara konservasi dan pengelolaan sumber daya genetik tanaman. Konservasi sumber daya alam hayati merupakan suatu keniscayaan, karena terjadinya penurunan dan bahkan hilangnya keragaman hayati pada suatu ekosistem. Usaha konservasi untuk menjamin ketersediaannya di masa depan, perlu dilakukan sebelum plasma nutfah menjadi punah akibat dinamika alam dan ulah manusia, seperti deforestasi, terjadinya pengembangan secara berlebihan dan terus menerus terhadap suatu kultivar yang dianggap menguntungkan secara ekonomi, serta meningkatnya alih fungsi lahan seiring dengan meningkatnya pembangunan infrastruktur. Teknik kultur *in vitro*

dikembangkan untuk meningkatkan hasil tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat terutama tanaman yang berstatus terancam punah (*endangered*), dan tanaman yang lambat pertumbuhannya atau sulit berkembang. Kultur *in vitro* juga dapat membantu konservasi secara *ex-situ* dari berbagai tanaman yang terancam punah. Berdasarkan data *Red List* dari *the International Union for Conservation of Nature* (IUCN), sedikitnya terdapat 126 tumbuhan Indonesia yang memiliki status keterancaman tertinggi (*critically endangered species*) seperti Anggrek Kantung (*Paphiopedilum* spp.), Balau (*Shorea* spp.), Berus Mata Buaya (*Bruguiera hainesii* C. G. Rogers), *Diospyros molissima* (sejenis Eboni), Kantong Semar (*Nepenthes* spp.), Meranti Batu (*Parashorea aptera*), Mata Kucing (*Shorea javanica*), Kapur (*Dryobalanops sumatrensis*), Ulin (*Eusideroxylon zwageri*), Mersawa (*Anisoptera costata*), dan Tengkawang (*Shorea pinanga*). Beberapa pemanfaatan strategis plasma nutfah *in vitro* yang dapat digunakan dalam konservasi plasma nutfah tanaman, antara lain penyimpanan dalam keadaan:

- (a) Kultur tumbuh normal untuk penyimpanan jangka pendek. Penyimpanan dalam keadaan tumbuh adalah cara pemeliharaan dengan melakukan pemindahan tanaman (subkultur) secara rutin pada media yang sama agar kultur tetap hidup. Untuk menghindari terjadinya mutasi dan menjaga viabilitas tanaman maka zat pengatur tumbuh yang digunakan diusahakan seminimal mungkin.
- (b) Kultur tumbuh dengan penampilan minimal (*growth reduction or miniaturization*) karena kultur tumbuh sangat lambat untuk penyimpanan jangka menengah.
- (c) Kultur sama sekali tidak tumbuh (*suspended or stopped growth*) yaitu penghentian pertumbuhan melalui kriopreservasi untuk penyimpanan jangka panjang, termasuk cara menganalisis kestabilan genetik koleksi. Teknik kriopreservasi merupakan penyimpanan material tanaman pada suhu sangat rendah di dalam nitrogen cair (suhu -196 °C). Teknik ini merupakan cara yang ideal untuk menyimpan plasma nutfah dalam jangka panjang karena tidak diperlukan subkultur.

Penyimpanan dalam kondisi pertumbuhan minimal dilakukan dengan cara menekan pertumbuhan kultur, yaitu dengan cara menurunkan proses pembelahan sel dan proses metabolisme hingga hampir mendekati nol. Beberapa hal yang dilakukan dalam teknik pertumbuhan minimal antara lain: pengurangan intensitas cahaya, penurunan suhu lingkungan, penggunaan regulator osmotik, pengenceran media, penggunaan zat penghambat tumbuh, enkapsulasi, desikasi, dan vitrifikasi. Regulator osmotik (osmoregulator) adalah suatu senyawa organik yang dapat mempengaruhi tekanan osmotik dalam media kultur sehingga mengurangi serapan hara mineral dan air oleh sel atau jaringan yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan kultur. Sukrosa, manitol, dan sorbitol yang merupakan produk fotosintesis utama banyak digunakan untuk memperpanjang masa simpan *in vitro* karena dapat berfungsi sebagai osmoregulator. Zat penghambat tumbuh yang dapat digunakan untuk konservasi *in vitro* antara lain: *paclobutrazol* (PBZ), *cycocel* (*chlormequatchloride*/

chlorocholinechloride/CCC), *ancymidol*, dan asam absisat (ABA). PBZ merupakan senyawa organik sintetik yang menghambat urutan reaksi oksidasi dari ent-kaurene menjadi asam ent-kaurenoid dalam pembentukan asam giberelin (GA) dan sering ditambahkan ke dalam media kultur untuk memperpanjang masa simpan. Ketika pembentukan GA terhambat, walaupun pembelahan sel masih terjadi, sel tidak memanjang sehingga menyebabkan buku dan tunas menjadi pendek. Pertumbuhan lambat dapat juga dilakukan dengan menggunakan pengenceran media antara $1/2$ dan $1/4$ bagian dari formulasi bahan dasar yang menyebabkan berkurangnya unsur makro, terutama NH_4^+ dan NO_3^- , sehingga nitrogen (N) sebagai unsur yang penting untuk pertumbuhan menjadi berkurang dan mengakibatkan pertumbuhan kultur terhambat.

Berbagai permasalahan yang dihadapi dalam pelaksanaan teknologi kultur jaringan antara lain:

1. Permasalahan umum

Permasalahan umum meliputi:

- a. Permasalahan teknis yang meliputi kontaminasi, *browning*, viabilitas dan kontaminasi.
- b. Permasalahan non-teknis yang meliputi manajemen, sumber daya manusia, pemasaran, kelangkaan pesanan dan pembeli.

2. Permasalahan khusus

Permasalahan khusus meliputi:

- a. Inisiasi, yaitu memasukkan bagian dari suatu tanaman ke dalam botol kultur dalam kondisi steril.
- b. Karantina kultur jaringan.
- c. Perendaman antibiotik.
- d. Sterilisasi di luar laminar.
- e. Sterilisasi di dalam laminar.
- f. Kelangkaan eksplan.
- g. Hambatan teknis kultur jaringan, seperti padamnya listrik, air kran mati, dan alat rusak.
- h. Tren pasar/kesiapan jual.

BAB 2 PENGENALAN PERALATAN KULTUR JARINGAN DAN FUNGSINYA





Pendahuluan

Teknologi kultur jaringan tanaman atau kultur *in-vitro* sangat mutlak memerlukan kondisi aseptik di laboratorium agar pekerjaan kultur jaringan dapat berjalan dengan baik dan berhasil. Untuk mencapai kondisi aseptik di laboratorium diperlukan berbagai peralatan khusus, mulai dari proses sterilisasi, subkultur, dan inkubasi kultur. Keberhasilan suatu pekerjaan di dalam laboratorium sangat ditentukan oleh berbagai hal, antara lain: jenis peralatan yang digunakan, larutan stok, jenis bahan-bahan kimia, prosedur pelaksanaan pekerjaan, kedisiplinan pelaksana kerja, ketepatan waktu, kebersihan serta kondisi steril alat dan bahan, sistem dokumentasi pekerjaan, tim kerja, waktu kerja, analisis data, dan semua sarana prasarana kerja yang dipergunakan. Pelaksana kegiatan kultur jaringan di laboratorium membutuhkan kemampuan untuk melakukan serangkaian pekerjaan, dimulai dari persiapan alat, persiapan bahan, pembuatan larutan stok, pemilihan prosedur yang akan digunakan, penanganan limbah setelah selesai pekerjaan dan lain-lain. Oleh karena itu, sebelum melakukan suatu kegiatan di dalam laboratorium kultur jaringan, maka seorang pelaksana harus terlebih dahulu mengenal kondisi laboratorium yang akan dipergunakan untuk bekerja, terutama tentang penempatan peralatan dan bahan kimia, cara penggunaan peralatan secara tepat, teknik pelaksanaan suatu prosedur analisis secara benar, dan mengetahui apa yang harus dilakukan sebelum, selama dan sesudah suatu pekerjaan diselesaikan.

Berbagai macam peralatan di dalam laboratorium kultur jaringan mempunyai nama, bentuk, fungsi dan cara kerja yang berbeda-beda. Sebagai contoh, pengukuran volume dilakukan dengan menggunakan peralatan laboratorium yang memiliki tingkat ketelitian berbeda. Selain itu, peralatan laboratorium dibuat dari bahan yang berbeda ketahanannya terhadap panas. *Glasswares* tersedia dalam berbagai macam ukuran sesuai dengan fungsinya. Dengan demikian, diperlukan kehati-hatian, keterampilan, kecermatan dan ketelitian dalam penggunaan peralatan di laboratorium kultur jaringan. Tata letak penyimpanan alat-alat laboratorium disesuaikan dengan setiap proses kegiatan kultur jaringan agar memperlancar dan mempermudah penggunaannya. Oleh karena itu, pengguna laboratorium kultur jaringan dituntut harus mengenal setiap peralatan yang biasa digunakan di laboratorium. Peralatan yang dipergunakan di dalam laboratorium kultur jaringan dikelompokkan menjadi peralatan standar dan peralatan pendukung. Berbagai macam peralatan umum yang digunakan di dalam laboratorium kultur jaringan disajikan di dalam Tabel 1. Pengelompokan peralatan teknologi kultur jaringan berdasarkan kegiatan pada umumnya disajikan di dalam Tabel 2.

Tabel 1 Peralatan umum yang digunakan di dalam teknologi kultur jaringan

No	Alat	Fungsi
1	<p style="text-align: center;">Pipet Ukur</p> 	<p>Untuk memindahkan larutan secara terukur dengan volume yang diperlukan. Pada pipet ini terdapat skala yang menunjukkan volume. Ukuran volume terbesar adalah 50 mL.</p>
2	<p style="text-align: center;"><i>Pipette Filler dan Rubber Bulb</i></p> 	<p><i>Filler</i> (a) dan <i>Bulb</i> (b) adalah alat bantu yang berfungsi untuk mengisap larutan, yang dipasang pada pangkal pipet ukur maupun pipet volume.</p>
3	<p style="text-align: center;"><i>Pipette Washer</i></p> 	<p>Untuk mencuci pipet ukur setelah digunakan.</p>
4	<p style="text-align: center;"><i>Beaker Glass (Gelas Piala)</i></p> 	<p>Gelas yang sering disebut gelas piala dan gelas kimia ini adalah alat laboratorium yang berfungsi sebagai penampung cairan atau larutan.</p>


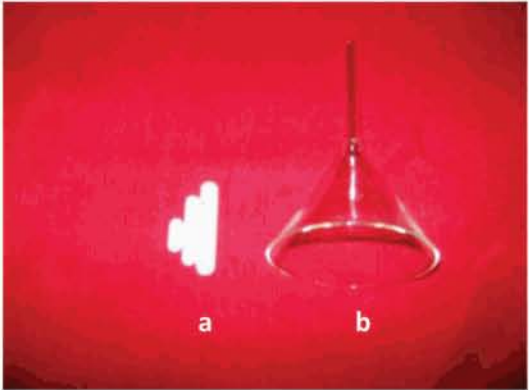


5	<p style="text-align: center;">Erlenmeyer</p> 	<p>Untuk mencampur, mengukur dan menyimpan cairan. Umumnya Erlenmeyer terbuat dari kaca borosilikat sehingga tahan ketika dipanaskan. Ukuran labu Erlenmeyer bervariasi mulai dari 50 mL-1 L.</p>
6	<p style="text-align: center;">Labu Ukur (<i>Volumetric Flask</i>)</p> 	<p>Untuk mengencerkan larutan dengan volume tertentu, dengan tingkat kecermatan yang lebih tinggi daripada gelas ukur dan gelas piala.</p>
7	<p style="text-align: center;">Gelas Ukur</p> 	<p>Untuk mengukur volume larutan, mulai dari volume 10 mL hingga 2 L.</p>
8	<p style="text-align: center;">Rak <i>Glasswares</i></p> 	<p>Untuk meniriskan <i>glasswares</i> yang sudah dicuci bersih setelah kegiatan kultur jaringan.</p>

9	<p style="text-align: center;">Cawan Petri (<i>Petri Dish</i>)</p> 	<p>Untuk menempatkan jaringan hasil sayatan yang akan dimasukkan ke dalam jar atau diamati di bawah mikroskop. Cawan Petri digunakan juga untuk tujuan eksperimental dasar, seperti pengeringan atau pengamatan perkecambahan.</p>
10	<p style="text-align: center;">Botol Duran</p> 	<p>Untuk menyimpan larutan-larutan stok kultur jaringan.</p>
11	<p style="text-align: center;">Botol Kultur</p> 	<p>Botol-botol tempat media untuk menanam/ mengkulturkan eksplan kultur jaringan. Ukuran botol bervariasi tergantung pada kebutuhan kultur jaringan. Pemilihan botol sebaiknya yang mulut botolnya kecil, bening dan tahan terhadap tekanan dan suhu tinggi.</p>
12	<p style="text-align: center;">Botol Kaca</p> 	<p>Untuk menyimpan <i>aquadest</i> steril.</p>




<p>13</p>	<p style="text-align: center;">Alat Diseksi</p> 	<p>Pinset (a) untuk mengambil eksplan; pisau <i>scalpel</i> (b) dan gunting (d) untuk memotong eksplan; spatula (c) untuk mengambil eksplan berupa biji kecil; wadah <i>stainless steel</i> (e) untuk menaruh alat-alat diseksi.</p>
<p>14</p>	<p style="text-align: center;">Showcase/Lemari Pendingin</p> 	<p>Untuk menyimpan dan mendinginkan bahan pereaksi stok kultur jaringan pada suhu $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehingga bertahan lama dan tidak mudah rusak.</p>
<p>15</p>	<p style="text-align: center;">Gelas Ukur Plastik</p> 	<p>Untuk memindahkan, menampung larutan dan mengukur volume cairan yang tidak memerlukan ketelitian tinggi.</p>
<p>16</p>	<p style="text-align: center;">Labu Semprot</p> 	<p>Labu semprot berfungsi sebagai wadah <i>aquadest</i> untuk keperluan mencuci ataupun membilas bahan-bahan yang tidak larut di dalam air serta menambahkan <i>aquadest</i> sampai batas tera labu ukur.</p>


<p>17</p>	<p style="text-align: center;"><i>Sprayer</i></p> 	<p>Fungsi utama <i>sprayer</i> adalah untuk memecahkan cairan yang disemprotkan menjadi tetesan kecil (<i>droplet</i>) dan mendistribusikan secara merata pada objek yang dituju. <i>Sprayer</i> biasanya diisi dengan alkohol 70%.</p>
<p>18</p>	<p style="text-align: center;">Termohigrometer</p> 	<p>Untuk mengetahui suhu dan kelembaban ruangan inkubasi.</p>
<p>19</p>	<p style="text-align: center;">Lemari Besi</p> 	<p>Untuk menyimpan bahan-bahan kimia kultur jaringan.</p>
<p>20</p>	<p style="text-align: center;"><i>Baskom Stainless Steel</i></p> 	<p>Sebagai wadah untuk memasak media kultur jaringan.</p>

<p>21</p>	<p style="text-align: center;">Batang Pengaduk</p> 	<p>Untuk mengaduk/mencampur cairan dengan bahan kimia, membantu dekantasi larutan, menginduksi kristalisasi serta memecahkan emulsi pada suatu ekstraksi untuk keperluan praktik di laboratorium.</p>
<p>22</p>	<p style="text-align: center;">Saringan</p> 	<p>Untuk menyaring larutan media jika ada materi pengotor, seperti semut, dan lain-lain.</p>
<p>23</p>	<p style="text-align: center;">Kompor Listrik</p> 	<p>Untuk memasak media kultur jaringan.</p>
<p>24</p>	<p style="text-align: center;">Inkubator</p> 	<p>Untuk mengontrol atau menjaga kondisi lingkungan di dalam inkubator, seperti suhu dan kelembaban untuk kultur. Pengaturan kondisi di dalam inkubator akan memberikan informasi tentang kondisi optimal dari pertumbuhan mikroorganisme dilihat dari faktor biologis maupun secara reaksi kimia.</p>

<p>25</p>	<p style="text-align: center;"><i>Hot Plate Stirrer</i></p> 	<p>Untuk menghomogenkan suatu larutan dengan cara pengadukan, sehingga proses pencampuran larutan kimia dapat dilakukan dengan cepat, hemat waktu dan tenaga untuk menghasilkan larutan yang lebih homogen. Pelat (<i>plate</i>) yang terdapat di dalam alat ini dapat dipanaskan untuk mempercepat proses homogenisasi.</p>
<p>26</p>	<p style="text-align: center;"><i>Magnetic stirrer bar (a) dan corong (b)</i></p> 	<p><i>Magnetic stirrer bar</i> (a) adalah magnet pengaduk yang digunakan saat menghomogenkan larutan dengan <i>Hot Plate Stirrer</i>. Corong (b) berfungsi sebagai alat bantu untuk memindahkan/memasukkan larutan ke dalam wadah/tempat yang bermulut kecil serta sebagai alat bantu penyaringan, yaitu sebagai tempat untuk meletakkan kertas saring.</p>
<p>27</p>	<p style="text-align: center;"><i>Neraca Analitik</i></p> 	<p>Untuk mengukur berat suatu zat atau bahan kimia dalam jumlah yang sangat kecil. Neraca analitik mempunyai tingkat keakuratan yang tinggi, yaitu hingga 4 angka di belakang koma.</p>
<p>28</p>	<p style="text-align: center;"><i>pH meter</i></p> 	<p>Untuk mengukur pH yaitu tingkat keasaman/basa pada suatu cairan.</p>

<p>29</p>	<p style="text-align: center;"><i>Shaker Incubator</i></p> 	<p><i>Shaker Incubator</i> merupakan gabungan dari <i>shaker</i> dan inkubator. <i>Shaker</i> berfungsi untuk mengaduk atau mengagitasi cairan sehingga seluruh bagian campuran menjadi homogen (merata), sedangkan inkubator untuk mengembangbiakkan atau mengkultivasi mikroorganisme seperti bakteri, dengan tetap mempertahankan suhu optimal. Selain itu, <i>Shaker Incubator</i> digunakan untuk mengocok eksplan yang ditanam di dalam media kultur cair.</p>
<p>30</p>	<p style="text-align: center;">Autoklaf</p> 	<p>Untuk mensterilkan media, bahan-bahan atau alat-alat (botol kultur, pinset, <i>scalpel</i> dan lain-lain) yang tidak rusak karena pemanasan dan tekanan tinggi. Selain itu, autoklaf juga berfungsi untuk mendestruksi media pembiakan.</p>
<p>31</p>	<p style="text-align: center;">Oven</p> 	<p>Untuk mengeringkan alat-alat laboratorium atau objek-objek lainnya setelah disterilkan.</p>

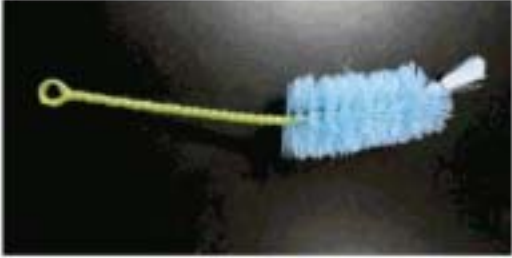

<p>32</p>	<p style="text-align: center;">Lampu Bunsen</p> 	<p>Fungsi lampu Bunsen adalah untuk memanaskan, membakar dan mensterilisasi pinset, <i>scalpel</i>, gunting atau lainnya. Pembakar Bunsen menghasilkan nyala api gas tunggal terbuka, sehingga diharapkan area di sekitar titik yang dibakar menjadi aseptik.</p>
<p>33</p>	<p style="text-align: center;">Kabinet <i>Laminar Air Flow</i> (LAF)</p> 	<p>Kabinet <i>Laminar Air Flow</i> (LAF) digunakan untuk isolasi, inokulasi dan subkultur. LAF dilengkapi dengan UV, lampu neon dan <i>blower</i>. LAF harus steril dan bebas dari debu. Selain itu, LAF digunakan untuk membuat ruangan kerja tetap steril dengan mengambil udara dari luar LAF, kemudian disaring dengan filter khusus sehingga udara dari luar tidak dapat mengkontaminasi ruangan kerja yang ada di LAF.</p>
<p>34</p>	<p style="text-align: center;"><i>Millipore Water Purification System</i></p> 	<p>Untuk memproduksi <i>aquadest</i> yang akan digunakan di laboratorium. <i>Aquadest</i> diproduksi dalam 3 tipe, yaitu: Tipe 1 untuk penggunaan pada instrumen dengan sensitivitas tinggi seperti HPLC, AAS; Tipe 2 untuk penggunaan umum di laboratorium seperti pembuatan media, pereaksi <i>buffer</i>; Tipe 3 untuk pencucian <i>glasswares</i>, pengisian <i>waterbath</i> dan autoklaf.</p>

35	<p style="text-align: center;">Jeriken</p> 	<p>Untuk menampung <i>aquadest</i>.</p>
36	<p style="text-align: center;">Timer</p> 	<p>Berfungsi sebagai pengingat waktu dan pengatur waktu bagi pekerjaan yang dikendalikan berdasarkan SOP.</p>
37	<p style="text-align: center;">Sudip</p> 	<p>Untuk mengambil suatu zat padat atau bubuk.</p>

38	<p style="text-align: center;"><i>Scalpel/Pisau Steril</i></p> 	<p>Bentuk <i>scalpel</i> menyerupai mata pisau kecil dan berfungsi memotong bahan/jaringan. Ujung mata pisau bisa diganti jika sudah tidak tajam lagi.</p>
39	<p style="text-align: center;">Rak Dorong</p> 	<p>Untuk memindahkan bahan kimia dan botol-botol kultur jaringan dari suatu ruangan ke ruangan lainnya.</p>
40	<p style="text-align: center;">Rak Kultur</p> 	<p>Untuk menyimpan botol-botol berisi eksplan hasil inokulasi dan mengoptimalkan pemanfaatan ruangan yang ada.</p>

41	<p style="text-align: center;"><i>Air Conditioner (AC)</i></p> 	<p>Untuk menjaga suhu ruangan agar tetap stabil sesuai dengan kondisi suhu yang disyaratkan untuk kultur jaringan.</p>
42	<p style="text-align: center;"><i>Timer Listrik</i></p> 	<p>Untuk mengatur waktu penyinaran terhadap tanaman kultur sehingga lampu otomatis mati dan menyala sendiri sesuai pengaturan.</p>
43	<p style="text-align: center;"><i>Lampu TL</i></p> 	<p>Lampu TL diletakkan di atas rak kultur untuk memberikan penerangan dan sumber cahaya bagi pertumbuhan tanaman, sebagai pengganti cahaya matahari.</p>
44	<p style="text-align: center;"><i>Tabung Reaksi</i></p> 	<p>Untuk mencampur dan menampung larutan bahan kimia. Selain itu, tabung reaksi dapat digunakan sebagai tempat untuk menumbuhkan eksplan sehingga proses perkembangan akar terlihat.</p>

45	<p style="text-align: center;">Pipet Tetes</p> 	<p>Untuk memindahkan cairan dalam bentuk tetesan.</p>
46	<p style="text-align: center;">Kaca Pembesar/Lup</p> 	<p>Untuk memperjelas objek pengamatan.</p>
47	<p style="text-align: center;">Gelas Kaca atau Gelas Arloji</p> 	<p>Gelas berbentuk bundar dengan beragam diameter ini memiliki beberapa fungsi, di antaranya:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sebagai penutup gelas kimia (<i>Beaker Glass</i>) ketika sedang melakukan proses pemanasan sampel (penguapan); 2. sebagai tempat untuk mengeringkan padatan di dalam desikator; 3. sebagai tempat benda yang sedang diamati; 4. sebagai tempat untuk menyimpan bahan yang akan ditimbang.
48	<p style="text-align: center;"><i>Micropipette</i></p> 	<p>Untuk memindahkan cairan dalam jumlah kecil secara akurat, dikhususkan untuk memindahkan cairan dengan volume kurang dari 1.000 μL.</p>

49	<p style="text-align: center;">Sikat</p> 	<p>Untuk menggosok dan membersihkan botol-botol kultur ketika mencuci botol kultur dengan sabun.</p>
50	<p style="text-align: center;"><i>Exhaust fan</i></p> 	<p>Untuk membantu sirkulasi udara di dalam ruangan agar tetap bersih dan segar, karena alat ini akan mengisap udara kotor dari dalam ruangan.</p>
51	<p style="text-align: center;"><i>Container Keranjang</i></p> 	<p>Untuk menyimpan botol-botol kultur dan lain sebagainya.</p>
31	<p style="text-align: center;">Mikroskop</p> 	<p>Untuk memvisualisasikan objek yang sangat kecil seperti sel, mikroorganisme, dan memberikan gambar yang kontras serta diperbesar. Mikroskop terdiri dari lensa untuk pembesaran, yang masing-masing memiliki kemampuan pembesaran tersendiri. Tergantung pada jenis lensa, alat ini akan memperbesar spesimen sesuai dengan kekuatan fokusnya.</p>

53	<p>a. Kaca preparat (<i>object glass</i>), b. kaca penutup (<i>cover glass</i>), c. jarum inokulasi (<i>inoculating needle/transfer needle</i>)</p> 	<p>a. Kaca preparat (<i>object glass</i>) untuk tempat objek atau preparat yang akan diamati, sehingga objek akan lebih jelas ketika diamati.</p> <p>b. Kaca penutup (<i>cover glass</i>) untuk tempat penutup objek atau preparat yang akan diamati, sehingga objek pengamatan tidak terkontaminasi dengan media luar pada saat dilakukan pengamatan.</p> <p>c. Jarum inokulasi (<i>inoculating/transfer needle</i>) untuk memindahkan atau mengambil sampel.</p>
----	---	--

Tabel 2 Pengelompokkan peralatan kultur jaringan berdasarkan kegiatannya

No	Kegiatan Umum	Alat - Alat
1	Pembuatan media	Erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, <i>pipette filler</i> , pipet ukur, neraca analitik, spatula, pH meter, pipet tetes, <i>magnetic stirrer bar</i> , <i>hot plate stirrer</i> , baskom <i>stainless steel</i> , corong, saringan, gunting, kompor listrik, batang pengaduk, labu ukur, botol kultur, autoklaf, labu semprot, dan <i>showcase</i> .
2	Sterilisasi eksplan di dalam proses inisiasi kultur jaringan	Labu ukur, gunting, nampan plastik, gelas ukur, Erlenmeyer, botol kultur yang sudah disterilkan, botol Duran, <i>magnetic stirrer bar</i> , batang pengaduk, corong, saringan, autoklaf, oven, cawan Petri, alat diseksi (pinset, gunting, <i>scalpel</i>), kabinet <i>laminar air flow</i> , dan lampu Bunsen.
3	Subkultur	Cawan Petri, alat diseksi (pinset, gunting, <i>scalpel</i>), kabinet <i>laminar air flow</i> , botol kultur yang sudah disterilkan, dan lampu Bunsen.
4	Aklimatisasi	Bak plastik, pinset, gunting dan botol <i>sprayer</i> .

Tujuan

Praktikan mengenal, mengetahui dan memahami fungsi peralatan yang umum digunakan di dalam teknologi kultur jaringan.

Instruksi Latihan:

Pembagian ruangan di dalam laboratorium meliputi: 1. ruangan persiapan; 2. ruangan transfer (inokulasi) atau ruangan steril; 3. ruangan kultur; dan 4. ruangan cuci. Kelompokkan alat-alat kultur jaringan berdasarkan Tabel 3.

Tabel 3 Pengelompokkan peralatan teknologi kultur jaringan berdasarkan penempatan di ruangan peralatan

No	Alat di ruangan persiapan	Alat di ruangan inkubasi	Alat di ruangan transfer	Alat di ruangan cuci
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				

Catatan:

BAB 3 SANITASI RUANGAN LABORATORIUM

Pendahuluan

Laboratorium memiliki beberapa bagian fungsional dengan beberapa elemen yang mirip, seperti dapur dan ruangan untuk bekerja. Beberapa area dikhususkan untuk penanganan awal sampel yang akan dikultur, persiapan media, sterilisasi peralatan, ruangan steril untuk manipulasi aseptik, ruangan pertumbuhan kultur, dan area yang dikhususkan untuk mencuci dan membersihkan *glasswares* serta peralatan lain.

Salah satu ruangan laboratorium yang harus selalu dijaga kesterilannya adalah ruangan transfer yang digunakan untuk kegiatan pengkulturan secara aseptik, yaitu inokulasi, isolasi dan subkultur. Ruangan ini pada umumnya tidak terlalu besar agar proses sterilisasinya tidak lama dan mudah. Walaupun terdapat peralatan yang dapat menunjang kondisi aseptik, ruangan transfer juga perlu disterilisasi untuk meminimalkan risiko kontaminasi. Sterilisasi merupakan proses yang harus dilakukan menjelang penggunaan ruangan transfer. Lampu ultraviolet dapat digunakan untuk sterilisasi ruangan dengan cara menyalakan lampu ultraviolet apabila ruang inokulasi tidak digunakan, serta dimatikan saat masuk ke dalam ruangan tersebut.

Laboratorium untuk kegiatan teknik kultur jaringan harus memenuhi kriteria aman, bersih, dan memiliki organisasi dan penataan ruangan yang sesuai. Kondisi bagian dalam laboratorium seperti lantai, dinding, meja, alat-alat yang digunakan, dan udara di dalam ruangan laboratorium mutlak harus bersih dan bebas dari debu yang bisa menjadi sumber kontaminasi yang paling potensial. Lantai dan meja laboratorium harus rutin dibersihkan dengan larutan antiseptik. Sebaiknya permukaan meja dan dinding dilapisi dengan porselin supaya kedap air dan mudah dibersihkan.

Kegiatan membersihkan dan mendisinfeksi adalah dua hal yang berbeda. Membersihkan ruangan fokusnya hanya menghilangkan kotoran dari suatu permukaan, seperti partikel debu atau sisa material tumpah organik maupun anorganik. Target pada kegiatan pembersihan adalah permukaan yang secara tampak mata sudah bersih atau sudah memenuhi standar pengukuran dengan instrumen inspeksi kebersihan. Disinfeksi adalah proses menurunkan level mikroba ke tingkat tertentu dengan bantuan bahan kimia disinfektan. Oleh karena itu, secara praktis untuk mendapatkan hasil disinfeksi yang maksimal harus didahului dengan pembersihan yang optimal.

Laboratorium merupakan sarana penunjang yang digunakan di dalam kegiatan eksperimen, riset, hingga pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi. Secara umum, lingkungan di dalam laboratorium dikondisikan secara terkendali dengan tujuan untuk menyesuaikan aktivitas laboratorium pada keadaan yang seimbang. Untuk mencegah dan mengeliminasi kontaminasi perlu dilakukan sanitasi ruangan. Sanitasi dilakukan dengan

menggunakan air dan peralatan yang bersih ketika melakukan kegiatan di laboratorium yang membutuhkan keadaan steril. Kebersihan laboratorium juga dijaga dengan membersihkan seluruh ruangan laboratorium hingga ke setiap sudut ruangan yang dianggap kotor dengan alkohol 70% dan disinfektan untuk meminimalkan kontaminasi silang. Selain itu juga diperlukan perlengkapan praktikum seperti masker dan sarung tangan untuk meminimalkan adanya kontaminasi.

Aktivitas di dalam laboratorium memerlukan keadaan steril. Kegiatan sterilisasi ruangan laboratorium dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu dengan menggunakan fenol (Malav & Saxena 2018), hipoklorit (Campagna *et al.* 2016), formaldehid/formalin, etilen oksida (Andersen 2019), hidrogen peroksida dan lisol (Cadnum *et al.* 2017). Disinfektan biasanya digunakan untuk membersihkan lantai hingga meja kerja laboratorium.

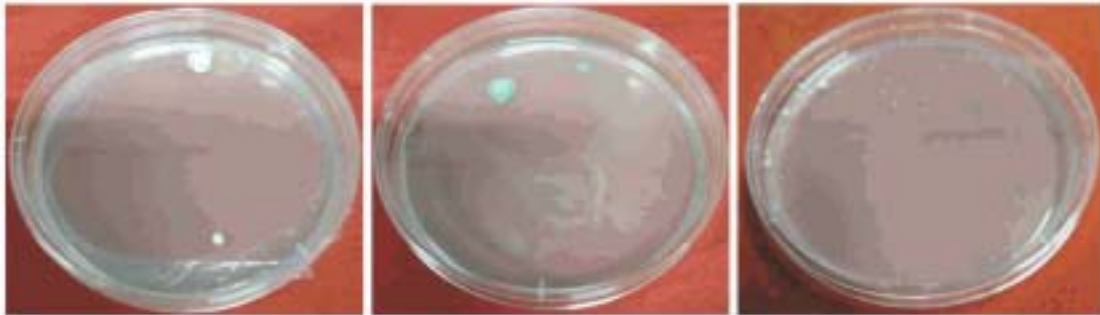
Dalam penelitian yang dilakukan oleh Malav dan Saxena (2018), beberapa mikroorganisme ditemukan di dalam laboratorium sebelum kegiatan sterilisasi, seperti *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus sp.*, *Candida sp.* dan jenis fungi lain. Menurut Martono (2015) mikroorganisme yang sering ditemukan di ruangan laboratorium antara lain *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Sarcina sp.*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus albus*, *Acinetobacter calcoaceticus* dan *Aspergillus niger*. Variasi morfologi mikroorganisme yang mengkontaminasi ruangan laboratorium disajikan pada Gambar 4.

Setelah mengalami proses sterilisasi yang terstandarisasi, terjadi penurunan jumlah mikroorganisme. Namun, ketika mengalami proses sterilisasi yang tidak terstandarisasi, penurunan jumlah mikroorganisme tidak sebesar pada proses yang terstandarisasi. Oleh karena itu, perlu adanya sterilisasi ruangan yang terstandarisasi agar dicapai ruangan yang minim kontaminasi. Kampt *et al.* (2020) menyatakan bahwa berdasarkan analisis dari 22 studi, virus korona manusia seperti *Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)* corona virus, *Middle East Respiratory Syndrome (MERS)* corona virus atau corona virus manusia endemik (HCoV) dapat bertahan pada permukaan benda mati seperti logam, kaca atau plastik hingga 9 hari, tetapi dapat secara efisien dinonaktifkan dengan prosedur disinfeksi permukaan menggunakan etanol 62 - 71%, hidrogen peroksida 0,5% atau natrium hipoklorit 0,1% dalam waktu 1 menit.

Disinfeksi adalah proses mengurangi jumlah mikroorganisme. Bahan yang digunakan untuk proses disinfeksi disebut disinfektan. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil proses disinfeksi antara lain:

1. Beban organik (beban biologis) yang dijumpai pada benda.
2. Tipe dan tingkat kontaminasi mikroorganisme.
3. Pembersihan/dekontaminasi benda sebelumnya.
4. Konsentrasi disinfektan dan waktu paparan.
5. Struktur fisik benda.
6. Suhu dan pH dari proses disinfeksi.
7. Kelembaban ruangan.

8. Zat aktif dan cara kerja disinfektan yang digunakan.
9. Pelarut yang tepat.
10. Cara aplikasi disinfektan dan waktu disinfeksi secara periodik.



Gambar 4 Variasi mikroorganisme yang mengkontaminasi ruangan laboratorium

Untuk mengetahui apakah proses disinfeksi yang dilakukan sudah benar dan memang efektif kerjanya, maka perlu dilakukan *monitoring* ruangan secara rutin. *Monitoring* dapat dilakukan dengan melakukan *sampling* untuk menghitung jumlah mikroorganisme yang ada di dalam ruangan sebelum dan sesudah didisinfeksi. Data-data hasil *monitoring* yang terkumpul akan memberikan profil level mikrobial dari serangkaian kegiatan pembersihan dan disinfeksi, sehingga akan memberikan informasi kepada kita apakah pembersihan dan disinfeksi harus dilakukan lebih sering atau dikurangi frekuensinya. Dengan demikian level mikrobialnya akan terkontrol dengan baik.

Tujuan

Praktikan mengenal dan memahami proses sanitasi ruangan kerja laboratorium dengan tetap menjaga dan memelihara kebersihan sebelum bekerja di dalam laboratorium.

Alat:

- a. *Hand sprayer*.
- b. Ember.
- c. Kain pel.
- d. Kain mikrofiber bersih.
- e. Kapas atau tisu.
- f. Tempat sampah.
- g. Masker.
- h. Sarung tangan.

Bahan:

- a. Alkohol.
- b. Air bersih.
- c. Disinfektan (karbol/hipoklorit).
- d. Formalin.
- e. Detergen.

Instruksi Latihan:

1. Gunakan alat pelindung diri standar, seperti masker dan sarung tangan.
2. Sebelum melaksanakan disinfeksi, pembersihan permukaan meja dan lantai harus sudah dilakukan dengan menggunakan kain mikrofiber yang sudah direndam dengan detergen.
3. Siapkan air bersih di dalam ember, sesuai kebutuhan.
4. Campurkan disinfektan dan air di dalam ember dengan perbandingan 50 mL disinfektan di dalam 1.000 mL air bersih, lalu aduk hingga rata. Jika menggunakan hipoklorit (cairan pemutih), masukkan 95 mL hipoklorit di dalam 905 mL air (total air 1.000 mL).
5. Masukkan kain mikrofiber ke dalam ember yang berisi disinfektan, lalu peras hingga tidak ada tetesan air dari kain mikrofiber.
6. Bersihkan meja di laboratorium dan perabot lain dengan kain mikrofiber yang sudah dicelupkan ke dalam larutan yang mengandung disinfektan.
7. Bersihkan gagang pintu dengan cara disemprot cairan disinfektan
8. Bersihkan juga lantai dengan kain pel yang sudah dicelupkan ke dalam larutan disinfektan.
9. Jika menggunakan alkohol, semprotkan alkohol 70% pada meja kerja di ruangan dan gunakan kapas/kain mikrofiber untuk meratakan alkohol di permukaan meja dan bagian sudut meja.
10. Membuat stok alkohol 70% dengan cara mengencerkan alkohol 96% berdasarkan rumus pengenceran sebagai berikut:

V_1 : Volume awal.

M_1 : Konsentrasi awal.

V_2 : Volume akhir.

M_2 : Konsentrasi akhir.

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 96\% = 100 \text{ mL} \times 70\%$$

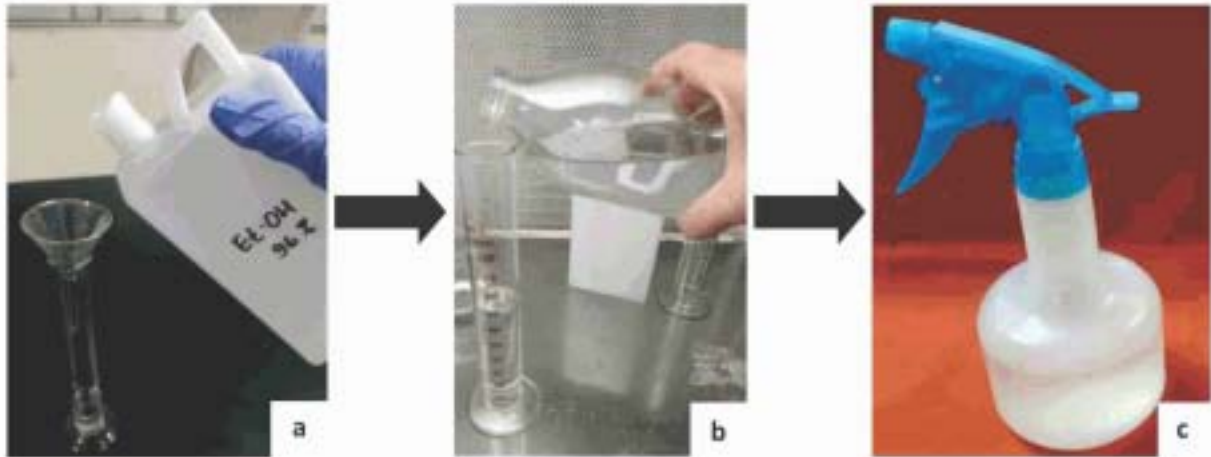
$$V_1 = \frac{100 \text{ mL} \times 70\%}{96\%}$$

$V_1 = 73 \text{ mL}$ (Volume alkohol 96% yang diambil untuk diencerkan menjadi 70%).

Volume *aquadest* yang ditambahkan adalah $100 \text{ mL} - 73 \text{ mL} = 27 \text{ mL}$.

Jadi pengerjaannya adalah sebagai berikut:

Sebanyak 73 mL alkohol 96% dimasukkan ke dalam gelas ukur (a), lalu tambahkan *aquadest* 27 mL (b), selanjutnya dimasukkan ke dalam *hand sprayer* (c).



11. Lakukan sterilisasi ruang inkubasi dengan menggunakan formalin. Tuangkan formalin ke dalam cawan Petri dan simpan di setiap pojok ruangan minimal selama 1 - 2 hari hingga formalin tersebut habis menguap. Kegiatan ini dilakukan satu minggu sekali. Sebaiknya dilakukan setiap hari Jum'at, sehingga hari Sabtu dan Minggu (hari libur) tidak ada aktivitas di dalam ruang inkubasi.
12. Tutup rapat ruangan yang sedang diberi formalin. Pada hari selanjutnya, apabila masih tercium gas formalin, maka *exhaust fan* ruangan dibuka hingga gas formalin tidak tercium lagi.
13. Bersihkan juga lingkungan di sekitar laboratorium.

Catatan:

BAB 4 PEMBUATAN *HAND SANITIZER*

Pendahuluan

Teknik kultur jaringan sangat membutuhkan kondisi aseptik/bebas kontaminasi. Sumber kontaminasi umumnya ada 4, yaitu: 1. tanaman, baik secara internal maupun eksternal; 2. media kultur yang tidak disterilisasi dengan baik; 3. kondisi lingkungan; dan 4. cara kerja pelaksana yang kurang teliti, misalnya tangan pelaksana yang kurang steril.

Masa pandemi Covid-19 (2019 Novel Coronavirus) sejak bulan Desember 2019 telah meningkatkan kesadaran akan pentingnya berperilaku steril. Menurut sebuah studi baru dari *National Institutes of Health, CDC, UCLA* dan ilmuwan Universitas *Princeton di the New England Journal of Medicine* menyebutkan bahwa virus penyebab penyakit Covid-19 berada dalam kondisi stabil selama beberapa jam hingga berhari-hari. Para ilmuwan menemukan bahwa sindrom pernafasan akut corona virus 2 (SARS-CoV-2) terdeteksi di udara dalam bentuk aerosol hingga 3 jam, 4 jam pada tembaga, 24 jam pada karton dan 2 - 3 hari pada plastik dan *stainless steel*.

Tangan merupakan bagian tubuh yang paling sering terkontaminasi baik oleh mikroorganisme maupun virus, karena tangan sering berinteraksi dengan benda-benda lain di luar tubuh manusia. Ketika tangan yang tidak steril menyentuh bagian tubuh manusia, maka tubuh manusia akan terkontaminasi baik oleh mikroorganisme maupun virus yang berada di tangan.

Berdasarkan pengetahuan tersebut di atas, maka penggunaan *hand sanitizer* sangatlah penting sebagai pendukung sterilisasi, baik di dalam maupun di luar laboratorium. Dalam rangka mendukung program sterilisasi, Laboratorium Bioteknologi SEAMEO BIOTROP berkontribusi dalam hal penyebaran informasi tentang pembuatan *hand sanitizer* sesuai dengan pedoman dari *World Health Organization (WHO)* tahun 2009 tentang kebersihan tangan dalam perawatan kesehatan. Di dalam pedoman tersebut, WHO merekomendasikan: 1. penggunaan hidrogen peroksida untuk menonaktifkan kontaminasi bakteri dan spora fungi di dalam larutan; 2. gliserol sebagai humektan (*water-based moisturizer*); dan 3. etanol sebagai disinfektan yang berfungsi untuk mencegah infeksi lebih lanjut (antiseptik). Pilihan WHO untuk komponen *hand rubs* telah diperhitungkan baik dari segi biaya yang relatif murah maupun efisiensi mikrobiologis. WHO merekomendasikan penggunaan *hand sanitizer* berbasis alkohol sebagai antiseptik tangan rutin di dalam sebagian besar situasi klinis.

Keunggulan *hand sanitizer* produksi Laboratorium Bioteknologi SEAMEO BIOTROP ini antara lain:

1. Tidak menimbulkan iritasi dan alergi.
2. Aman bagi kulit sensitif dan tidak bersifat toksik.
3. Menjaga kelembaban pada tangan, sehingga tangan tidak kering.

4. Aroma golongan etanol tidak terlalu kuat, sehingga tidak terlalu menyengat di hidung. Namun, tidak mengurangi manfaat dari *hand sanitizer*.
5. Tersedia dalam 3 varian yang mengandung *essential oil* yaitu:
 - ✓ *Floral*: memberikan aroma kelembutan.
 - ✓ *Mint*: memberikan aroma kesegaran.
 - ✓ Sereh wangi: aroma yang ditimbulkan dapat mengusir nyamuk.

Varian lain yang masih bisa dikembangkan adalah aroma buah-buahan, kayu putih (*Melaleuca leucadendra*), lidah buaya (*Aloe vera*), *lavender*, minyak nilam (*Pogostemon cablin*), rempah-rempah dan lain-lain.

Hand sanitizer menjadi kebutuhan penting selama pandemi dan produk ini menjadi alternatif bahan untuk mencuci tangan saat tidak dapat menjangkau air dan sabun. Beberapa kesalahan dalam menggunakan *hand sanitizer* sering dilakukan, sehingga penggunaan *hand sanitizer* menjadi tidak efektif, serta membuat kuman dan virus tidak terbasmi dari tangan secara sempurna.

Beberapa kesalahan dalam menggunakan *hand sanitizer* antara lain:

1. Menggunakan produk *hand sanitizer* yang mengandung alkohol berkonsentrasi kurang dari 60%.
2. Terlalu sedikit menggunakan *hand sanitizer*. Orang dewasa sebaiknya menggunakan *hand sanitizer* sebanyak seperempat dari ukuran telapak tangan.
3. Tidak mengaplikasikan *hand sanitizer* ke seluruh tangan. Gunakan *hand sanitizer* untuk melapisi dan menutupi bagian depan dan belakang tangan, serta jari-jari dan area di antara jari-jari. Jika *hand sanitizer* hanya digosokkan pada kedua telapak tangan, maka penggunaan *hand sanitizer* tidak akan efektif.
4. Terburu-buru ketika menggunakan *hand sanitizer*. Sebaiknya menggosokkan *hand sanitizer* di tangan selama sekitar 20 detik.
5. Mengusapkan tangan kepada kain setelah menggunakan *hand sanitizer*. Sensasi basah setelah menggunakan *hand sanitizer* bisa jadi tidak menyenangkan. Namun, jangan mengeringkan tangan menggunakan handuk, pakaian atau kaki celana. Melakukan hal tersebut dapat mengurangi efektivitas *hand sanitizer* dan kembali mencemari tangan. Sebaiknya menggosokkan kedua tangan sampai *hand sanitizer* mengering daripada menyekanya.
6. Menyimpan *hand sanitizer* di suhu panas atau dingin. Idealnya *hand sanitizer* disimpan di antara suhu 15 sampai 30 °C. Hindari suhu panas ekstrem saat menyimpan *hand sanitizer*. Menjaga *hand sanitizer* pada suhu kamar adalah pilihan terbaik.
7. Menggunakan *hand sanitizer* pada saat tangan sangat kotor. *Hand sanitizer* bisa membersihkan, tetapi ketika tangan kotor, maka *hand sanitizer* tidak berfungsi dengan baik. Jadi jika tangan dalam keadaan sangat kotor, sebaiknya segera cari sabun dan air untuk mencucinya.

8. Terlalu sering menggunakan *hand sanitizer*. *Hand sanitizer* adalah pilihan yang bagus. Namun, itu bukan satu-satunya cara untuk menjaga kebersihan tangan, dan bukan merupakan pilihan terbaik.

Tujuan

Praktikan dapat membuat *hand sanitizer*.

Alat:

- a. Gelas ukur 1.000 mL.
- b. Gelas ukur 100 mL.
- c. Erlenmeyer.
- d. *Stirrer*.
- e. *Magnetic stirrer bar*.
- f. Botol.
- g. Corong.
- h. Mikropipet.
- i. Tips mikropipet.
- j. Labu ukur semprot.
- k. Sarung tangan (*Gloves*).
- l. Masker.

Bahan:

- a. Alkohol 96% (Etanol).
- b. H₂O₂ 3% (Hidrogen peroksida).
- c. Gliserol 98%.
- d. *Aquadest*.
- e. *Essential oil*.

Instruksi Latihan:

Tabel 4. Formula 1 L stok *hand sanitizer* berdasarkan pedoman WHO dan dimodifikasi

No.	Komponen Bahan	Volume
1.	Alkohol 96%	833,30 mL
2.	H ₂ O ₂ 3%	41,70 mL
3.	Glyserol 98%	81,63 mL
4.	<i>Aquadest</i>	43,40 mL
Total volume		1.000 mL

Tahapan membuat *hand sanitizer*:

1. Tuang 833,30 mL alkohol 96% ke dalam gelas ukur berkapasitas 1.000 mL.



2. Tuang 41,70 mL H₂O₂ 3% (Hidrogen peroksida) ke dalam gelas ukur berkapasitas 100 mL.



3. Tuang 25 mL gliserol 98% ke dalam gelas ukur berkapasitas 100 mL.



4. Tuang masing-masing alkohol, H₂O₂, dan gliserol ke dalam labu ukur berkapasitas 1 L.



5. Tambahkan *aquadest* (a), selanjutnya untuk tahap terakhir tambahkan *aquadest* dengan menggunakan labu semprot (b) agar meniskus bawah cairan merapat dengan batas tera labu ukur hingga tepat 1 L.



Batas tera
aquadest
1 L

6. Tuang isi labu ukur ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi *magnetic stirrer bar*.



7. Aduk larutan dengan menggunakan *magnetic stirrer bar* dan *stirrer* hingga larutan menjadi homogen.



8. Pipet *essential oil* sereh wangi, floral atau mint (sesuai selera) sekitar 500 - 1.000 μL . Jika penambahan *essential oil* dilakukan dengan menggunakan pipet tetes, maka ambillah sekitar 5 - 10 tetes. Jika memilih aroma original, maka tidak perlu ada penambahan *essential oil*.



9. Masukkan *essential oil* ke dalam Erlenmeyer yang berisi larutan *hand sanitizer*.



10. Aduk larutan *hand sanitizer* dengan *magnetic stirrer bar* dan *stirrer* hingga larutan menjadi homogen.



11. Tuang larutan *hand sanitizer* dari Erlenmeyer ke dalam wadah lain untuk disimpan sebagai stok.



12. Tuang larutan *hand sanitizer* ke dalam botol kecil untuk keperluan perorangan atau botol besar untuk ditaruh di tempat umum.



13. Simpan larutan *hand sanitizer* selama 72 jam sebelum langsung digunakan. Tipe botol yang dapat digunakan adalah tipe semprot (a) atau tipe *pump* (b).



Catatan:

- Sebaiknya ruangan untuk memproduksi dan menyimpan larutan *hand sanitizer* memiliki suhu 7 - 23 °C dan tidak terkena sinar matahari langsung. Jika disimpan di dalam suhu tinggi, maka efektivitas *hand sanitizer* sebagai disinfektan akan berkurang, karena alkohol yang menjadi bahan dasar pembuatan *hand sanitizer* tersebut akan terurai. Alkohol merupakan zat kimia yang bersifat stabil apabila disimpan di suhu ruangan dan tidak terkena sinar matahari langsung. *Hand sanitizer* yang berbahan dasar hidrogen peroksida (*hydrogen peroxide*) juga akan terurai jika terpapar sinar ultra violet dari sinar matahari langsung. Dengan demikian, *hand sanitizer* harus disimpan di dalam ruangan dan tidak terkena sinar matahari langsung, agar bisa disimpan dalam waktu yang lama.
- Dilarang merokok di sekitar area produksi *hand sanitizer*.
- Persyaratan khusus berlaku untuk memproduksi dan menyimpan formulasi, serta menyimpan produk utama. Formulasi *hand sanitizer* yang direkomendasikan oleh WHO tidak boleh diproduksi dalam jumlah melebihi 50 liter secara lokal atau di apotek.
- Etanol yang tidak dilarutkan sangat mudah menguap dan dapat menyala pada suhu rendah atau sekitar 10 °C. Dengan demikian, sebaiknya larutan stok langsung digunakan dan diencerkan konsentrasinya.
- Gunakan sarung tangan dan masker dalam kegiatan memproduksi *hand sanitizer*.

BAB 5 PROSEDUR PENGGUNAAN DAN PEMELIHARAAN *LAMINAR AIR FLOW (LAF)*

Pendahuluan

Ruangan penanaman merupakan ruangan yang digunakan untuk isolasi, inokulasi dan subkultur pada kondisi steril. Di dalam ruangan tersebut terdapat kabinet yang disebut *Laminar Air Flow (LAF)*. *Laminar Air Flow* adalah suatu alat dengan bentuk meja kerja tertutup yang mendukung penanaman eksplan secara aseptik.

Secara spesifik alat ini digunakan untuk proses persiapan bahan tanaman, penanaman, pemotongan eksplan, dan subkultur/pemindahan tanaman. Prinsip kerja *Laminar Air Flow (LAF)* secara singkat adalah dengan cara meniupkan udara yang steril secara terus menerus dan juga konsisten. LAF mengalirkan udara dari *blower* ke arah luar untuk mencegah kontaminan dari luar masuk ke dalam. Udara yang ditarik dari luar LAF akan disaring dengan HEPA filter terlebih dahulu sebelum dialirkan ke dalam LAF, sehingga sampel atau eksplan tetap steril, terbebas dari bakteri, debu, fungi, mikroba, spora dan kontaminan lainnya. *Laminar Air Flow* memiliki nama lain seperti *clean bench*.

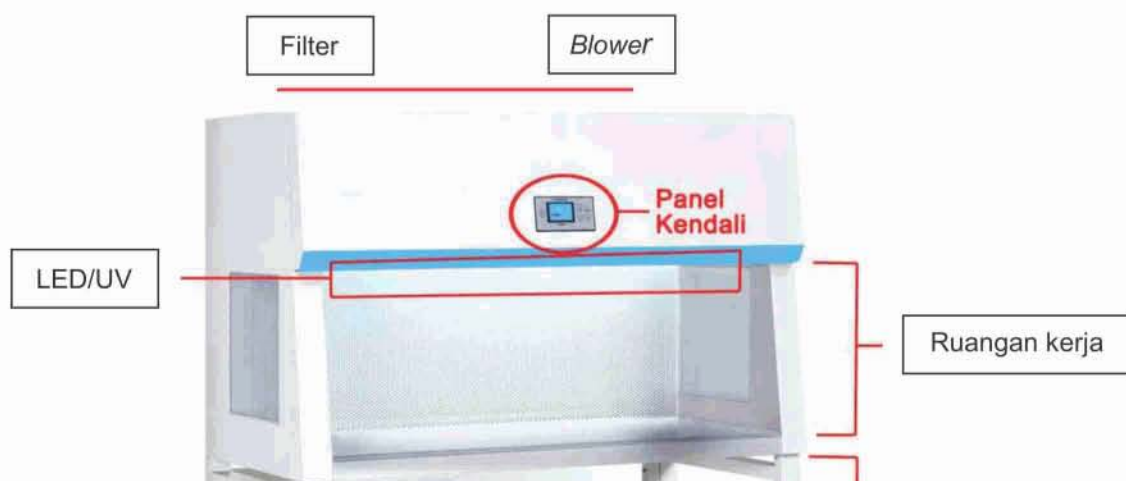
Keamanan dan keselamatan kerja di lingkungan laboratorium sangat dibutuhkan terutama dalam hal masalah mikroorganisme. LAF diharapkan dapat melindungi laboran atau pengguna laboratorium dari paparan bakteri atau mikroorganisme yang mungkin saja berbahaya.

Bagian-bagian LAF disajikan dalam Gambar 5:

1. Panel kendali. Pada panel kendali LAF terdapat beberapa tombol yang digunakan untuk pengaturan operasional LAF. Panel LAF tipe manual memiliki beberapa *switch* atau saklar yang digunakan untuk lampu UV, lampu LED dan *blower*.
2. Ruang Kerja (*chamber*) untuk kegiatan penanaman atau inokulasi.
3. Lampu UV untuk mensterilkan interior LAF dan peralatan lainnya sebelum digunakan untuk mengeliminasi kontaminan. Sinar UV digunakan karena memiliki kekuatan penetrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan sinar gamma dalam proses sterilisasi permukaan dan mampu mengeliminasi kontaminan pada peralatan (Tomlin 2016). Lampu UV yang biasa digunakan pada LAF adalah lampu UV tipe C, sinar UV tipe ini dimanfaatkan untuk mematikan organisme seperti bakteri dan kuman pada proses sterilisasi. Sinar UV dapat langsung menghancurkan sel bakteri maupun kuman dibandingkan dengan penggunaan bahan kimia, obat, atau detergen yang dapat merusak lingkungan. Selain merusak lingkungan, bahan tersebut hanya mampu merusak kulit sel tetapi tidak dapat menghancurkan inti sel dari bakteri maupun kuman tersebut. Saat pemakaian LAF, lampu

UV harus dimatikan sehingga tidak membahayakan pengguna laboratorium dan sampel. Paparan sinar UV dapat menimbulkan pengaruh yang merugikan kesehatan tubuh seperti mata, kulit, dan sistem kekebalan tubuh. Mata yang terkena paparan sinar UV dapat mengalami *photokeratitis*, *photoconjunctivitis*, efek terbakar pada retina, kanker, serta katarak. Kulit yang terkena paparan UV dapat mengalami *eritema* dan meningkatkan penuaan kulit. Selain itu, sinar UV dapat menyebabkan perubahan distribusi dan fungsi sel darah putih untuk melawan penyakit yang menyebabkan kerusakan sistem kekebalan tubuh.

4. Lampu LED untuk memberikan pencahayaan yang cukup. Kelebihan lampu ini adalah menghasilkan cahaya yang lebih terang, umur pemakaiannya panjang, dan bentuk yang variatif.
5. *Blower* pada LAF adalah suatu perangkat yang berfungsi untuk menciptakan aliran udara berkelanjutan secara mekanis. Kegunaan ini biasanya diaplikasikan pada laminar flow *biological safety cabinet* sebagai sumber penghasil aliran udara yang mampu mendorong udara keluar sehingga mampu mendorong kontaminan keluar dari dalam *chamber*. Hembusan udara yang masuk ke dalam LAF diusahakan tidak terlalu kencang dan tidak juga terlalu lemah.
6. *Pre-filter* adalah saringan pertama terhadap debu dan benda yang kasar. Ukuran pori-pori *pre-filter* adalah sekitar 5 μm . Setelah udara lolos melalui *pre-filter*, maka akan ada filter selanjutnya yang melakukan tugas membersihkan udara dari mikroorganisme seperti fungi, bakteri ataupun virus.
7. HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*) Filter dan ULPA (*Ultra Low Particulate Air*) Filter pada LAF memiliki peran yang sangat penting untuk mencegah kontaminan masuk bersamaan dengan udara yang masuk ke dalam *chamber*. Menurut Jain dan Reed (2019), filter HEPA mampu menyaring 99,97% partikel berukuran 0,3 μm , sehingga mampu mengurangi kontaminasi bakteri yang berasal dari udara.



Gambar 5 Bagian-bagian *Laminar Air Flow* (LAF)

Jenis LAF yang umum digunakan di Indonesia adalah:

- *Vertical LAF*, yaitu jenis LAF yang menghembuskan udara dari atas ke bawah, kemudian keluar melalui bagian bawah ruangan kerja. Di dalam jenis LAF ini, filter HEPA berada di bagian atas kabinet. Udara akan disaring terlebih dahulu oleh *pre-filter* kemudian aliran udara akan melewati filter HEPA dari atas ke bawah.
- *Horizontal LAF*, yaitu jenis LAF dengan filter HEPA yang terletak di bagian depan LAF. Udara akan disaring terlebih dahulu oleh *pre-filter* kemudian aliran udara akan melewati filter HEPA secara horizontal. Dengan demikian, penyebaran udara di ruangan kerja lebih luas. Biasanya kegiatan kultur jaringan menggunakan LAF horizontal.

Tahapan dasar yang perlu diketahui sebelum menggunakan LAF antara lain:

1. Ketahui dan pahami SOP atau petunjuk keselamatan penggunaan LAF.
2. Lakukan pengecekan untuk fungsi *blower*, lampu UV dan lampu LED sebelum menggunakan LAF.
3. Tidak diperbolehkan menggunakan LAF yang sedang dalam keadaan rusak.
4. Sebelum menggunakan LAF, wajib untuk membersihkan LAF dengan alkohol 70% dan menyalakan lampu UV serta *blower* selama ± 30 menit.
5. Kaca atau akrilik pada LAF harus selalu berada pada posisi yang benar, terutama ketika sudah mulai bekerja.
6. Siapkan dan masukkan alat dan bahan yang telah disterilisasi ke atas meja kerja LAF.
7. Hindari penggunaan lampu Bunsen di dekat filter LAF, karena akan merusak filter akibat suhu panas yang dihasilkan oleh lampu Bunsen.
8. Hindari bekerja secara berkelompok pada LAF yang sama.
9. Hindari banyak orang hilir mudik melintas di depan LAF.
10. Bersihkan LAF setelah digunakan dan pastikan meninggalkan LAF dalam keadaan bersih.
11. Matikan lampu UV, LED dan *blower* LAF setelah selesai digunakan.

Tujuan

Praktikan memahami tata cara penggunaan LAF dan mengoperasikan serta memelihara LAF untuk kegiatan kultur jaringan.

Alat:

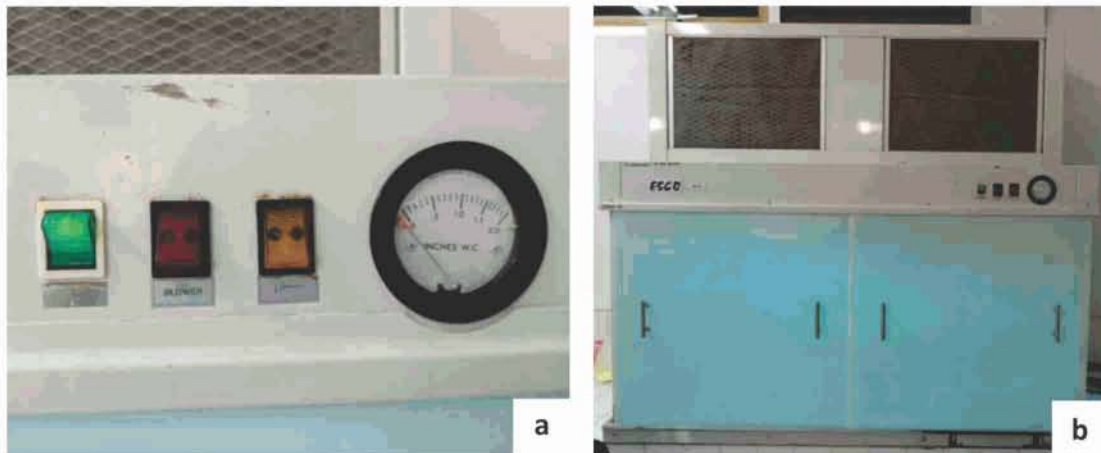
- a. LAF (*Laminar Air Flow*).
- b. *Sprayer*.
- c. Botol jar.
- d. Lampu Bunsen.
- e. Cawan Petri.

Bahan:

- a. *Hand sanitizer*/ Alkohol 70%.
- b. Korek api.
- c. Spiritus.
- d. Kapas/Tisu.
- e. Formalin.

Instruksi Penggunaan LAF:

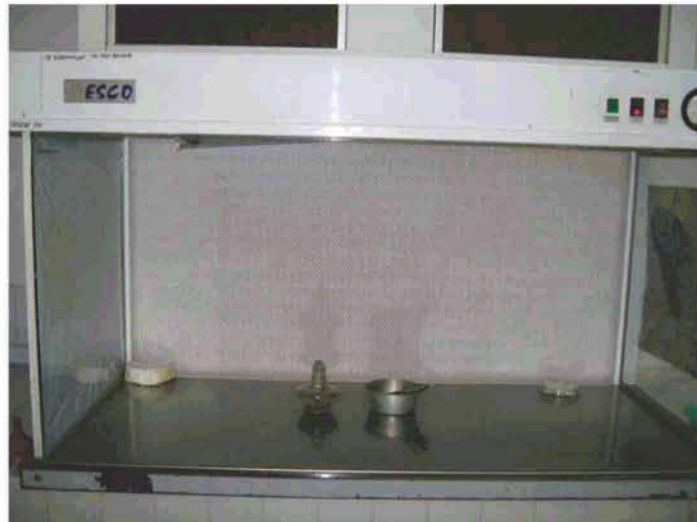
- 1. Sambungkan kabel sumber listrik LAF ke stop kontak di dinding.
- 2. Tekan tombol hijau UV ke posisi bawah untuk mengaktifkan lampu UV LAF (a). Biarkan lampu UV menyala selama ± 30 menit sebelum LAF digunakan. Ketika proses persiapan penggunaan LAF berlangsung (b), lampu UV harus dimatikan, terutama ketika pengguna LAF sudah mulai bekerja. Fungsi lampu UV pada LAF adalah untuk sterillisasi ruangan dan mengurangi jumlah mikroorganisme di dalam LAF dengan cara yang aman.



- 3. Tekan kembali tombol lampu ke posisi atas untuk mematikan lampu UV.



4. Tekan tombol merah untuk menghidupkan *blower* LAF. Fungsi utama *blower* LAF adalah untuk menghembuskan udara bersih yang telah disaring oleh filter ke ruangan kerja dan akan keluar dari posisi atas atau depan.
5. Buka penutup *Laminar Air Flow* (LAF).



6. Tekan tombol kuning untuk menghidupkan lampu LED. Penggunaan lampu LED pada LAF adalah untuk memberikan pencahayaan yang cukup selama proses kegiatan di dalam LAF.



7. Sterilisasi meja dan laminar kabinet dilakukan dengan alkohol 70%. Permukaan laminar sebelum mulai bekerja dibersihkan dengan tisu/kapas yang sudah dicelupkan ke dalam alkohol 70% atau disemprot dengan *sprayer* yang berisi alkohol 70% dan kemudian dilap dengan menggunakan tisu.



8. Sangat dianjurkan untuk menggunakan jas laboratorium yang bersih selama proses kultur jaringan dan mensterilkan tangan dengan alkohol 70%/hand sanitizer sebelum melaksanakan proses kultur jaringan.
9. Alat-alat diseksi seperti *scalpel*, gunting dan alat-alat inokulasi lainnya harus disterilkan dengan alkohol 70% dan dilanjutkan dengan pemanasan di atas api lampu Bunsen.



10. Jika LAF telah selesai digunakan, matikan blower dan lampu LED pada LAF dengan menekan kembali tombol *blower* dan lampu LED serta tutup kembali LAF.



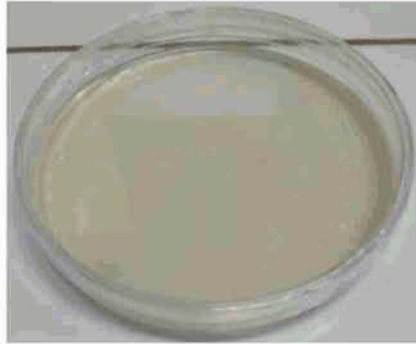
11. Setelah selesai melakukan penanaman atau inokulasi, LAF harus berada dalam keadaan bersih dan steril kembali dengan menyalakan lampu UV selama ± 30 menit.
12. Cabut kabel sumber listrik LAF untuk mematikan aliran listriknya.
13. Isi *logbook* setelah penggunaan LAF.

Instruksi Perawatan LAF:

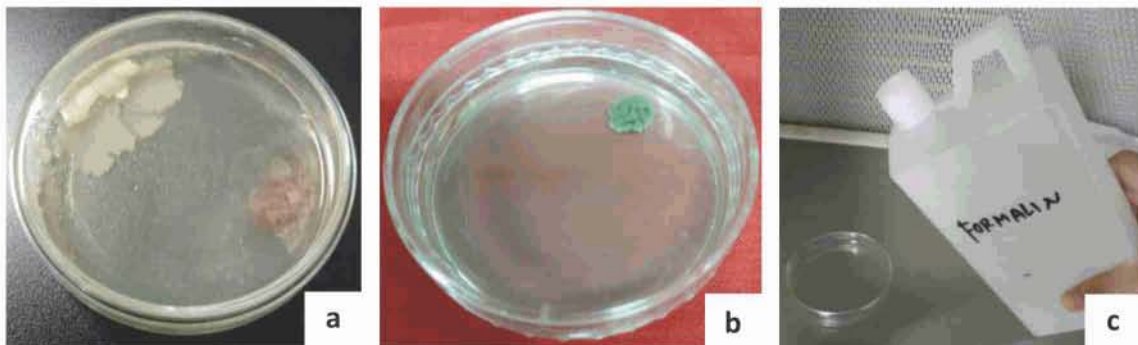
1. Terdapat 2 macam filter pada LAF, yaitu:
 - *Pre-filter* harus sering dibersihkan dengan *vacuum cleaner* dan sebaiknya diganti 1 tahun sekali. *Pre-filter* terletak di bagian atas LAF. Cara membersihkan *pre-filter* adalah dengan melepaskan *pre-filter* dari atap LAF, kemudian cuci dengan air hingga *pre-filter* bersih dan bebas debu yang menempel. Lalu *pre-filter* dijemur di bawah sinar matahari hingga kering.
 - HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) filter.
HEPA filter diganti setelah melalui pemeriksaan dengan *particulate count* atau dengan alat yang disebut *magnehelic gauge*. Penggantian juga tergantung pada frekuensi pemakaian.
2. Pemeriksaan sterilisasi LAF.
 - a. Letakkan cawan Petri steril yang berisi media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan posisi cawan terbuka di dalam LAF kabinet selama ± 20 menit.



- b. Inkubasi cawan Petri tersebut selama ± 5 hari di dalam suhu ruangan.



- c. Amati apakah terdapat koloni yang tumbuh pada cawan Petri. LAF dapat dikatakan steril apabila tidak terdapat koloni mikroorganisme (fungi/bakteri) yang tumbuh di dalam cawan Petri tersebut (sama sekali tidak ada perubahan seperti ketika pertama kali cawan Petri diinkubasi). Apabila tidak terjadi kontaminasi, kondisi laminar masih layak digunakan.
- d. Apabila terjadi kontaminasi, yaitu terdapat koloni bakteri (a) atau fungi (b) yang tumbuh di cawan Petri LAF, maka segera dilakukan inkubasi formalin dengan cara meletakkan formalin 30 - 40% yang berfungsi sebagai antibakteri/pembunuh kuman di cawan Petri kosong (c) dan biarkan satu malam (*overnight*) atau dilakukan penggantian lampu UV, jika lampu UV mati. Setelah itu dilakukan pemeriksaan sterilisasi LAF kembali.



3. Tidak meletakkan lampu Bunsen terlalu dekat dengan filter LAF.
4. Bersihkan LAF kabinet setelah selesai bekerja. Tidak meninggalkan botol bekas, kapas bekas, dan sebagainya di dalam LAF.

BAB 6 STERILISASI PERALATAN GELAS, ALAT DISEKSI, AQUADEST STERIL DAN MEDIA KULTUR

Pendahuluan

Pada prinsipnya semua peralatan, bahan-bahan kimia, dan larutan-larutan yang dipergunakan di dalam kegiatan kultur jaringan harus dalam kondisi steril. Sterilisasi merupakan tahapan penting dalam teknologi kultur jaringan tanaman, karena tahapan ini menentukan jaringan tanaman yang dikultur mengalami kontaminasi atau tidak. Kontaminasi yang terjadi dapat disebabkan oleh banyak hal, seperti peralatan kerja yang kurang steril, tanaman yang dikultur belum cukup steril, hingga kontaminasi dari pekerja karena kelalaian, dan sebagainya.

Peralatan merupakan bagian penting yang harus dijaga keadaan sterilitynya. Peralatan seperti kaca dan alat-alat diseksi berkontak langsung dengan eksplan sehingga mampu menimbulkan kontaminasi silang. Sebelum melakukan kegiatan kultur jaringan, peralatan seperti alat-alat gelas dan diseksi perlu disterilisasi terlebih dahulu. Di dalam tahap sterilisasi terjadi penurunan jumlah mikroorganisme secara drastis, sehingga peralatan menjadi steril. Pengendalian angka mikroorganisme di udara yang menyebabkan kontaminasi dapat dilakukan dengan berbagai cara tergantung macam dan sifat bahan.

Sterilisasi peralatan dapat dilakukan dengan pemanasan uap, sterilisasi kimia, dan sinar UV (Swenson *et al.* 2018). Sterilisasi peralatan dengan pemanasan uap biasanya dilakukan dengan menggunakan autoklaf bersuhu 120 °C dan bertekanan uap 15 psi selama 20 - 30 menit, sedangkan untuk bahan atau media kultur cukup dilakukan selama 15 menit dengan suhu dan tekanan uap yang sama. Sterilisasi yang demikian ini merupakan sterilisasi paling efektif dan ideal untuk mengeliminasi mikroorganisme karena uap merupakan pembawa (*carrier*) energi paling efektif yang melunakkan semua lapisan pelindung luar mikroorganisme, sehingga terjadi degradasi asam nukleat, denaturasi enzim, dan koagulasi protein sel mikroorganisme. Selain itu, pemanasan uap bersifat nontoksik dan relatif mudah dikontrol.

Sterilisasi kering umumnya dilakukan dengan menyimpan peralatan di dalam oven dengan suhu 160 °C selama 4 jam. Di dalam oven terjadi konduksi panas yang akan diadsorpsi oleh permukaan luar dari alat yang disterilkan. Konduksi panas tersebut merambat hingga ke bagian dalam peralatan, sehingga peralatan menjadi steril. Setelah disterilisasi, peralatan tersebut dapat langsung digunakan. Namun, jika botol dan *glasswares* disimpan di dalam oven untuk jangka waktu beberapa lama, maka ketika akan disterilisasi, sebaiknya mulut botol ditutup dengan *aluminium foil* agar tidak terjadi kontaminasi. Sterilisasi kering mengeliminasi kontaminan dengan oksidasi hingga terjadi koagulasi protein sel. Namun, proses eliminasi kontaminan tersebut kurang efektif dibandingkan dengan sterilisasi uap, karena memerlukan waktu yang lebih lama dan suhu yang lebih tinggi.

Sterilisasi kimia menggunakan berbagai bahan kimia seperti H_2O_2 , glutaraldehid, etil oksida, dan fenol (Swenson *et al.* 2018). Jenis sterilisasi dengan menggunakan sinar UV memiliki penetrasi rendah, namun dapat digunakan untuk sterilisasi permukaan alat (Tomlin 2016). Jenis sinar UV dapat dibedakan menjadi 3 macam yaitu UV A, UV B dan UV C (Tabel 5). Dari ketiga sinar UV tersebut yang paling memiliki efek berbahaya/membakar adalah UV C, namun untungnya saat mencapai permukaan bumi yang mengenai tubuh kita hanya UV A, karena hampir seluruh UV C terhalang oleh Ozon sedangkan UV B hampir 90% juga diserap oleh Ozon, uap air dan zat lain. Besar kecilnya UV yang diterima tubuh kita juga dipengaruhi beberapa faktor seperti: sudut datang sinar matahari, posisi lintang yaitu semakin ke kutub semakin kecil, banyaknya awan, ketinggian suatu tempat, lapisan ozon, serta pemantulan dari permukaan bumi. Lampu UV konvensional ini secara rutin digunakan untuk mendekontaminasi peralatan bedah/alat diseksi. Cara kerja UV C ini yaitu memutus rantai DNA dan RNA yang dimiliki sel, sehingga tidak dapat mereplikasi dirinya sendiri dan akhirnya tidak berkembang lagi. Lapisan protein yang dimiliki oleh virus dan bakteri menyebabkan virus dan bakteri tersebut bisa menerima paparan sinar UV C dengan panjang gelombang puncak 265 nm. Dengan demikian, sinar UV C dengan panjang gelombang 254 nm yang banyak digunakan, cukup efektif untuk mensterilisasi peralatan dan bahan dari mikroorganisme spektrum luas.

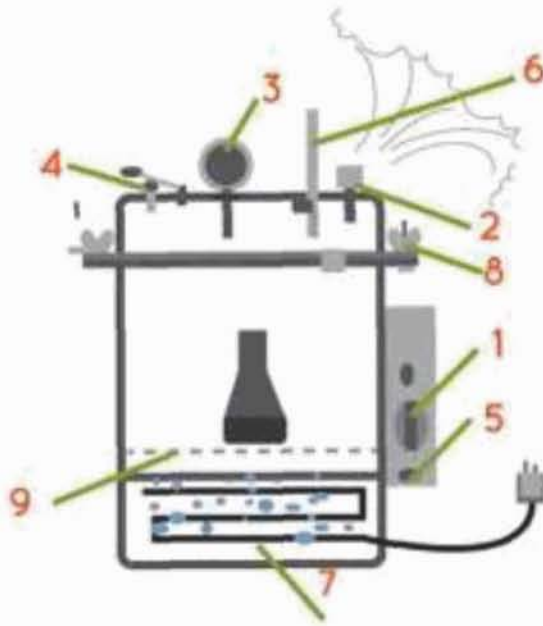
Tabel 5 Jenis sinar ultraviolet (UV)

No	Sinar UV	Panjang Gelombang (nm)
1	UV A	315 - 400
2	UV B	280 - 325
3	UV C	100 - 280

Catatan: 1 nm = 10^{-9} meter (Sumber: Ratna & Rudi 2020)

Sterilisasi di dalam LAF dilakukan dengan memasukkan semua peralatan ke dalam LAF dan disinari dengan UV selama ± 30 menit. Pada saat bekerja, alat-alat seperti pinset dan *scalpel* dapat disterilkan dengan pembakaran di atas api lampu Bunsen.

Autoklaf merupakan alat yang sering digunakan untuk sterilisasi peralatan dan bahan yang digunakan di dalam kegiatan kultur jaringan. Berbagai bagian autoklaf dan fungsinya secara umum disajikan di dalam Gambar 6, sebagai berikut:



Keterangan gambar autoklaf:

1. Tombol pengatur waktu
2. Katup uap
3. Pengukur tekanan
4. Katup pengaman
5. Tombol *on/off*
6. Termometer
7. Lempeng sumber panas (*heater*)
8. Sekrup pengaman (*safety clamp*)
9. Angsa

Gambar 6 Bagian-bagian autoklaf untuk sterilisasi

Fungsi dari setiap bagian autoklaf adalah sebagai berikut:

1. Tombol pengatur waktu (*timer*)
Timer berfungsi untuk mengatur waktu proses sterilisasi, sesuai dengan kebutuhan/ penggunaan yang dibutuhkan.
2. Katup uap
Katup uap berfungsi sebagai tempat keluarnya uap air.
3. Pengukur tekanan
Pengukur tekanan berfungsi untuk mengetahui besar tekanan uap yang ada di dalam autoklaf saat proses sterilisasi tengah berlangsung.
4. Katup pengaman
Katup pengaman berfungsi sebagai penahan atau pengunci penutup autoklaf.
5. Tombol *on/off*
Tombol *on/off* berfungsi untuk menghidupkan atau mematikan autoklaf.
6. Termometer
Termometer berfungsi untuk mengamati suhu di dalam autoklaf agar sesuai dengan suhu yang dibutuhkan.
7. Lempeng sumber panas (*heater*)
Lempeng sumber panas (*heater*) terbuat dari kumparan/lilitan kawat tembaga yang jika dialiri arus listrik akan menghasilkan energi panas. Lempeng tersebut mengubah energi listrik menjadi energi kalor.

8. Sekrup pengaman

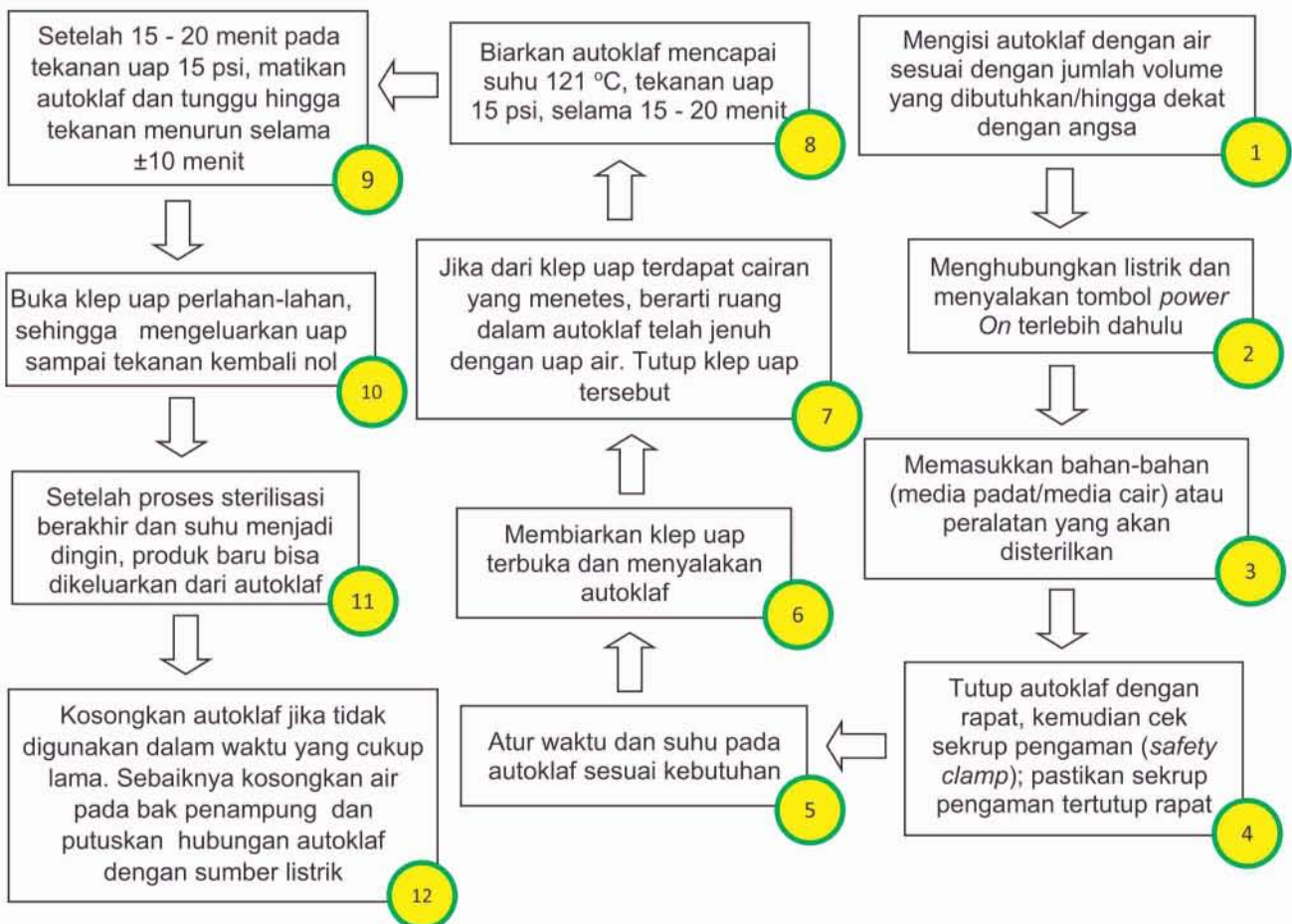
Sekrup pengaman berfungsi untuk menjaga tekanan uap yang ada dalam autoklaf. Pastikan sekrup pengaman ini terpasang dengan rapat.

9. Angsa

Angsa berfungsi sebagai batas penambahan air pada autoklaf yang menggunakan energi listrik. Pada autoklaf yang menggunakan energi panas dari pemanas konvensional, akan ditemukan *aluminium container* yang berfungsi untuk meletakkan berbagai bahan atau alat yang akan disterilkan.

Autoklaf juga memiliki komponen lain seperti pompa *vacuum* yang berfungsi untuk mengisap udara atau uap campuran dari ruangan sterilisasi (*chamber*) di dalam autoklaf. Tahapan cara kerja menggunakan autoklaf untuk sterilisasi disajikan dalam Gambar 7. Penggunaan autoklaf untuk proses sterilisasi harus memperhatikan berbagai hal berikut:

- Suhu (*temperature*) memiliki satuan derajat *Celcius* atau *Fahrenheit*.
- Tekanan uap (*pressure*) memiliki satuan *psi*.
- Lama waktu sterilisasi memiliki satuan menit.
- Lama waktu pengeringan memiliki satuan menit.



Gambar 7 Diagram tahapan cara kerja menggunakan autoklaf untuk sterilisasi

Media yang akan digunakan untuk kultur jaringan harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi media untuk kultur jaringan tidak boleh terlalu lama karena dapat menyebabkan:

- a. Penguraian gula.
- b. Degradasi vitamin dan asam-asam amino.
- c. Inaktivasi sitokinin zeatin riboside.
- d. Perubahan pH yang mengakibatkan depolimerisasi agar.

Waktu yang diperlukan untuk sterilisasi tergantung dari volume dan jenis bahan. Anjuran minimal waktu untuk sterilisasi media disesuaikan dengan jumlah volume media yang dipergunakan (Tabel 6).

Tabel 6 Volume media dan waktu sterilisasi media yang dianjurkan

No.	Volume media (mL)	Waktu sterilisasi media yang dianjurkan pada suhu 121 °C
1.	20 - 50	15 menit
2.	75	20 menit
3.	250 - 500	25 menit
4.	1.000	30 menit
5.	1.500	35 menit
6.	2.000	40 menit

Media yang digunakan dalam kegiatan kultur jaringan dibuat menggunakan air distilasi atau *aquadest*. *Aquadest* digunakan juga sebagai pelarut bahan kimia, pada saat sterilisasi dan pembilasan disinfektan. *Aquadest* adalah air yang dihasilkan dari proses penyulingan dengan tingkat kemurnian tinggi sehingga bebas mineral atau senyawa organik. *Aquadest* adalah komponen media yang paling besar sehingga *aquadest* harus berkualitas tinggi agar pertumbuhan tanaman *in vitro* berkembang dengan bagus. Air biasa seperti air kran (PDAM), air hujan, air sungai, air danau, air sumur, air laut atau air mineral dalam kemasan terlalu banyak mengandung kontaminan bahan organik, anorganik atau mikroorganisme. Bahan-bahan yang digunakan di dalam kegiatan kultur jaringan harus disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Tabel 7 menunjukkan berbagai cara sterilisasi alat dan bahan yang digunakan di dalam kegiatan kultur jaringan.

Tabel 7 Teknik sterilisasi yang digunakan dalam kegiatan kultur jaringan

No.	Teknik sterilisasi	Materi yang disterilisasi
1	Sterilisasi dengan uap/diautoklaf (suhu 121 °C dengan tekanan uap 15 psi selama 20 - 40 menit).	Medium kultur <i>in vitro</i> , <i>aquadest</i> , tabung kultur, botol kultur, alat yang terbuat dari gelas dan plastik tahan panas.
2	Pemanasan kering (<i>dry heat</i>) (suhu 160 - 180 °C selama 3 jam).	Peralatan (<i>scalpel</i> , gunting, pinset), alat yang terbuat dari gelas, pipet, dan plastik.
3	Sterilisasi dengan pemanasan/pembakaran.	Alat diseksi (<i>scalpel</i> , gunting, pinset), mulut dari botol kultur.
4	Sterilisasi dengan penyaringan menggunakan <i>membrane filter</i> yang terbuat dari nitrat selulosa atau asetat selulosa dengan diameter pori filter 0,45 - 0,22 µm.	Bahan-bahan yang tidak tahan terhadap pemanasan (<i>thermolabile</i>), seperti zat pengatur tumbuh asam amino, vitamin dan enzim.
5	Sterilisasi dengan menggunakan alkohol.	Tangan pekerja, <i>Laminar Air Flow</i> (LAF), permukaan meja, permukaan rak kultur dan lain-lain.
6	Sterilisasi permukaan (<i>surface sterilization</i>) dengan menggunakan zat yang mengandung <i>sodium hypochlorite</i> , <i>hydrogen peroxide</i> , <i>mercuri chloride</i> dan lain-lain.	Eksplan

Tujuan

Praktikan mengetahui tata cara penggunaan autoklaf, proses mensterilkan *aquadest*, peralatan gelas dan alat diseksi, serta cara pemeliharaan autoklaf.

Alat:

- Autoklaf.
- Sarung tangan.
- Oven.

Bahan:

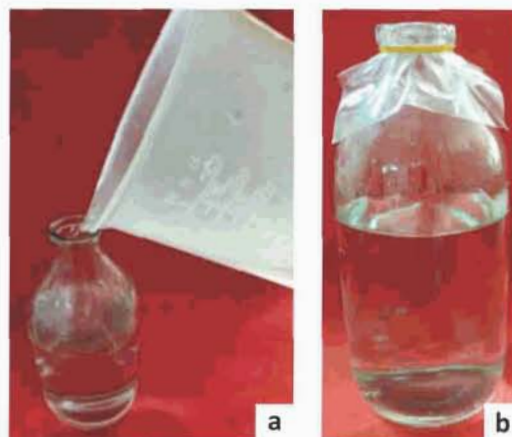
- Kertas pembungkus.
- Plastik tahan panas.
- Air bersih.
- Aquadest*.
- Botol.
- Karet.

Instruksi Sterilisasi Peralatan Gelas, Alat Diseksi dan *Aquadest* Steril:

1. Pastikan peralatan yang akan disterilkan dalam keadaan bersih dan kering.
2. Bungkus dengan kertas: peralatan diseksi yaitu (a) pinset, (b) *scalpel* dan gunting, (c) wadah diseksi, dan (d) cawan Petri dengan beberapa lembar potongan kertas saring, selanjutnya (e) lipat kertas. Kertas pembungkus bisa berupa 2 lembar kertas bekas dengan bagian luarnya terdapat tulisan, agar tinta tidak menempel di cawan Petri/alat lainnya.



3. Masukkan *aquadest* ke dalam botol bersih dengan volume $\pm 2/3$ isi botol (tidak penuh) (a), tutup botol-botol yang akan disterilkan dengan *aluminium foil* atau plastik dan diikat rapat dengan karet (b).



- Masukkan peralatan diseksi, cawan Petri yang sudah dibungkus kertas dan gelas ukur ke dalam plastik tahan panas.



- Masukkan air ke dalam autoklaf secukupnya (± 2 L). Sangat penting untuk selalu mengecek kondisi air di dalam autoklaf, sebelum menggunakan autoklaf. Kondisi air yang kosong di dalam autoklaf akan merusak autoklaf.



- Masukkan peralatan diseksi dan cawan Petri (a), air steril (b) serta botol kosong (c) yang akan disterilkan ke dalam autoklaf.



a



b



c

7. Tutup autoklaf dan kunci tutup tersebut dengan mengencangkan sekrup pengaman (*safety clamp*) hingga rapat. Pastikan katup uap sudah tertutup. Selanjutnya atur tekanan dan atur waktu sterilisasi pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 20 menit.



Pengatur waktu

8. Sambungkan steker autoklaf ke stop kontak dan nyalakan autoklaf dengan menekan tombol *on*.
9. Setelah proses sterilisasi selesai, autoklaf akan berbunyi secara otomatis.
10. Tekan tombol *off* untuk mematikan autoklaf. Cabut steker autoklaf dari stop kontak. Pastikan tekanan autoklaf dari naik (a) menjadi harus sudah 0 psi/suhu sudah turun (b). Autoklaf tidak boleh dibuka sebelum tekanan mencapai 0 untuk menjaga keselamatan pekerja.



11. Gunakan sarung tangan kain tahan panas untuk mengambil peralatan dan bahan yang sudah disterilkan.



12. Masukkan peralatan ke dalam oven 60 °C untuk mengeringkan peralatan sehingga suhunya tidak terlalu tinggi.



Instruksi Pemeliharaan Autoklaf

1. Keringkan air pada dasar autoklaf setelah dipanaskan.
2. Kuras air di dalam autoklaf jika alat tersebut sering digunakan setiap hari.
3. Bersihkan bagian luar alat autoklaf dengan menggunakan lap kain yang lembut.
4. Jangan membuka katup pembuangan uap sebelum tekanan uap di dalam autoklaf mendekati 0 psi karena uap yang keluar dari autoklaf akan mengotori autoklaf dan benda-benda lain di sekitarnya.
5. Lakukan uji efektivitas sterilisasi setiap minggu dengan memasukkan wadah endospore yang tahan panas pada waktu pengoperasian autoklaf.

6. Periksa pengaturan tekanan uap, termometer dan katup pengaman dan pastikan semua bagian tersebut berfungsi dengan baik setiap minggu.
7. Jadwalkan pemeliharaan, kalibrasi dan verifikasi eksternal pada autoklaf setiap tahun untuk memastikan pemantau suhu dan tekanan uap masih bekerja dengan baik dan akurat. Alat *thermocouple wire* digunakan untuk kalibrasi autoklaf.

Catatan:

BAB 7 PENYIAPAN SUMBER EKSPLAN DI LAPANGAN

Pendahuluan

Eksplan merupakan bagian tumbuhan yang diambil dan dikembangkan pada suatu media tumbuh di dalam kegiatan kultur jaringan tumbuhan. Eksplan yang paling umum digunakan dalam kegiatan teknologi kultur jaringan adalah daun, akar, batang, biji, tunas, anther dan kepala sari. Eksplan ada yang ditanam langsung untuk mendapatkan produk yang diinginkan, tetapi ada juga yang digunakan hanya sebagai bahan kultur awal untuk mendapatkan organ juvenil (muda), atau kalus yang relatif bersifat meristematik dan aseptik.

Eksplan perlu dirawat dan dijaga agar bebas dari penyakit, sehingga tumbuhan yang akan dikembangkan memiliki viabilitas yang tinggi dan tidak terkontaminasi. Jenis tumbuhan dan jenis eksplan yang dipilih merupakan hal yang paling penting dalam tahap awal pelaksanaan kegiatan kultur jaringan tumbuhan.

Secara umum, semua jenis tumbuhan dapat digunakan dalam kegiatan kultur jaringan karena sifat totipotensi yang dimiliki (Dias *et al.* 2016). Namun, jenis tumbuhan yang biasa dipilih untuk kegiatan kultur jaringan biasanya memiliki nilai ekonomis dan tidak mudah ditumbuhkan secara konvensional.

Dalam pemanfaatannya, eksplan yang dipilih harus melewati seleksi terlebih dahulu. Eksplan yang terpilih merupakan eksplan yang memiliki titik tumbuh, memiliki viabilitas, dan bebas penyakit. Eksplan yang tidak memiliki titik tumbuh juga dapat dikembangkan melalui tahap induksi yang kemudian membentuk kalus. Namun, pengembangan tumbuhan yang berasal dari kalus memiliki variasi somaklonal dan genetik yang kurang stabil (Opabode 2017).

Untuk memastikan bahwa eksplan yang didapatkan memiliki kondisi optimum, maka dapat dilakukan perawatan tanaman di dalam *greenhouse* atau lingkungan terukur yang lain. Tindakan awal ini dapat memberikan keuntungan yaitu meningkatkan kualitas eksplan dan mencegah berlebihnya jumlah mikroorganisme endofit pada musim tertentu, seperti musim hujan. Namun, perawatan sumber tanaman eksplan dapat memakan waktu lebih lama.

Permudaan sumber eksplan dapat melalui pemotongan pucuk tunas untuk merangsang tumbuhnya tunas-tunas aksiler baru. Eksplan yang diperoleh dari *greenhouse* mempunyai viabilitas yang lebih tinggi daripada eksplan yang diperoleh dari lapangan. Eksplan yang diambil pada musim kering lebih meningkatkan kualitas kultur daripada eksplan yang diambil pada saat musim hujan.

Eksplan yang diambil dari lapangan menjadi bahan dasar bagi pembentukan mikropropagasi tanaman, sehingga dalam mempersiapkan eksplan perlu diperhatikan beberapa hal sebagai berikut:

1. Usia eksplan

Eksplan yang dipilih dapat berasal dari tanaman dewasa atau tanaman berusia muda yang memiliki pucuk muda pada bagian ujungnya. Eksplan yang berasal dari jaringan tumbuhan yang masih muda lebih mudah beregenerasi dan tumbuh dibandingkan dengan jaringan yang sudah terdiferensiasi lebih lanjut. Jaringan muda memiliki sel-sel yang aktif membelah dengan dinding sel yang belum kompleks, sehingga lebih mudah dimodifikasi di dalam kultur daripada jaringan tua. Inisiasi kultur jaringan dilakukan dengan menggunakan pucuk-pucuk muda, kuncup-kuncup muda, hipokotil, *inflorescence* yang belum dewasa, dan lain-lain. Jika eksplan diambil dari tanaman dewasa, maka rejuvenasi tanaman induk melalui pemangkasan atau pemupukan dapat membantu mendapatkan eksplan muda, sehingga kultur lebih berhasil.

2. Kualitas tanaman induk

Sumber eksplan telah diketahui asal-usul dan varietasnya.

3. Eksplan tidak terinfeksi penyakit

4. Genotip tanaman

Eksplan dipilih dari jenis yang unggul.

5. Ukuran dan lokasi eksplan

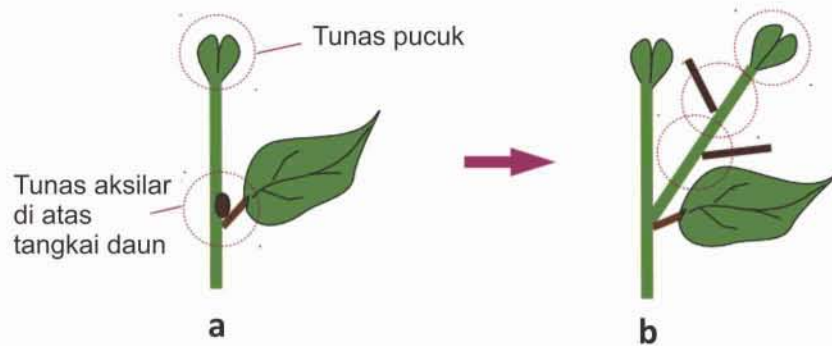
Ukuran eksplan tergantung pada jenis tanaman yang dikulturkan, teknik dan tujuan pengkulturannya. Eksplan memiliki ukuran yang cukup besar, yang menandakan eksplan memiliki cadangan makanan yang cukup untuk tumbuh dan beregenerasi. Namun, eksplan berukuran besar semakin berpeluang untuk membawa mikroorganisme sehingga makin sulit disterilkan, membutuhkan ruangan dan media kultur yang lebih banyak. Eksplan berukuran kecil lebih mudah disterilisasi, tidak memerlukan ruangan besar, tidak memerlukan media kultur yang banyak, namun kemampuannya untuk beregenerasi juga lebih kecil dan membutuhkan media yang lebih kompleks untuk regenerasi dan pertumbuhannya.

6. Secara umum, eksplan pada tahap vegetatif lebih mudah mengalami regenerasi secara *in vitro* dibandingkan dengan eksplan yang diperoleh dari tahap generatif.

7. Waktu pengambilan eksplan, terkait musim, yang mempengaruhi jumlah mikroorganisme endofit.

8. Tujuan yang ingin dicapai dari kegiatan kultur jaringan yang dilakukan.

Dengan diperolehnya eksplan yang sesuai dengan kriteria di atas, maka dapat dikatakan eksplan memiliki kemungkinan daya hidup yang lebih tinggi. Lebih dari 95% kegiatan kultur jaringan menggunakan eksplan yang berasal dari tunas (Gambar 8), karena sederhana, praktis dan secara genetik lebih stabil. Tunas apikal dan tunas lateral merupakan eksplan yang paling baik dalam proses sterilisasi maupun pertumbuhan (Singh 2018).



Gambar 8 Sumber eksplan berupa tunas muda (a) dan bagian tunas yang dapat diambil untuk mikropropagasi (b)

Aneka macam pilihan jenis eksplan yang digunakan tergantung pada tipe respons pertumbuhan yang diinginkan. Jika kegiatan kultur jaringan bertujuan untuk propagasi maka eksplan yang digunakan berasal dari kuncup, tunas lateral atau terminal. Kegiatan kultur jaringan yang bertujuan untuk menginduksi kalus, sebaiknya menggunakan eksplan yang berasal dari kotiledon, hipokotil, batang, daun, atau embrio. Jaringan daun banyak digunakan untuk isolasi protoplas.

Eksplan yang diambil dari tanaman secara alami mempunyai kemampuan regenerasi tinggi untuk menghasilkan kuncup adventif baru, misalnya sebagian kecil batang, daun atau akar. Namun, tanaman yang memiliki kemampuan rendah untuk perkembangan kuncup adventifnya dapat menggunakan eksplan yang berasal dari tunas yang terdapat pada ujung batang utama (tunas pucuk) atau pada cabang (tunas aksiler). Genotip, kultivar, atau spesies dari berbagai genus tumbuhan mempunyai respons yang bervariasi terhadap kondisi kultur. Beberapa genotip bersifat rekalsitran (tidak responsif terhadap kondisi kultur). Sedangkan genotip yang lain sangat mudah membentuk kalus atau mengalami organogenesis tunas.

Tujuan

Praktikan dapat memilih dan menyiapkan sumber eksplan untuk kegiatan kultur jaringan.

Alat:

- a. *Sprayer*.
- b. Gunting.
- c. Botol kosong.
- d. Wadah plastik.

Bahan:

- a. Tanaman sumber eksplan berupa tunas.
- b. Air bersih.

Instruksi Latihan:

1. Sumber eksplan untuk kultur jaringan dapat diambil dari biji, anakan, dan hasil cangkok/stek.
2. Ambil sumber eksplan dari pohon induk yang telah diketahui memiliki potensi.
3. Pelihara sumber eksplan berupa anakan atau hasil cangkok/stek secara intensif di dalam rumah kaca atau ambil langsung sumber eksplan dari lapangan. Jika sumber eksplan berupa pohon, maka lakukan *prunning* (pemangkasan) untuk memunculkan tunas baru sehingga siap untuk diambil sebagai eksplan serta untuk mengambil bagian *autotroph* (tumbuh vertikal).
4. Lakukan pengendalian hama penyakit secara rutin (2 kali seminggu) sebelum pengambilan eksplan dengan menyemprotkan bakterisida, fungisida dan insektisida. Fungisida sistemik yang digunakan sebaiknya mengandung bahan aktif Benomil 50%. Sedangkan bakterisida sebaiknya mengandung bahan aktif Streptomycin sulfat 20%. Konsentrasi fungisida dan bakterisida yang digunakan adalah 2 g/L. Penyemprotan insektisida dilakukan dengan dosis 2 mL/L. Sumber eksplan siap diambil sejak 10 hari setelah perlakuan fungisida dan bakterisida.
5. Siapkan gunting dan *sprayer* (a). Semprot gunting dengan alkohol (b).



6. Isi botol dengan air bersih untuk menampung eksplan.



7. Setelah sumber eksplan didapatkan, maka dipelihara di dalam rumah kaca dan mendapat perlakuan penyemprotan fungisida dan bakterisida. Untuk kegiatan kultur jaringan, pilih pucuk tunas muda yang sehat dan semprot dengan fungisida dan bakterisida. Jika batang eksplan berbulu, gunakan tisu untuk mengelap atau kuas/sikat gigi lembut untuk menghilangkan kotoran yang menyangkut di sela-sela sumber eksplan.



8. Potonglah tunas-tunas muda tanaman dengan menggunakan gunting. Ukuran tunas yang dipotong sebaiknya lebih besar daripada yang diperlukan, yaitu maksimal 3 buku tunas dari pucuk karena di dalam laboratorium tunas tersebut akan dipotong kembali dan dipisahkan antara tunas lateral dan tunas apikal.



- Masukkan sumber eksplan tersebut ke dalam botol yang berisi air hingga tenggelam agar mengurangi penguapan pada sumber eksplan. Tujuan mencegah penguapan adalah untuk mencegah tunas menjadi layu.



- Letakkan botol di atas wadah plastik dan bawa sumber eksplan ke dalam laboratorium untuk proses sterilisasi selanjutnya.



BAB 8 STERILISASI EKSPLAN

Pendahuluan

Eksplan adalah bagian tanaman yang akan dikulturkan. Bahannya dapat berupa organ, jaringan, maupun sel. Eksplan dari organ, seperti daun, batang, akar lebih mudah dikulturkan. Penggunaan eksplan yang berasal dari tanaman dewasa relatif lebih sulit dan hasilnya masih belum sebaik jika menggunakan eksplan yang berasal dari tanaman muda. Salah satu penyebabnya adalah karena sulitnya mensterilkan permukaan organ tanaman dewasa yang sudah terlalu lama berada di tempat terbuka dan berkontak langsung dengan mikroorganisme di udara luar.

Pada prinsipnya, sterilisasi eksplan adalah mensterilkan eksplan dari kontaminasi mikroorganisme, tanpa mematikan eksplannya. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan berbagai metode yang memanfaatkan berbagai agen sterilan seperti NaOCl, HgCl₂, H₂SO₄ pekat, dan alkohol (Gantait *et al.* 2018). Semua metode sterilisasi perlu dioptimalkan prosesnya agar mendapatkan eksplan yang bebas dari kontaminan.

Lokasi penanaman, kondisi tanaman, dan jenis tanaman yang berbeda akan memerlukan agen sterilan yang berbeda. Sebagai contoh, pada penelitian untuk perbanyak *Acacia mangium* secara *in vitro* sudah dilakukan oleh beberapa peneliti antara lain Gantait *et al.* (2018) serta Chauhan dan Jha (2018). Pada teknik sterilisasi yang dikembangkan oleh Chauhan dan Jha (2018), sterilisasi eksplan tunas *A. mangium* dilakukan dengan merendam eksplan di dalam larutan 10% Tween 20, yang kemudian diikuti dengan perendaman eksplan di dalam alkohol absolut selama 1 menit, dan diakhiri dengan perendaman eksplan di dalam HgCl₂ 0,1% selama 6 menit. Pada teknik lain yang dilakukan oleh Ismail *et al.* (2016), sterilisasi nodul akar *A. mangium* dilakukan dengan menggunakan NaOCl 5,25% selama 4 menit dan dilanjutkan dengan perendaman nodul akar di dalam alkohol 95% selama 3 menit. Girijashankar (2011) berhasil melakukan sterilisasi eksplan *Acacia auriculiformis* dengan perendaman eksplan di dalam alkohol 70% selama 1 menit dan dilanjutkan dengan perendaman eksplan di dalam NaOCl 1% selama 15 menit. Berbagai macam teknik sterilisasi perlu mempertimbangkan kondisi lingkungan dari tempat asal eksplan dan efek dari teknik sterilisasi terhadap lingkungan. Contoh teknik sterilisasi di atas menunjukkan perlu adanya optimasi teknik sterilisasi pada eksplan yang ada.

Eksplan dari lapangan yang sudah memenuhi kriteria pemilihan eksplan, perlu disterilisasi untuk dapat dikulturkan secara *in vitro*, yaitu dengan sterilisasi secara fisika dan kimia. Tujuan proses sterilisasi adalah untuk mengeliminasi kontaminan yang hidup pada eksplan. Beberapa cara sterilisasi eksplan antara lain:

1. Sterilisasi secara fisika memanfaatkan suhu panas untuk membunuh mikroorganisme kontaminan pada permukaan eksplan. Suhu tinggi cukup efektif untuk membunuh

kontaminan, tetapi bagian tanaman yang terkena suhu tinggi akan mati. Oleh karena itu, perlu dipersiapkan eksplan yang berukuran lebih besar daripada yang diperlukan, agar eksplan hasil sterilisasi dan siap dikulturkan tersebut berukuran tidak terlalu kecil. Contohnya adalah sterilisasi menggunakan metode pembakaran eksplan di atas lampu Bunsen yang menyala hingga eksplan cukup *browning* (berwarna kecokelatan). Selanjutnya bagian eksplan yang *browning* tersebut dibuang dan bagian eksplan selebihnya digunakan untuk kegiatan kultur jaringan. Eksplan yang menggunakan metode sterilisasi fisika biasanya adalah eksplan yang sifatnya keras dan berdaging, seperti salak, tebu, wortel, dan lain sebagainya.

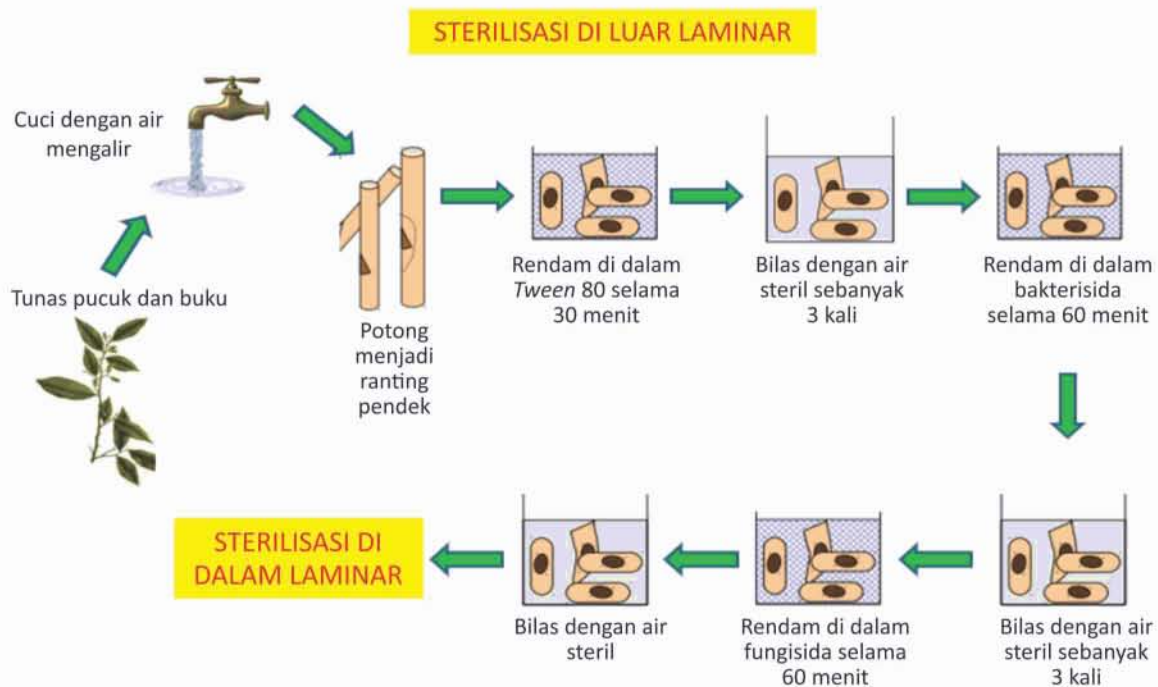
2. Sterilisasi secara kimia pada umumnya menggunakan eksplan yang lunak (jaringan muda) seperti daun, tangkai daun, dan anther. Bahan kimia yang digunakan untuk sterilisasi kimia adalah:
 1. NaOCl yang digunakan untuk melarutkan lipid dan protein pada membran sel bakteri dengan menciptakan pori-pori membran yang menyebabkan terjadinya lisis sel (Sumarna 2015). Eksplan direndam di dalam larutan NaOCl untuk membunuh bakteri endofit dengan cara merusak membran sel, mencegah pembentukan koloni bakteri, membersihkan mikroorganisme, dan membersihkan kotoran seperti debu dan tanah yang terbawa di dalam tunas.
 2. HgCl₂ (merkuri diklorit) yang digunakan untuk sterilisasi tanaman. Namun HgCl₂ bersifat toksik. Cara penggunaannya sama seperti menggunakan zat pemutih, namun dengan waktu sterilisasi yang lebih singkat karena waktu perendaman yang terlalu lama akan menyebabkan eksplan mati.
 3. Alkohol 70% juga merupakan salah satu agen sterilan karena fungi dapat mati pada alkohol 70%. Alkohol membunuh kontaminan dengan cara merusak struktur proteinnya. Bahan sterilisasi lain yang dapat digunakan adalah Povidone iodine 10% dengan waktu perendaman berkisar 15-30 menit.
 4. Selain NaOCl, HgCl₂ dan alkohol, surfaktan juga sering digunakan sebagai agen sterilan yaitu dalam bentuk larutan *Tween* yang berfungsi untuk meningkatkan efektivitas sterilisasi dengan cara meningkatkan daya serap disinfektan di seluruh permukaan eksplan (Kekuda 2016).

Efektivitas penggunaan disinfektan dipengaruhi oleh lama perendaman dan konsentrasi disinfektan. Semakin tinggi konsentrasi disinfektan dan lama perendaman, semakin tinggi efektivitas penghilangan mikroorganisme pada eksplan, tetapi semakin tinggi pula kerusakan jaringan eksplan. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi sterilisasi eksplan agar didapatkan eksplan yang steril dan dapat tumbuh stabil.

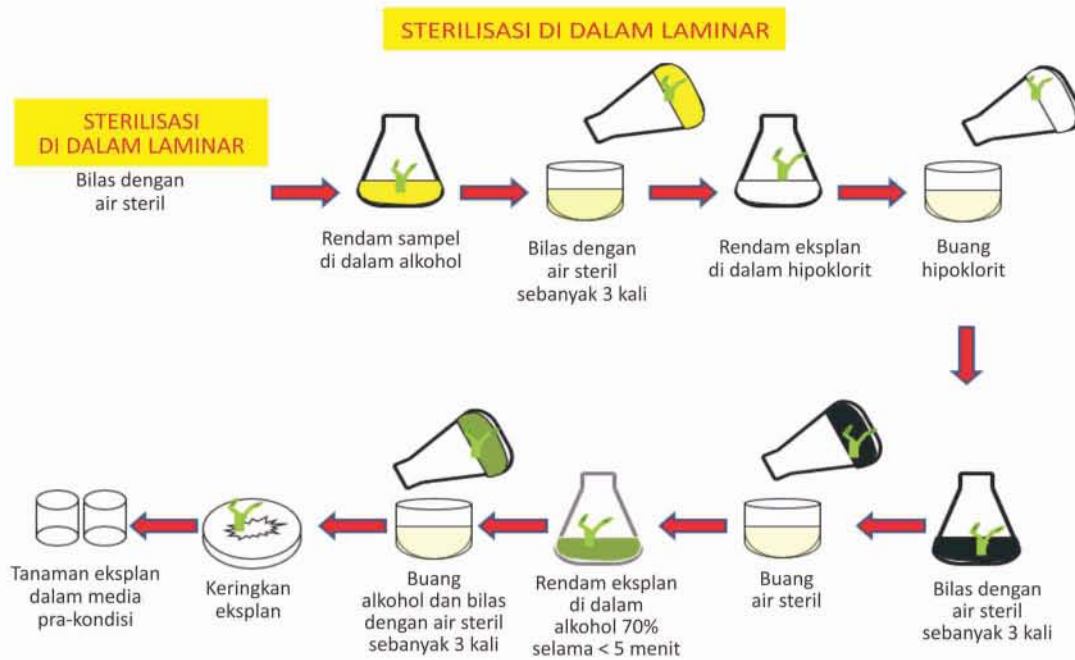
Sterilisasi diperkuat juga dengan perlakuan perendaman di dalam larutan fungisida dan bakterisida. Bakterisida dan fungisida dapat membunuh kontaminan dengan reaksi kimia sehingga relatif aman untuk sel tanaman. Namun, konsentrasi bakterisida dan fungisida yang terlalu tinggi dapat merusak sel tanaman. Dengan demikian dibutuhkan konsentrasi optimum dari bakterisida dan fungisida, sehingga diperoleh eksplan berkualitas tinggi yang steril.

Konsentrasi dan waktu perendaman yang optimum dari disinfektan, bakterisida dan fungisida dapat diketahui setelah melakukan beberapa kali percobaan berdasarkan referensi dari literatur. Biasanya konsentrasi disinfektan, bakterisida dan fungisida diawali dengan konsentrasi rendah dan berlanjut ke konsentrasi yang lebih tinggi atau berdasarkan rentang kisaran dari literatur dan memodifikasinya untuk mendapatkan hasil sterilisasi yang optimal. Peningkatan konsentrasi dan waktu perendaman ini bertujuan untuk meningkatkan efektivitas agen sterilan dalam membunuh kontaminan, tanpa merusak atau mematikan eksplan. Penambahan antibiotik dalam sterilisasi eksplan berfungsi untuk mengobati luka pada saat pemotongan eksplan dari tanaman induknya.

Secara garis besar tahap sterilisasi eksplan dilakukan di luar laminar (Gambar 9) dan di dalam laminar (Gambar 10).



Gambar 9 Alur kerja sterilisasi eksplan di luar laminar



Gambar 10 Alur kerja sterilisasi eksplan di dalam laminar

Prosedur sterilisasi eksplan dipengaruhi oleh:

1. Tipe eksplan

Prosedur sterilisasi eksplan tunas akan berbeda dengan eksplan daun, akar, batang, biji, anther atau kepala sari. Morfologi permukaan eksplan juga menentukan prosedur sterilisasi yang harus dilakukan. Misalnya, tahap sterilisasi dan agen sterilan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan tunas dengan permukaan halus berbeda dengan tahap dan agen sterilan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan tunas yang berbulu.

2. Ukuran eksplan

Prosedur sterilisasi eksplan berukuran besar berbeda dengan prosedur sterilisasi eksplan berukuran kecil, walaupun berasal dari jenis tanaman yang sama.

3. Kondisi eksplan

Banyak sedikitnya mikroorganisme pada eksplan menentukan keberhasilan sterilisasi eksplan, sehingga prosedur sterilisasi akan berbeda. Sterilisasi juga dipengaruhi oleh penyakit, waktu dan tempat pengambilan eksplan. Selain itu prosedur sterilisasi eksplan yang berasal dari organ tanaman yang berada di dalam tanah akan berbeda dengan prosedur sterilisasi eksplan yang berasal dari organ tanaman yang berada di atas permukaan tanah.

4. Kualitas disinfektan

Semakin bagus kualitas disinfektan maka semakin efektif sterilisasi.

Setiap bahan eksplan tanaman mempunyai tingkat kontaminasi permukaan yang berbeda. Dengan demikian, prosedur sterilisasi tidaklah baku untuk bisa diterapkan pada semua bahan eksplan. Kondisi eksplan harus diperbaiki jika eksplan memiliki tingkat kontaminasi tinggi. Hal yang perlu dilakukan untuk mengurangi kontaminasi fungi yang tinggi adalah meningkatkan konsentrasi disinfektan. Pada tingkat kontaminasi bakteri yang tinggi maka perlu meningkatkan waktu perendaman disinfektan.

Eksplan yang berasal dari lapangan akan dikotori oleh debu, kotoran-kotoran maupun berbagai kontaminan lainnya, seperti fungi dan bakteri yang harus dihilangkan. Ketepatan dalam menggunakan metode sterilisasi, agen sterilan dan waktu sterilisasi yang digunakan sangat menentukan keberhasilan proses sterilisasi. Konsentrasi disinfektan dan lamanya waktu sterilisasi eksplan tergantung pada:

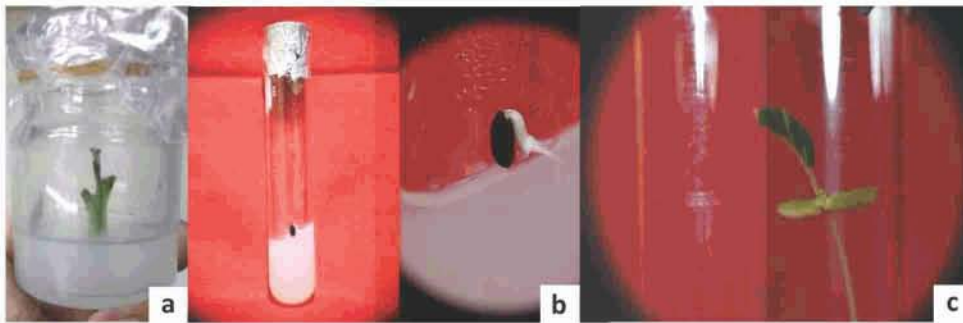
1. Jenis tanaman
2. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan
3. Morfologi permukaan seperti berbulu atau tidak berbulu
4. Lingkungan tumbuhnya seperti di dalam *greenhouse* (rumah kaca) atau lapangan
5. Musim pada saat mengambil sumber eksplan, misalnya pada musim hujan atau kemarau
6. Umur tanaman

Umur tanaman menentukan kondisi fisiologis tanaman. Umur fisiologis atau fase pertumbuhan tanaman sangat berpengaruh terhadap respons pertumbuhan *in vitro*. Pada prinsipnya, jaringan meristematik dan jaringan yang masih mampu didiferensiasi memiliki respons pertumbuhan *in vitro* yang lebih baik dibandingkan dengan jaringan yang sudah dewasa. Ujung tunas dan bagian nodus umumnya menghasilkan regenerasi tunas aksilar dan akar yang lebih cepat. Tanaman yang sedang dalam masa dorman sebaiknya tidak digunakan sebagai eksplan, kecuali sudah mencapai masa pemecahan dormansi. Tanaman hutan fase juvenil merupakan fase yang dianjurkan untuk digunakan sebagai sumber eksplan.

7. Kondisi tanaman

Tanaman yang akan digunakan untuk eksplan sebaiknya tanaman yang sehat pada saat pengambilan.

Pada eksplan yang bebas dari kontaminasi tidak akan ditemukan miselium fungi maupun bakteri. Eksplan dapat tumbuh dan berkembang ketika tidak ada kontaminasi (Gambar 11). Faktor yang mendukung terjadinya kontaminasi dapat berupa agen sterilan yang kurang meresap ke dalam eksplan, sehingga masih terdapat mikroorganisme penyebab kontaminasi. Selain itu, faktor lingkungan kerja yang kurang steril juga dapat menyebabkan kontaminasi eksplan.



Gambar 11 Contoh hasil sterilisasi eksplan *A. mangium* yang bebas kontaminasi: (a) tunas; (b) biji; dan (c) eksplan yang sudah berdaun

Pada teknik sterilisasi terdapat beberapa kisaran konsentrasi dan lama perendaman (Tabel 8). Pada umumnya agen sterilan bersifat racun terhadap jaringan tanaman. Oleh sebab itu, setelah eksplan direndam di dalam agen sterilan, perlu dilakukan pembilasan minimal 3 kali dengan *aquadest* steril. Setiap pembilasan dilakukan selama ± 10 menit untuk memastikan hilangnya sisa-sisa agen sterilan yang masih menempel di permukaan eksplan. Di dalam sterilisasi, seringkali digunakan dua atau lebih agen sterilan.

Tabel 8 Kisaran konsentrasi agen sterilan dan lama waktu perendaman di dalam proses sterilisasi

No	Agen sterilan	Konsentrasi	Lama perendaman
1.	Kalsium hipoklorit	1 - 10%	5 - 30 menit
2.	Natrium hipoklorit	1 - 2%	7 - 15 menit
3.	Hidrogen peroksida	3 - 10%	5 - 15 menit
4.	Gas klorin	-	1 - 4 jam
5.	Perak nitrat	1%	5 - 30 menit
6.	Merkuri klorit	0,1 - 0,2%	10 - 20 menit
7.	Povidone iodine	2,5 - 10 %	5 - 10 menit
8.	Fungisida	2 g/L	30 menit - 1 jam
9.	Bakterisida	2 g/L	30 menit - 1 jam
10.	Antibiotik	50 - 100 mg/L	0,5 menit - 1 jam
11.	Alkohol	70%	0,5 - 5 menit

Sumber: Gunawan (1995)

Setiap laboratorium sebaiknya melakukan optimasi prosedur sterilisasi terlebih dahulu untuk mengembangkan cara yang paling efektif untuk mensterilkan eksplan dari berbagai morfologi dan jenis tanaman dari berbagai lokasi sumber pengambilan eksplan. Modifikasi prosedur sterilisasi yang dapat dilakukan antara lain:

1. Sodium hipoklorit (NaOCl) - pembilasan dengan *aquadest* steril - sodium hipoklorit - pembilasan dengan *aquadest* steril.
2. Alkohol - pembilasan dengan *aquadest* steril - sodium hipoklorit - pembilasan dengan *aquadest* steril.
3. Merkuri klorida (HgCl₂) - pembilasan dengan *aquadest* steril.
4. AgNO₃ - pembilasan dengan *aquadest* steril.
5. Antibiotik - sodium hipoklorit - pembilasan dengan *aquadest* steril.
6. Fungisida/bakterisida - pembilasan dengan *aquadest* steril - sodium hipoklorit - pembilasan dengan *aquadest* steril.
7. Fungisida/bakterisida/antibiotik - alkohol - pembilasan dengan *aquadest* steril - sodium hipoklorit - pembilasan dengan *aquadest* steril.
8. Alkohol - pembilasan dengan *aquadest* steril - sodium hipoklorit - pembilasan dengan *aquadest* steril - alkohol - pembilasan dengan *aquadest* steril.
9. Alkohol - pembilasan dengan *aquadest* steril - sodium hipoklorit - pembilasan dengan *aquadest* steril - povidone iodine - pembilasan dengan *aquadest* steril.

Keberhasilan sterilisasi permukaan eksplan biasanya dapat diketahui dalam kurun waktu 3 - 7 hari setelah kultur ditanam pada media pra-kondisi. Kontaminasi yang terjadi di dalam kurun waktu 3 - 7 hari setelah kultur menunjukkan adanya kesalahan teknis. Kontaminasi yang muncul di sekitar 10 hari setelah kultur menunjukkan adanya kontaminan internal atau semut yang menyebarkan kontaminan secara cepat melalui ruangan kultur. Sumber, asal atau penyebab kontaminasi juga dapat diduga dari letak munculnya atau terjadinya kontaminasi pada sistem kultur. Jika fungi atau bakteri muncul pada bagian jaringan, maka mungkin proses sterilisasi tidak optimal. Namun, jika kontaminan muncul pada medium nutrisi maka hal ini dapat disebabkan oleh kondisi penyimpanan medium yang kurang baik atau tahap pengerjaan kultur kurang steril di dalam LAF.

Berdasarkan pengalaman penulis, kontaminasi dapat terjadi karena:

- a. Rak kultur dan lingkungan laboratorium yang tidak bersih dan teknik aseptik yang kurang baik.
- b. Proses sterilisasi eksplan yang tidak sesuai prosedur.
- c. Kontaminasi sistemik yang terjadi akibat keberadaan bakteri di dalam bahan indukan eksplan.

Bakteri yang terdapat di dalam indukan eksplan adalah bakteri endogen, yang sulit dihilangkan dengan prosedur sterilisasi permukaan. Untuk dapat memberantas semua bakteri di dalam bahan indukan eksplan, maka diperlukan antibiotik. Mengingat beragamnya karakter bakteri yang mengkontaminasi bahan indukan eksplan, maka diperlukan kombinasi dari beberapa jenis antibiotik untuk membunuh semua spektrum bakteri.

Beberapa mikroorganisme yang biasa mengkontaminasi indukan eksplan adalah bakteri gram positif, bakteri gram negatif dan fungi. Kombinasi antibiotik yang biasa digunakan untuk membunuh bakteri yang mengkontaminasi indukan eksplan adalah Streptomycin 50 mg/100 mL, Amoxicillin 50 mg/100 mL, dan Chloramphenicol 50 mg/100 mL. Pemberian kombinasi antibiotik dilakukan dengan cara penyemprotan, penyiraman pada pangkal batang, serta penyemprotan pada mata tunas, secara kontinu selama 3 bulan. Setelah 3 bulan perlakuan dengan kombinasi antibiotik, maka indukan eksplan ditanam di media tumbuh yang steril dan diletakkan di lokasi yang terlindung dari lingkungan luar.

Penanganan indukan eksplan perlu dilakukan secara hati-hati karena bakteri mudah berpindah melalui proses subkultur. Selain itu, penggunaan antibiotik agar dilakukan dengan hati-hati dan tepat guna, karena antibiotik dapat menurunkan kemampuan pertumbuhan eksplan yang sedang dikultur, walaupun hanya sementara.

Tujuan

Praktikan dapat melakukan sterilisasi eksplan tanaman dari tunas dan biji.

Alat:

- a. Cawan Petri.
- b. *Scalpel*.
- c. Gunting.
- d. Wadah pembuangan.
- e. Botol kosong steril.
- f. Pinset.
- g. Gelas ukur.
- h. Erlenmeyer.
- i. Lampu Bunsen.

Bahan:

- a. Bakterisida (bahan aktif Streptomycin sulfat 20%).
- b. Fungisida (bahan aktif Benomil 50%).
- c. *Tween* 80.
- d. Hipoklorit/kloroks.
- e. Antibiotik *Chloramphenicol*.
- f. *Aquadest*.
- g. Kertas saring.
- h. Eksplan *A. mangium*.
- i. Media MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi.

Instruksi Latihan Sterilisasi Eksplan Tunas

Prosedur sterilisasi yang dilakukan di luar LAF:

1. Tunas-tunas sebagai sumber eksplan diletakkan di dalam air bersih dan siap dibawa ke laboratorium (a); sumber eksplan yang dipilih (b); eksplan yang telah diambil dicuci dengan air mengalir, untuk menghilangkan debu yang menempel (c). Jika sumber eksplan terlihat sangat kotor, maka dicuci dengan detergen. Eksplan tunas yang berukuran besar dan berbulu bisa disikat dengan sikat gigi atau dilap dengan kapas yang sudah disemprot dengan alkohol.



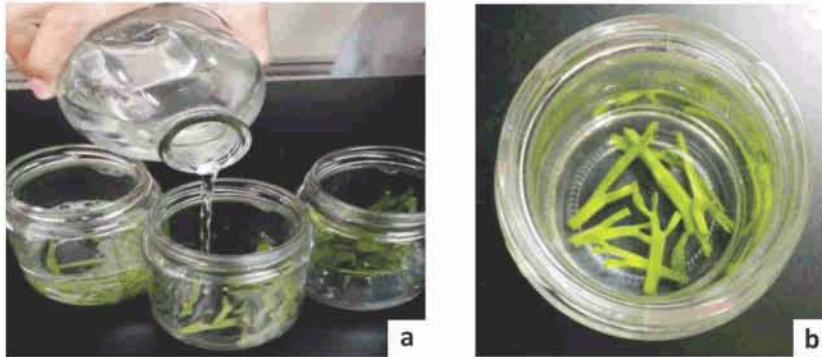
2. Eksplan di gunting untuk memperkecil ukuran eksplan sampai ukuran tertentu, tetapi harus lebih besar dari ukuran eksplan yang direncanakan. Pisahkan daun dari batangnya dengan cara menggunting daunnya.



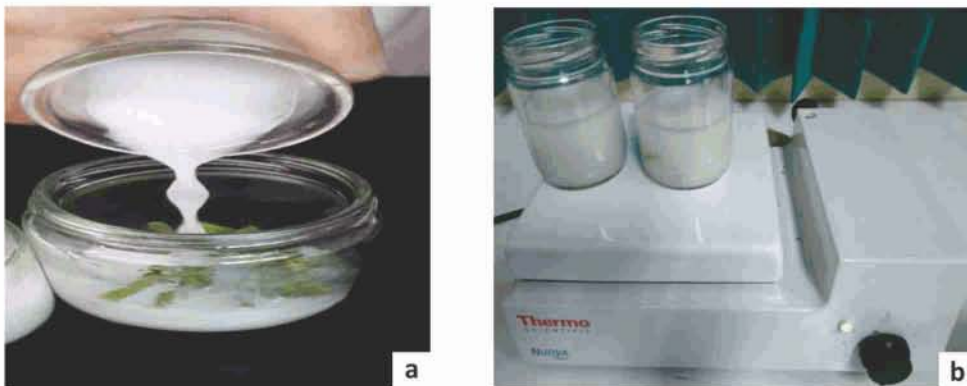
3. Eksplan dimasukkan ke dalam botol yang berisi *aquadest* dan masukkan 2 - 3 tetes *Tween 80* ke dalam botol yang berisi potongan eksplan dan goyang-goyang botol hingga larutan homogen, kemudian diamkan selama ± 30 menit.



4. Bilas tunas dengan (a) *aquadest* hingga (b) busa *Tween* bersih.



5. Tuang masing-masing larutan fungisida (2 g/L) (a) dan bakterisida (2 g/L) (b) ke dalam botol berisi eksplan dan tambahkan 2 - 3 tetes *Tween* 80 untuk setiap 100 mL larutan. Rendam eksplan di dalam masing-masing larutan selama 1 - 2 jam, sambil diaduk perlahan-lahan. Perendaman di dalam bakterisida dan fungisida harus dilakukan sambil dihomogenkan, supaya tidak terjadi pengendapan dan seluruh permukaan eksplan dapat disterilkan secara merata.



Prosedur sterilisasi yang dilakukan di dalam LAF:

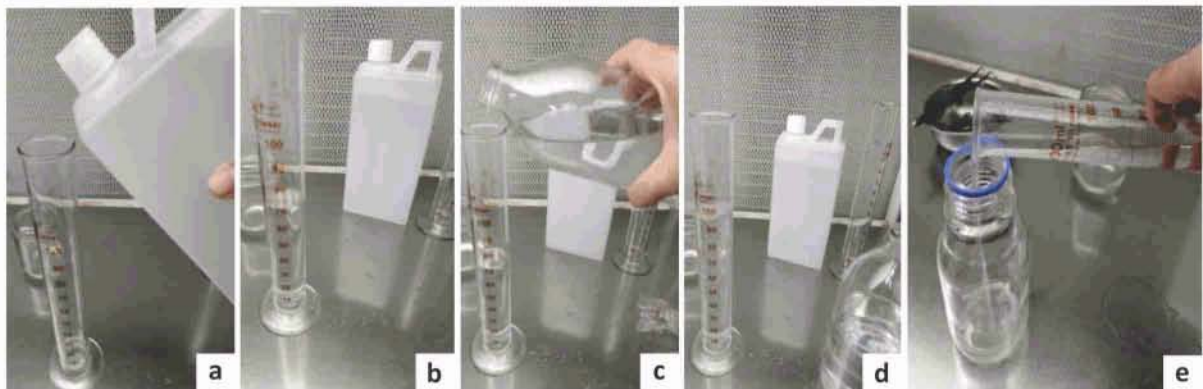
6. Buang larutan fungisida/bakterisida ke dalam wadah penampungan.



7. Bilas eksplan dengan *aquadest* steril sebanyak 3 kali dan pindahkan eksplan ke botol steril yang baru.



8. Persiapkan stok alkohol 70%. Cara membuat alkohol 70% dari larutan stok 96% adalah dengan cara menuangkan alkohol 96% ke dalam gelas ukur sebanyak 73 mL (a); Alkohol yang sudah ditera sebanyak 73 mL (b); kemudian ditambahkan *aquadest* steril sebanyak 27 mL (sampai tera 100 mL) (c); hingga didapatkan stok alkohol 70% dengan volume 100 mL (d). Tuang stok alkohol 70% ke dalam botol Duran dan disimpan sebagai stok (e).



9. Bilas eksplan dengan alkohol 70% selama < 1 menit.



10. Buang alkohol dan bilas kembali dengan *aquadest* steril sebanyak 3 kali.



11. Rendam eksplan di dalam larutan NaOCl (Sodium hypochlorite/cairan pemutih) sesuai perbandingan antara konsentrasi NaOCl dan waktu perendaman sambil digoyang dan usahakan eksplan jangan sampai *browning*. Pembuatan larutan NaOCl 10% (10 mL NaOCl, 90 mL *aquadest*), larutan NaOCl 15% (15 mL NaOCl, 85 mL *aquadest*) dan seterusnya sesuai dengan kebutuhan (a). Penambahan *aquadest* steril (b), masukkan stok NaOCl ke botol Duran dan goyang botol agar larutan homogen antara NaOCl dan *aquadest* (c), tuang NaOCl ke dalam botol yang berisi eksplan (d), tambahkan 2 - 3 tetes larutan *Tween* 80 (e). Konsentrasi dilakukan secara bertingkat dan waktu perendaman disinfektan disesuaikan dengan percobaan yang akan dilakukan. Contoh perlakuan pada Tabel 9.



Tabel 9 Contoh perbandingan agen sterilan dan waktu perendaman pada kultur tunas

Perlakuan	Konsentrasi NaOCl 5,25 (%)	Lama perendaman (menit)
1	10	10
2	10	15
3	15	10
4	15	15

12. Bilas ulang eksplan dengan *aquadest* steril sebanyak 3 kali untuk membersihkan NaOCl.



13. Tuang alkohol 70% ke dalam botol yang berisi eksplan (a) lalu goyangkan botol hingga larutan merata dan menyerap di permukaan eksplan selama ± 3 menit (b). Alternatif lain adalah: tuang Povidone iodine 10% ke dalam eksplan (c) dan biarkan eksplan terendam selama 15 - 30 menit sambil botol digoyangkan dengan tangan (d).



14. Buang larutan alkohol/povidone iodine (a) dan bilas ulang dengan *aquadest* steril sebanyak 5 kali (b).



15. Potong ujung-ujung eksplan yang berubah warna dari hijau (a) dan tanam eksplan ke media pra-kondisi (b).



16. Beri label kultur eksplan yang berisi keterangan tanggal tanam, kode media, bagian yang diambil dan jenis tanaman. Selanjutnya simpan eksplan yang sudah dikultur tersebut di ruangan kultur.



17. Pengamatan terhadap efektivitas metode sterilisasi dilakukan selama 4 Minggu Setelah Tanam (MST) dengan waktu pengamatan setiap minggu. Peubah yang diamati meliputi eksplan terkontaminasi, mati, *browning* dan steril. Setiap peubah dihitung dengan cara sebagai berikut :

$$\text{Persentase eksplan terkontaminasi} = \frac{\Sigma \text{ eksplan terkontaminasi} \times 100\%}{\Sigma \text{ eksplan yang ditanam}}$$

$$\text{Persentase eksplan mati} = \frac{\Sigma \text{ eksplan mati} \times 100\%}{\Sigma \text{ eksplan yang ditanam}}$$

$$\text{Persentase eksplan } \textit{browning} = \frac{\Sigma \text{ eksplan } \textit{browning} \times 100\%}{\Sigma \text{ eksplan yang ditanam}}$$

$$\text{Persentase eksplan steril} = 100\% - (\% \text{ eksplan terkontaminasi} + \% \text{ eksplan mati} + \% \text{ eksplan } \textit{browning})$$

18. Isilah Tabel 10 berdasarkan pengamatan.

Tabel 10 Hasil sterilisasi eksplan dengan berbagai perlakuan konsentrasi disinfektan dan lama perendaman yang berbeda pada 4 MST

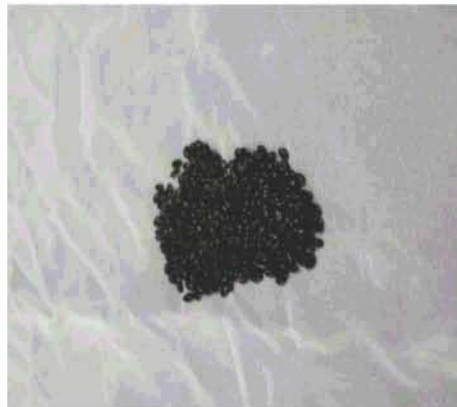
Perlakuan	Jumlah eksplan	Kondisi eksplan (%)					
		Steril	Kontaminasi			Mati	<i>Browning</i>
			Fungi	Bakteri	Fungi+bakteri		
1							
2							
3							
4							
5							
6							

Instruksi Latihan Sterilisasi Eksplan Biji

1. Bersihkan biji *A. mangium* yang akan disterilkan dan pilih biji yang tidak kisut, tidak keriput dan tidak mengambang di dalam air.



2. Letakkan biji di atas kain putih dan ikat yang kencang dengan tali/karet.



3. Siapkan *waterbath* dan atur suhu 90 °C (a). Jika *waterbath* tidak ada, maka gunakan air panas bersuhu 90 °C dan termometer sebagai indikator suhunya (b) .



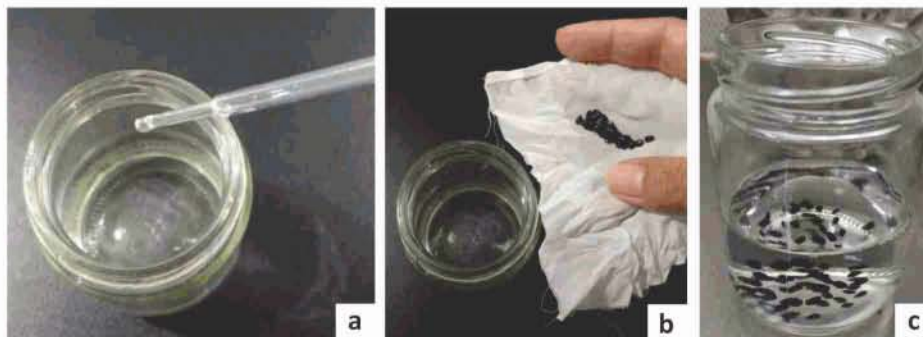
4. Rendam biji di dalam air panas bersuhu 90 °C selama 30 detik untuk mematahkan dormansi biji.



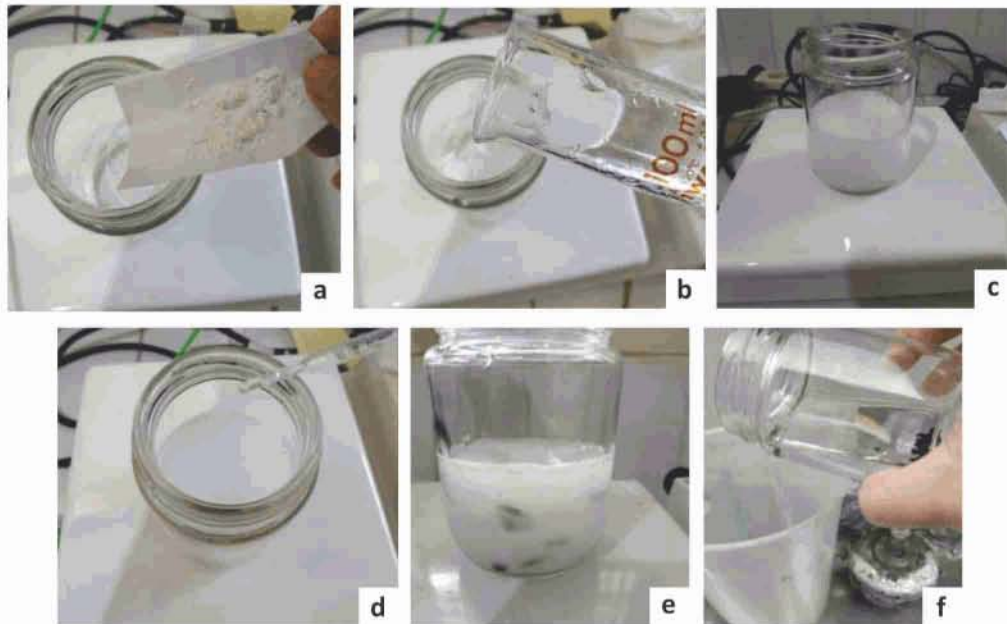
5. Dinginkan biji dengan air bersuhu ruangan dan rendam selama 24 jam di dalam air tersebut.



6. Kemudian beri 2 - 3 tetes larutan *Tween* 80 pada botol yang berisi 100 mL *aquadest* (a). Masukkan biji ke dalam botol yang berisi *aquadest* dan *Tween* 80 (b), rendam biji selama 30 menit (c).



- Perendaman biji di dalam larutan fungisida dimulai dengan pembuatan larutan fungisida. Untuk membuat larutan fungisida, timbang bubuk fungisida sebanyak 0,2 g dan masukkan ke dalam botol kosong (a). Tambahkan *aquadest* steril sebanyak 100 mL (b). Aduk larutan fungisida dengan menggunakan *magnetic stirrer bar* dan *stirrer* hingga homogen (c). Masukkan 2 - 3 tetes *Tween* 80 ke dalam larutan fungisida tersebut (d). Jadilah larutan fungisida. Selanjutnya, rendam eksplan biji di dalam larutan fungisida selama 1 jam (e), lalu bilas dengan *aquadest* minimal sebanyak 3 kali (f).



- Perendaman selanjutnya dilakukan dengan menggunakan bakterisida 0,2 g/100 mL (point 9) atau antibiotik 80 mg/100 mL (point 10).
- Jika perendaman eksplan biji dilakukan di dalam larutan bakterisida, maka perendaman tersebut dimulai dengan menimbang bubuk bakterisida sebanyak 0,2 g dan masukkan ke dalam botol yang sudah berisi *aquadest* steril sebanyak 100 mL. Aduk larutan bakterisida dengan menggunakan *magnetic stirrer bar* dan *stirrer* hingga homogen. Tambahkan 2 - 3 tetes *Tween* 80 ke dalam larutan bakterisida tersebut, sehingga menyatu dengan larutan bakterisida. Selanjutnya, rendam eksplan biji di dalam larutan bakterisida selama 1 jam.
- Jika perendaman eksplan biji dilakukan di dalam larutan antibiotik, maka dimulai dengan pembuatan larutan antibiotik. Untuk membuat larutan antibiotik, timbang bubuk antibiotik sebanyak 80 mg dan masukkan ke dalam botol kosong. Tambahkan *aquadest* steril sebanyak 100 mL. Aduk larutan antibiotik dengan menggunakan *magnetic stirrer bar* dan *stirrer* hingga homogen. Masukkan 2 - 3 tetes *Tween* 80 ke dalam larutan antibiotik tersebut. Jadilah larutan antibiotik. Selanjutnya, rendam eksplan biji di dalam larutan antibiotik selama 1 jam.

11. Di dalam LAF, buang larutan bakterisida atau antibiotik yang digunakan untuk merendam tadi dan bilas eksplan biji dengan *aquadest* steril minimal sebanyak 3 kali.



12. Selanjutnya, masih di dalam LAF, rendam eksplan biji dengan disinfektan berupa larutan hipoklorit berkonsentrasi 15% selama 10 menit dan tambahkan 2 - 3 tetes *Tween* 80. Larutan hipoklorit 15% dibuat dengan mencampurkan 15 mL hipoklorit dengan 85 mL *aquadest* steril.



13. Bilas dengan *aquadest* steril minimal sebanyak 3 kali.



14. Tuang alkohol 70% ke dalam botol yang berisi eksplan, lalu goyang-goyangkan botol hingga larutan merata dan menyerap di permukaan eksplan selama 1 menit.



15. Bilas eksplan dengan *aquadest* steril sebanyak 5 kali hingga bebas alkohol. Eksplan harus terbebas dari alkohol karena alkohol dapat menyebabkan *browning* pada eksplan.



16. Kulturkan eksplan biji di dalam media *in vitro*.



17. Inkubasi biji dilakukan di ruangan gelap, jika bertujuan untuk perkecambahan. Namun jika tujuannya adalah untuk menginduksi pertumbuhan eksplan *in vitro*, maka inkubasi dilakukan di ruangan kultur seperti biasa.



18. Hasil pertumbuhan biji di media kultur *in vitro*.

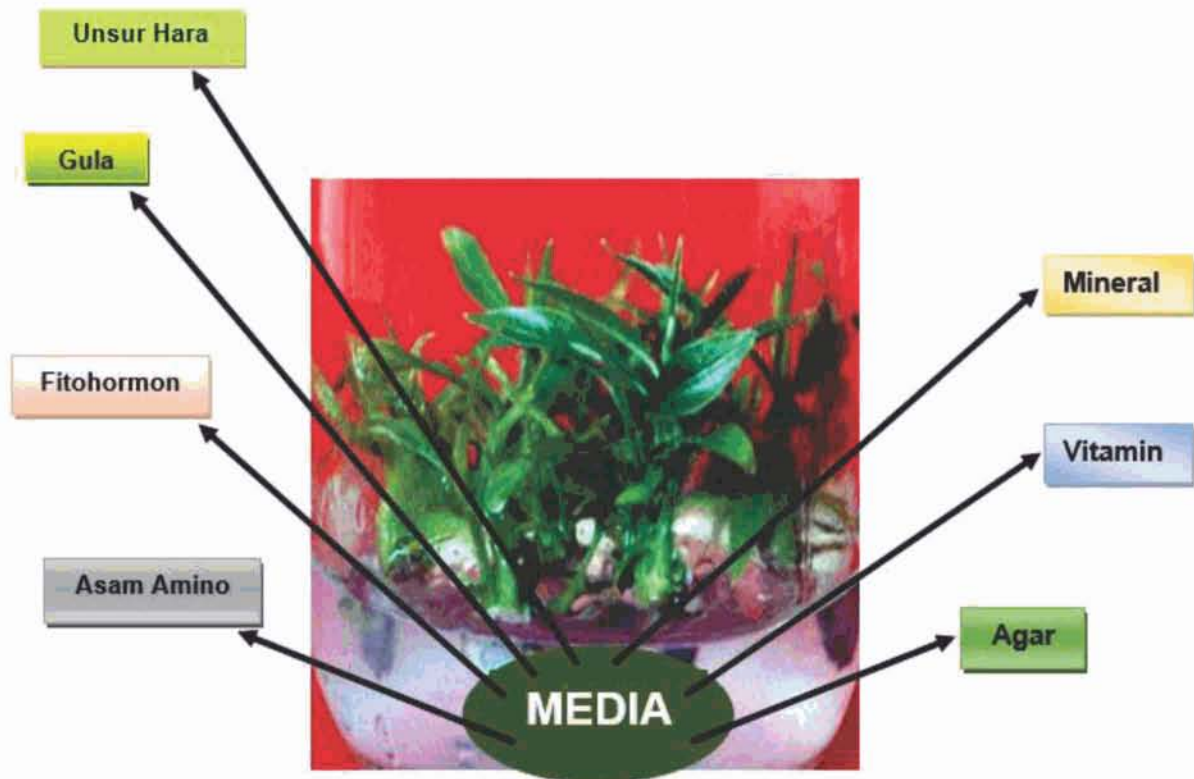


Catatan:

BAB 9 PREPARASI PEMBUATAN LARUTAN STOK DAN MEDIA KULTUR JARINGAN

Pendahuluan

Pada teknologi kultur jaringan, tanaman ditumbuhkan pada media tumbuh buatan dan bukan tanah. Oleh karena itu, semua zat yang diperlukan untuk pertumbuhan tanaman harus terdapat di dalam media tumbuh, sesuai dengan kebutuhan tanaman untuk bertumbuh, yaitu unsur hara, gula, fitohormon, asam amino, mineral dan vitamin (Gambar 12).



Gambar 12 Media kultur jaringan yang dibutuhkan oleh eksplan

Kebutuhan unsur hara untuk tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* pada dasarnya sama dengan kebutuhan unsur hara tanaman yang ditumbuhkan di tanah, yaitu unsur hara makro dan unsur hara mikro. Unsur hara makro adalah unsur yang dibutuhkan oleh tanaman dalam konsentrasi yang relatif besar ($>0,5$ mM/L) sehingga tanaman dapat berkembang dengan baik. Unsur hara makro meliputi:

1. Nitrogen (N)

Nitrogen sangat berperan dalam pembentukan sel tanaman, jaringan, dan organ tanaman dan fungsi utamanya sebagai bahan sintesis klorofil, protein, dan asam amino. Oleh karena itu, unsur N diperlukan dalam jumlah yang cukup besar, terutama pada saat pertumbuhan memasuki fase vegetatif. Nitrogen ini digunakan untuk mengatur pertumbuhan tanaman secara keseluruhan. Terdapat 2 bentuk Nitrogen, yaitu Ammonium (NH_4) dan Nitrat (NO_3). Berdasarkan sejumlah penelitian para ahli, kandungan ammonium sebaiknya tidak lebih dari 25% dari total konsentrasi nitrogen. Jika berlebihan, karakter tanaman menjadi besar tetapi rentan terhadap serangan penyakit. Nitrogen yang berasal dari ammonium akan memperlambat pertumbuhan karena mengikat karbohidrat sehingga pasokan karbohidrat menjadi sedikit. Namun jika yang dominan adalah nitrogen dalam bentuk nitrat, maka sel-sel tanaman akan kompak dan kuat sehingga lebih tahan penyakit.

2. Fosfor atau Phosphor (P)

Unsur Fosfor merupakan komponen penyusun dari beberapa enzim, protein, ATP, RNA, dan DNA. ATP penting untuk proses transfer energi, sedangkan RNA dan DNA menentukan sifat genetik dari tanaman. Pengaruh Fosfor terhadap akar adalah memperbaiki struktur perakaran sehingga daya serap tanaman terhadap nutrisi menjadi lebih baik.

3. Kalium (K)

Unsur Kalium berperan sebagai pengatur proses fisiologi tanaman seperti fotosintesis, akumulasi, translokasi, transportasi karbohidrat, membuka dan menutupnya stomata, atau mengatur distribusi air dalam jaringan dan sel. Unsur Kalium berhubungan erat dengan Kalsium dan Magnesium. Ada sifat antagonisme antara Kalium dan Kalsium dan juga antara Kalium dan Magnesium. Sifat antagonisme ini menyebabkan kekalahan salah satu unsur untuk diserap tanaman jika komposisinya tidak seimbang. Unsur Kalium diserap lebih cepat oleh tanaman dibandingkan unsur Kalsium dan Magnesium. Jika unsur Kalium berlebih, maka gejalanya sama dengan kekurangan Magnesium. Sebab, sifat antagonisme antara Kalium dan Magnesium lebih besar daripada sifat antagonisme antara Kalium dan Kalsium. Kendati demikian, pada beberapa kasus, kelebihan Kalium gejalanya mirip tanaman kekurangan Kalsium. Kelebihan K menyebabkan penyerapan Ca dan Mg terganggu. Pertumbuhan tanaman terhambat, sehingga tanaman mengalami defisiensi.

4. Magnesium (Mg)

Unsur Magnesium adalah aktivator yang berperan penting dalam transportasi energi beberapa enzim di dalam tanaman. Unsur ini sangat dominan keberadaannya di daun, terutama untuk ketersediaan klorofil. Jadi kecukupan Magnesium sangat diperlukan untuk memperlancar proses fotosintesis. Unsur ini juga merupakan komponen inti pembentukan klorofil dan enzim di berbagai proses sintesis protein. Kekurangan Magnesium

menyebabkan sejumlah unsur tidak terangkut karena energi yang tersedia sedikit. Sedangkan unsur yang terbawa hanyalah unsur berbobot 'ringan' seperti Nitrogen. Akibatnya terbentuk sel-sel berukuran besar tetapi encer. Jaringan menjadi lemah dan jarak antar ruas menjadi panjang. Ciri-ciri ini persis sama dengan gejala etiolasi, yaitu kekurangan cahaya pada tanaman.

5. Kalsium (Ca)

Unsur Kalsium berperan dalam pertumbuhan sel dan merupakan komponen yang menguatkan, mengatur daya tembus ke membran sel melalui pengaturan metabolisme sel, merawat dinding sel, proses pembelahan dan perpanjangan sel, dan mengatur distribusi hasil fotosintesis. Perannya juga sangat penting pada titik tumbuh akar. Bahkan jika terjadi defisiensi Ca, pembentukan dan pertumbuhan akar terganggu, dan berakibat penyerapan hara terhambat.

6. Belerang atau Sulfur (S)

Pada umumnya Sulfur (belerang) dibutuhkan oleh tanaman dalam pembentukan asam amino sistin, sistein dan metionin. Di samping itu, Sulfur juga merupakan bagian dari biotin, tiamin, ko-enzim A dan glutathionin. Diperkirakan 90% Sulfur yang ada di dalam tanaman ditemukan dalam bentuk asam amino, yang salah satu fungsi utamanya adalah menyusun protein dalam pembentukan ikatan disulfida antara rantai-rantai peptida. Sulfur merupakan bagian (*constituent*) dari hasil metabolisme senyawa-senyawa kompleks. Sulfur juga berfungsi sebagai aktivator, kofaktor atau regulator enzim dan berperan di dalam proses fisiologi tanaman.

Unsur mikro adalah unsur yang diperlukan tanaman dalam jumlah sedikit (<0,05 mM/L). Walaupun hanya diserap dalam jumlah kecil, tetapi unsur mikro amat penting untuk menunjang keberhasilan proses-proses dalam tumbuhan. Unsur mikro meliputi:

1. Boron (B)

Unsur Boron memiliki kaitan erat dengan proses pembentukan, pembelahan dan diferensiasi, serta pembagian tugas sel. Hal ini terkait dengan perannya dalam sintesis RNA, bahan dasar pembentukan sel.

2. Tembaga (Cu)

Fungsi penting unsur tembaga adalah sebagai aktivator dan membawa beberapa enzim serta berperan membantu kelancaran proses fotosintesis, pembentukan klorofil, dan berperan dalam fungsi reproduksi.

3. Seng atau Zinc (Zn)

Unsur Seng sangat berperan sebagai aktivator enzim, pembentukan klorofil dan membantu proses fotosintesis. Kekurangan biasanya terjadi pada media yang sudah lama digunakan.

4. Besi atau Ferro (Fe)

Unsur Besi berperan dalam proses pembentukan protein, sebagai katalisator pembentukan klorofil dan sebagai pembawa elektron pada proses fotosintesis dan respirasi sekaligus menjadi aktivator beberapa enzim. Unsur ini tidak mudah bergerak sehingga bila terjadi kekurangan kandungan unsur Besi, maka sulit diperbaiki. Fe paling sering bertentangan atau antagonis dengan unsur mikro lain. Untuk mengurangi efek itu, maka Fe sering dibungkus dengan Kelat (*chelate*) seperti EDTA (*Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid*). EDTA adalah suatu komponen organik yang bersifat menstabilkan ion metal. Dengan adanya EDTA maka sifat antagonis Fe pada pH tinggi akan jauh berkurang.

5. Molibdenum (Mo)

Unsur Molibdenum berfungsi sebagai pembawa elektron untuk mengubah nitrat menjadi enzim. Unsur ini juga berperan di dalam fiksasi Nitrogen.

6. Mangan (Mn)

Unsur Mangan sangat berperan dalam sintesis klorofil, sebagai koenzim, sebagai aktivator beberapa enzim respirasi dalam reaksi metabolisme nitrogen dan fotosintesis. Mangan juga diperlukan untuk mengaktifkan nitrat reduktase sehingga tumbuhan yang mengalami kekurangan mangan memerlukan sumber Nitrogen dalam bentuk NH_4^+ . Peranan Mangan dalam fotosintesis berkaitan dengan pelepasan elektron dari air dalam pemecahannya menjadi hidrogen dan oksigen. Fungsi unsur hara Mangan (Mn) bagi tanaman adalah:

- a. Untuk membentuk protein dan vitamin, terutama vitamin C.
- b. Berperan penting dalam mempertahankan kondisi hijau daun pada daun yang tua.
- c. Berperan sebagai enzim feroksidase dan sebagai aktivator macam-macam enzim.
- d. Berperan sebagai komponen penting untuk lancarnya proses asimilasi.

7. Cobalt (Co)

Unsur Cobalt berperan dalam fiksasi Nitrogen. Kekurangan Nitrogen dapat mengakibatkan gejala defisiensi, seperti pertumbuhan tanaman berjalan lambat, tanaman kurus dan kerdil, pendek, kecil serta tegak, dan daun berwarna hijau kekuningan.

Unsur-unsur hara makro dan mikro diberikan dalam bentuk garam-garam mineral. Kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan kultur *in vitro* bisa bervariasi sesuai dengan spesies yang dikulturkan. Demikian pula, jaringan dari bagian yang berbeda dari satu tanaman yang sama bisa memiliki kebutuhan berbeda untuk bisa tumbuh.

Media kultur merupakan faktor utama dalam mikropropagasi dengan teknik kultur jaringan. Keberhasilan perbanyakan dan perkembangbiakan tanaman dengan metode kultur jaringan secara umum sangat tergantung pada komposisi media kultur. Pada umumnya komposisi utama media tanam kultur jaringan terdiri dari hormon (zat pengatur tumbuh) dan sejumlah unsur yang biasanya terdapat di dalam tanah yang dikelompokkan ke dalam unsur makronutrien dan unsur mikronutrien.

Sebagai sumber karbon di dalam media, digunakan karbohidrat untuk menggantikan karbon yang normalnya difiksasi oleh tanaman dari atmosfer. Sumber karbohidrat yang paling banyak digunakan di dalam kultur jaringan adalah sukrosa dengan konsentrasi 20 - 60 g/L. Ketika media disterilisasi di dalam autoklaf, maka sukrosa akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Secara alami, tanaman dapat menghasilkan karbohidrat melalui fotosintesis. Namun di dalam kultur *in vitro* tanaman tidak dapat berfotosintesis. Karbohidrat dibutuhkan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan pembelahan sel.

Untuk meningkatkan pertumbuhan, media kultur juga menggunakan senyawa organik tertentu, seperti vitamin dan zat pengatur tumbuh (Trigiano 2011). Vitamin merupakan zat organik yang dibutuhkan untuk proses metabolisme, berfungsi sebagai kofaktor atau enzim. Untuk menghasilkan pertumbuhan optimum maka di dalam media kultur ditambahkan berbagai vitamin seperti *thiamine* (B1), *nicotinic acid* (B3), *pyridoxine* (B6), dan *pantothenic acid* (B5). Konsentrasi vitamin yang biasa digunakan berkisar 0,1 - 5 mg/L.

Penambahan asam amino pada media kultur juga penting untuk merangsang pertumbuhan sel di dalam kultur protoplasma dan untuk menginduksi serta mempertahankan embriogenesis somatik. Nitrogen organik yang tereduksi lebih mudah diambil oleh tanaman dibandingkan dengan nitrogen anorganik. Beberapa asam amino yang digunakan antara lain L-Arginin, L-Phenylalanin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Glutamine, L-Asparagine, L-Cystein, L-Glycine, L-Histidin, Myo Inositol, adenine sulfat, dan casein hidrolisat.

Ada dua bentuk media kultur yang digunakan dalam kultur jaringan, yaitu media kultur padat dan media kultur cair. Bentuk media yang digunakan tergantung pada jaringan atau bagian apa yang ingin ditumbuhkan. Media kultur padat biasanya digunakan untuk mengkultur kalus dan organ (daun atau tunas), sedangkan media kultur cair biasanya digunakan untuk mengkultur rambut akar dan suspensi sel.

Bahan yang digunakan di dalam media kultur padat adalah agar atau *gelrite/phytagel*. Pada umumnya, agar ditambahkan dengan konsentrasi 0,5 - 1% (w/v). *Gelrite* membentuk gel yang lebih jernih daripada agar sehingga memudahkan pengamatan pertumbuhan akar dalam kondisi *in vitro*. *Gelrite* merupakan produk sintesis dan digunakan dengan konsentrasi 1,25 - 2,5 g/L. Kepadatan media meningkat secara linier pada penambahan konsentrasi agar. Konsentrasi agar yang terlalu tinggi dapat mengurangi difusi senyawa dari dan ke arah eksplan, sehingga pengambilan nutrisi hara dan zat tumbuh berkurang. Kepadatan media dipengaruhi oleh jenis agar, pH dan penambahan senyawa tertentu, misalnya arang aktif. pH optimum untuk kultur *in vitro* sebelum disterilisasi adalah 5,7 - 5,8. Jika pH kurang dari 4,5 atau lebih tinggi dari 7,0 maka pertumbuhan dan perkembangan di dalam kultur *in vitro* akan terhambat. pH media kultur biasanya akan turun sekitar 0,3 - 0,5 unit setelah disterilkan dengan autoklaf.

Beberapa keuntungan pemakaian media agar antara lain:

1. Media agar padat memungkinkan eksplan berkontak dengan zat nutrisi yang terdapat di dalam media dengan cara hanya salah satu sisi eksplan yang berkontak dengan media kultur, sedangkan permukaan lain dari eksplan berkontak dengan udara.
2. Media agar membeku pada suhu $<45\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan mencair pada suhu $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Media agar tidak dicerna oleh enzim tanaman.
4. Media agar tidak bereaksi dengan senyawa penyusun media.

Media kultur di dalam kultur jaringan tanaman merupakan salah satu faktor penting yang menunjang pertumbuhan tanaman dan sangat mempengaruhi respons eksplan saat dikulturkan. Formula media kultur yang optimum mampu memicu pertumbuhan yang optimum bagi tumbuhan. Perbedaan komposisi media kultur sangat mempengaruhi arah pertumbuhan dan regenerasi eksplan.

Selama beberapa dekade, beberapa formula media kultur telah dikembangkan untuk menunjang pertumbuhan yang optimum. Beberapa contoh jenis media kultur yaitu MS (Murashige & Skoog), B5, WPM (*Woody Plant Medium*), VW (Vacin & Went), dan DKW (*Driver and Kuniyuki Woody Plant Medium*) (Philip & Garda 2019). Media B5 digunakan untuk mengkultur kalus monokotil dan dikotil. Media VW dan media organik (ekstrak taoge kacang hijau, ekstrak kentang, dan air kelapa muda) digunakan untuk perbanyakan anggrek, sedangkan media WPM (*Woody Plant Medium*) digunakan untuk perbanyakan tanaman berkayu, tanaman perdu atau pohon berkayu.

Formulasi media yang secara umum digunakan untuk berbagai jenis eksplan dan varietas tanaman adalah media MS (Tabel 11). Media MS ini dapat digunakan untuk berbagai tujuan seperti pertumbuhan basal, perkecambahan biji, kultur pucuk, kultur kalus dan regenerasi kalus melalui organogenesis dan embriogenesis.

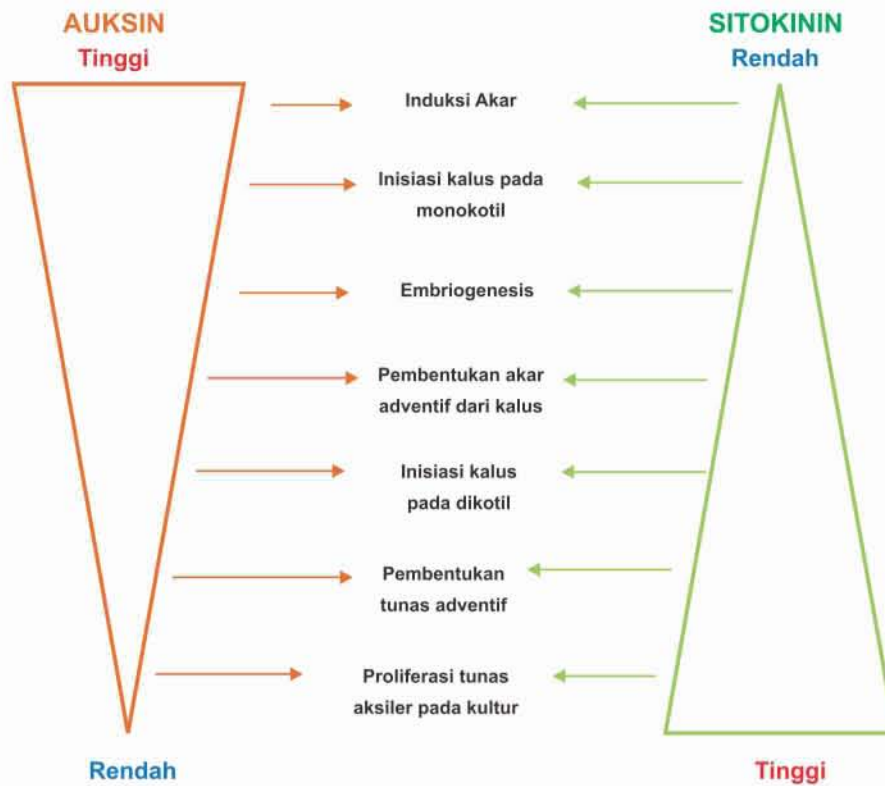
Tabel 11 Komposisi medium dasar MS (Murashige dan Skoog)

Stok	Bahan kimia	Konsentrasi (mg/L)	Larutan Stok		Volume (mL) untuk 1 L media
			(g/L)	Konsentrasi	
A	NH₄NO₃ *	1.650	82,50	50 X	20
B	KNO₃ *	1.900	95,00	50 X	20
C	KH₂PO₄ *	170	17,00	100 X	
	<i>H₃BO₃</i>	6,2	0,62		
	<i>KI</i>	0,83	0,083		10
	<i>Na₂MoO₄.7H₂O</i>	0,25	0,025		
	<i>CoCl₂.6H₂O</i>	0,025	0,0025		
D	CaCl₂.2H₂O *	440	44,00	100 X	10
E	MgSO₄.7H₂O *	370	37,00	100 X	10
	<i>MnSO₄.4H₂O</i>	22,3	2,23		
	<i>ZnSO₄.7H₂O</i>	8,6	0,86		
	<i>CuSO₄.5H₂O</i>	0,025	0,0025		
F	<i>FeSO₄.7H₂O</i>	27,8	2,78	100 X	10
	<i>Na₂EDTA</i>	37,3	3,73		
Myo Inositol		100	Langsung ditimbang saat membuat media		
Vitamin	Niacin	0,5	0,05	100 X	1
	Pyridoxine-HCl	0,5	0,05		
	Thiamine-HCl	0,1	0,01		
	Glycine	2,0	0,20		
Sukrosa		30.000	Langsung ditimbang saat membuat media		

Catatan: Tulisan berhuruf cetak tebal = makronutrien; Tulisan berhuruf cetak miring = mikronutrien; Kode F = unsur besi.

Zat pengatur tumbuh adalah senyawa organik selain nutrisi dalam konsentrasi kecil (1 mM) yang dapat merangsang, menghambat, atau mengubah pola pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Toungos 2018). Zat pengatur tumbuh (ZPT) dalam kultur jaringan diperlukan untuk: 1. mengendalikan dan mengatur pertumbuhan kultur tanaman, 2. mengontrol organogenesis dan morfogenesis dalam pembentukan dan perkembangan tunas, akar, dan pembentukan kalus, serta dalam kultur sel, jaringan, dan organ. Jenis dan konsentrasi ZPT tergantung pada tujuan dan tahap pengkulturan. Jenis dan konsentrasi ZPT untuk setiap tanaman juga berbeda, tergantung pada genotip dan kondisi fisiologi jaringan tanaman.

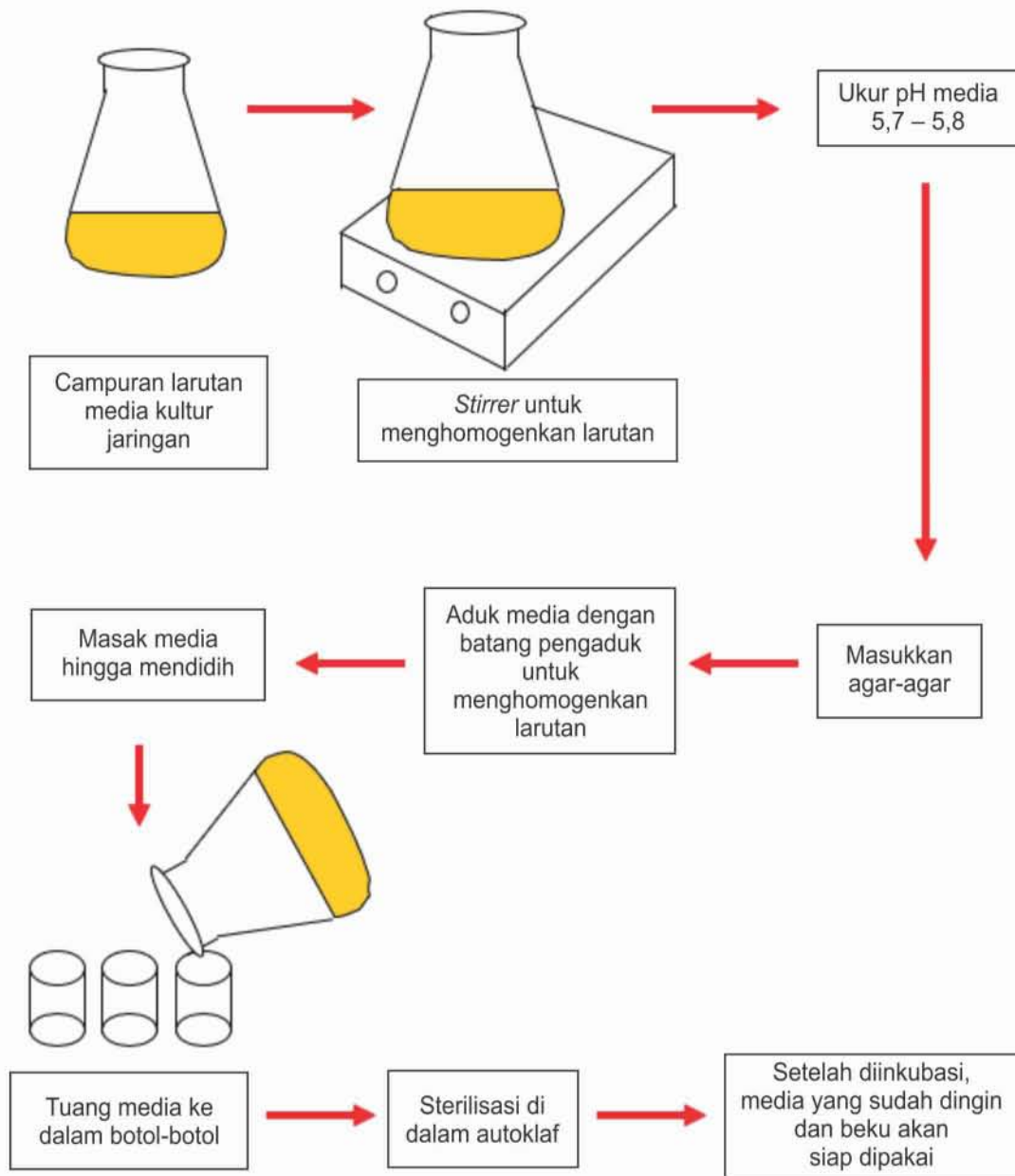
Secara umum, zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam kultur jaringan terbagi dalam tiga kelompok besar, yaitu auksin, sitokinin, giberelin dan *growth retardant*. Interaksi antara konsentrasi sitokinin dan auksin mempengaruhi aspek diferensiasi sel dan organogenesis pada kultur jaringan. George *et al.* (2008) menunjukkan ilustrasi konsentrasi perbandingan sitokinin dan auksin yang mempengaruhi arah perkembangan sel untuk morfogenesis pada kultur jaringan (Gambar 13).



Gambar 13 Konsentrasi relatif antara auksin dan sitokinin yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan morfogenesis tanaman

Keseimbangan antara regulator pertumbuhan auksin dan sitokinin paling sering diperlukan untuk pembentukan tunas adventif dan meristem akar. Konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi auksin akan merangsang pertumbuhan tunas dan daun. Sebaliknya konsentrasi sitokinin yang lebih rendah daripada konsentrasi auksin akan menstimulasi pertumbuhan akar. Jika konsentrasi sitokinin dan auksin berimbang, maka pertumbuhan tunas, daun dan akar akan berimbang pula. Perbandingan konsentrasi sitokinin yang sedang dengan konsentrasi auksin yang lebih rendah akan membentuk kalus. Konsentrasi yang diperlukan oleh masing-masing jenis zat pengatur tumbuh sangat berbeda berdasarkan jenis tanaman, kondisi kultur dan senyawa yang digunakan. Lebih dari satu kombinasi zat pengatur tumbuh cenderung menghasilkan hasil yang optimal.

Sitokinin yang sering digunakan untuk media adalah BAP (*6-benzylaminopurine*), kinetin (*6-furfurylaminopurine*), dan thidiazuron (*N-pheny-N'-1,2,3-thiadiazol-5-phenylurea*). Auksin yang sering digunakan adalah NAA (*1-Naphttalena acetic acid*), IBA (*Indole-3-butyric acid*), dan IAA (*Indole-3-acetic acid*). Skema dasar pembuatan media kultur jaringan (Gambar 14).



Gambar 14 Skema pembuatan media kultur jaringan.

Sebelum mempersiapkan media kultur jaringan, larutan stok nutrisi biasanya dibuat terlebih dahulu. Pembuatan larutan stok nutrisi bertujuan untuk mempermudah pembuatan media kultur dibandingkan dengan jika setiap kali membuat media kultur harus menimbang bahan nutrisi terlebih dahulu. Larutan stok nutrisi mempunyai konsentrasi nutrisi yang lebih tinggi. Larutan stok nutrisi yang biasa dibuat untuk kegiatan kultur jaringan adalah makronutrien, mikronutrien, vitamin, ZPT, dan besi. Dengan adanya larutan stok nutrisi berkonsentrasi tinggi, maka cukup menggunakan larutan stok yang sudah tersedia ketika akan

membuat media kultur. Konsentrasi lebih pekat (konsentrasi tinggi) dari larutan stok sangat diperlukan agar tidak terjadi kesulitan dalam penimbangan dan mengurangi risiko kesalahan dalam penimbangan ketika bahan yang ditimbang hanya diperlukan dalam jumlah yang sangat sedikit. Dengan demikian, pembuatan media menjadi lebih praktis dan tidak menyita waktu penimbangan yang terlalu lama.

Larutan stok dapat dibuat dengan konsentrasi 10 kali hingga 100 kali lipat lebih pekat. Pembuatan media dapat dilakukan dengan cara mengambil sejumlah larutan stok sehingga konsentrasinya sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki dalam formulasi media yang dibuat. Dalam penyimpanannya, larutan stok harus disimpan di lemari es bersuhu rendah (-4 °C) dan gelap untuk mencegah adanya kerusakan media dan pengendapan media. Larutan stok vitamin harus habis digunakan dalam waktu 1 - 2 minggu setelah dibuat. Larutan stok hormon dapat disimpan selama 2 - 4 minggu, sedangkan larutan stok hara dapat disimpan selama 3 - 4 minggu (Harjanto & Rakhmania 2007).

Untuk pertumbuhan yang optimal pada eksplan, maka komposisi media kultur jaringan akan berbeda-beda untuk jenis tanaman yang berbeda. Demikian pula, komposisi media kultur jaringan tersebut akan berbeda untuk setiap tahapan kultur jaringan, dan untuk berbagai tipe eksplan dari jenis tanaman yang sama. Pada umumnya yang berbeda adalah konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) dan tambahan senyawa lainnya. Komposisi media tumbuh dalam kultur *in vitro* sangat diperlukan untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas bibit. Salah satu cara adalah dengan penambahan Myo Inositol dan arang aktif. Komponen organik seperti vitamin, asam-asam amino, dan asam nukleat berfungsi sebagai kofaktor dalam pembentukan enzim, menstimulir proliferasi jaringan, dan memperlancar respirasi serta memperbaiki pertumbuhan dan morfogenesis. Selain penambahan ZPT, media kultur jaringan tanaman anggrek dapat juga ditambahi dengan arang aktif atau karbon yang berfungsi menyerap senyawa racun dalam media atau menyerap senyawa inhibitor yang disekresikan oleh *plantlet*. Arang aktif atau karbon juga dapat menstabilkan pH media, merangsang pertumbuhan akar dengan mengurangi jumlah cahaya yang masuk ke dalam media, dan merangsang morfogenesis. Di samping itu, arang aktif dapat mengurangi terjadinya pencokelatan media akibat pemanasan tinggi selama proses sterilisasi. Senyawa-senyawa hasil oksidasi fenol sangat toksik bagi tanaman dan dapat menghambat pertumbuhan serta proses diferensiasi. Untuk menekan keluarnya senyawa fenol tersebut, media kultur diberi senyawa arang aktif. Selain penambahan zat pengatur tumbuh (dalam bentuk benzyl amino purin/BAP), penambahan asam amino seperti kasein hidrolisat dapat pula dilakukan untuk merangsang pertumbuhan eksplan atau meningkatkan jumlah tunas. Tindakan menginokulasi eksplan pisang dengan rizobakteri secara *in vitro* menunjukkan bahwa *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) mampu meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan *plantlet*, di antaranya pada tanaman kentang.

Sterilisasi awal eksplan dilakukan hanya dengan menggunakan media pra-kondisi. Penggunaan media pra-kondisi di dalam kegiatan kultur jaringan mempunyai tujuan sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui apakah sterilisasi eksplan yang dilakukan telah mencapai tahap steril.
2. Untuk mengefisienkan penggunaan bahan seperti vitamin, hormon dan lain-lain.
3. Untuk melihat apakah eksplan memiliki daya tumbuh dan berkembang lebih lanjut.

Setelah eksplan berada di dalam media pra-kondisi selama ± 7 hari, dan tidak menunjukkan gejala kontaminasi, selanjutnya eksplan dipindahkan dan ditanam di dalam media kultur. Sebaiknya, media kultur *in vitro* dibuat menjelang digunakan untuk kultur. Media kultur tidak dapat disimpan dalam waktu yang terlalu lama, karena kualitas media dapat menurun, aktivitas komponen media berubah, kadar air semakin berkurang dan berpeluang terserang kontaminasi selama penyimpanan. Media juga sebaiknya disimpan di tempat yang tidak terpapar cahaya matahari secara langsung.

Tujuan

Praktikan dapat memahami tahapan persiapan dan tata cara pembuatan media kultur jaringan, serta pembuatan larutan stok.

Alat:

- a. Timbangan analitik.
- b. *Magnetic stirrer bar*.
- c. *Stirrer*.
- d. *Bulb*.
- e. Pipet.
- f. Labu ukur 1.000 mL.
- g. *Beaker glass* 1.000 mL.
- h. Spatula.

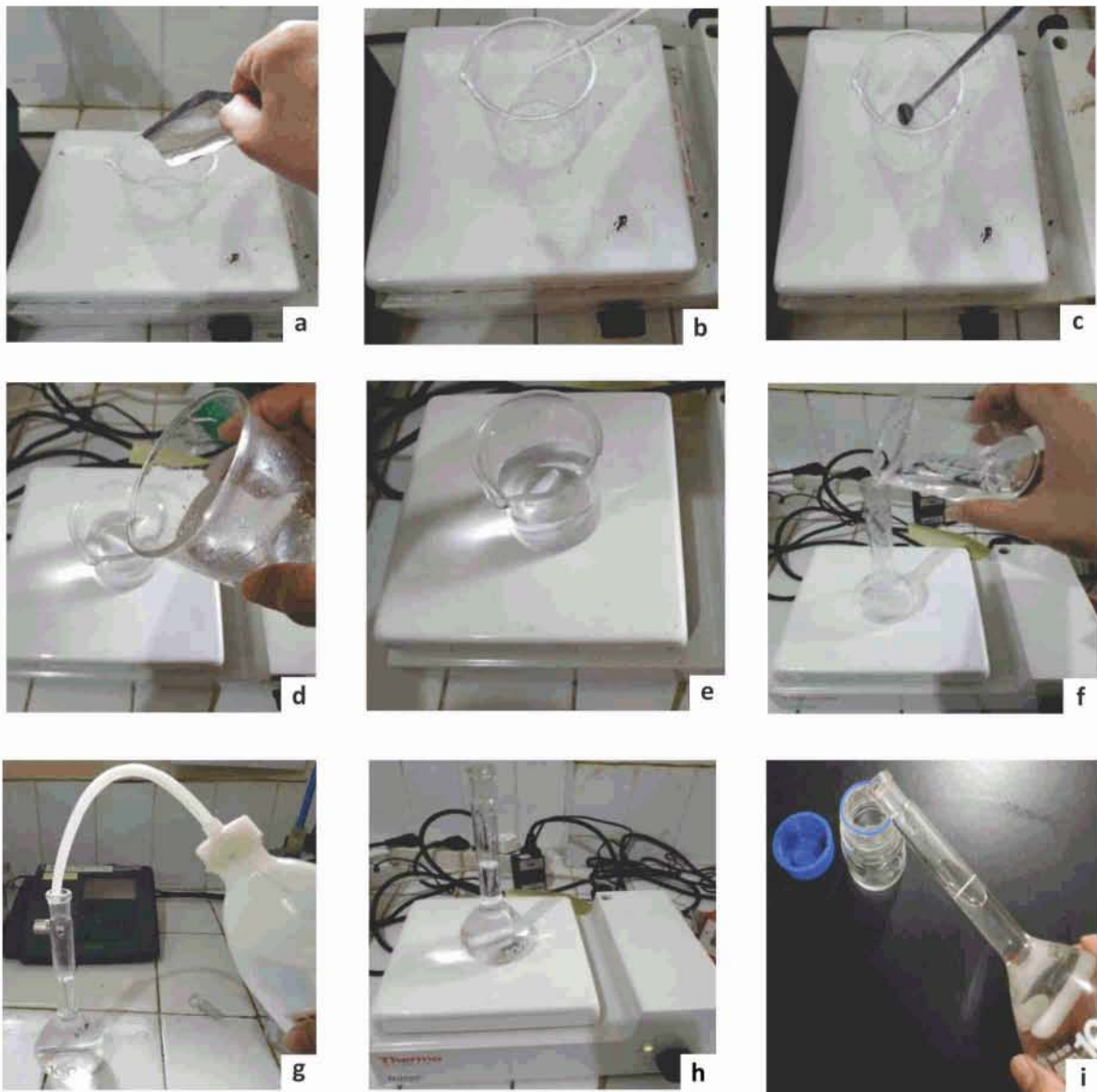
Bahan:

- a. Bahan-bahan yang tertera di dalam Tabel 11 dengan judul tabel: Komposisi medium dasar MS (Murashige dan Skoog) yang terdapat di halaman 95.
- b. *Aquadest*.
- c. *Aluminium foil*.
- d. Spidol.
- e. Label.


Instruksi Latihan:

Membuat larutan stok kultur jaringan.

1. Persiapkan bahan-bahan yang akan digunakan di meja terdekat dari neraca analitik.
2. Timbang masing-masing bahan sesuai dengan kebutuhan.
3. Tuang ± 500 mL *aquadest* ke dalam masing-masing Erlenmeyer sesuai dengan jumlah larutan stok yang akan dibuat. Komposisi pembuatan stok makronutrien dan mikronutrien berdasarkan pada Tabel 11 di atas.
4. Membuat larutan stok A dengan menimbang NH_4NO_3 sebanyak 82,50 g.
5. Membuat larutan stok B dengan menimbang KNO_3 sebanyak 95,00 g.
6. Membuat larutan stok C dengan menimbang KH_2PO_4 sebanyak 17,00 g; H_3BO_3 sebanyak 0,62 g; KI sebanyak 0,083 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,025 g; dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,0025 g.
7. Membuat larutan stok D dengan menimbang $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 44 g.
8. Membuat larutan stok E dengan menimbang $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 37,00 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 2,23 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,86 g; dan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,0025 g.
9. Membuat larutan stok F dengan menimbang $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 2,78 g dan Na_2EDTA sebanyak 3,73 g.
10. Masukkan tiap bahan yang sudah ditimbang ke dalam Erlenmeyer yang berbeda sesuai kode stok, aduk dengan *magnetic stirrer bar* dan *stirrer* hingga homogen.
11. Masukkan larutan dari Erlenmeyer ke dalam labu ukur dan genapkan volume larutan hingga 1 L di dalam labu ukur.
12. Tuang masing-masing larutan ke dalam botol Duran dan homogenkan kembali larutan dengan *stirrer* serta beri label yang sesuai kode untuk masing-masing larutan. Pada pembuatan larutan stok media, jangan sampai lupa memberi label yang benar pada botol larutan stok untuk mempermudah proses pembuatan media kultur. Contoh label tersaji dalam Gambar 15.
13. Timbang sitokinin (BAP) sebanyak 100 mg dan tuang ke dalam *Beaker glass* 100 mL (a); tambahkan sekitar ± 30 tetes atau 2 mL HCl 1 N (b); aduk dengan menggunakan spatula/*stirrer* hingga larut (c); tambahkan sedikit *aquadest* (d); aduk kembali larutan hormon dengan menggunakan *stirrer* (e); masukkan larutan ke dalam labu takar 100 mL (f); tambahkan *aquadest* dengan labu semprot hingga meniskus bawah cairan tepat mengenai tera labu ukur hingga mencapai volume 100 mL (g); aduk kembali dengan *stirrer* hingga larutan menjadi jernih dan homogen (h); pindahkan larutan ke dalam botol stok Duran dan beri label: Sitokinin BAP, 100 mg/100mL (1 ppm: 1 mL/L) (i). Untuk pembuatan hormon auksin (NAA) sama halnya dengan pembuatan BAP, namun menggunakan pelarut NaOH 1 N. Pada pembuatan larutan stok hormon perlu diperhatikan penambahan asam-basa lengkap berdasarkan komposisi yang tersaji di dalam Tabel 12 dan Tabel 13.



14. Pada pembuatan vitamin Morell susunan komposisi harus berdasarkan komposisi yang tersaji di dalam Tabel 14. Sedangkan komposisi untuk vitamin Melamine tersaji di dalam Tabel 15.
15. Semua larutan stok dapat langsung disimpan ke dalam lemari es dengan suhu $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ agar larutan stok bertahan lama.

	LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI SEAMEO BIOTROP
Nama pembuat :	
Larutan stok :	
Tanggal pembuatan :	
Suhu ruangan untuk penyimpanan : -4 °C	

Gambar 15 Label bahan kimia yang ditempel di botol yang berisi larutan stok

Tabel 12 Komposisi bahan untuk pembuatan hormon dan penambahan asam basa

No	Nama bahan	Jumlah bahan yang ditimbang	Cara membuat
1	BAP	100 mg dalam 100 mL	Larutkan BAP dengan HCl 1 N, kemudian campur dengan <i>aquadest</i> 100 mL.
2	NAA	100 mg dalam 100 mL	Larutkan NAA dengan KOH 1 N, kemudian campur dengan <i>aquadest</i> 100 mL.
3	IBA	100 mg dalam 100 mL	Larutkan IBA dengan NaOH 1 N, kemudian campur dengan <i>aquadest</i> 100 mL.
4	KOH 1 N	5,6 g dalam 100 mL	Larutkan KOH dengan 100 mL <i>aquadest</i> .
5	HCl 1 N	3,9 mL (pekat) dalam 100 mL	Larutkan HCl dengan 100 mL <i>aquadest</i> .
6	KCl 1 N	5,6 g KCl padat	Larutkan KCl dengan 100 mL <i>aquadest</i> .

Tabel 13 Pelarut asam dan basa untuk pembuatan hormon

No.	Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	Pelarut
1	BAP	HCl 1 N
2	Kinetin	HCl 1 N
3	Zip	HCl 1 N
4	Thidiazuron	HCl 1 N
5	IAA	NaOH/KOH 1 N
6	NAA	NaOH/KOH 1 N
7	IBA	NaOH/KOH 1 N
8	2,4 D	Alkohol 95%
9	GA ₃	NaOH/KOH 1 N
10	Pitocram	NaOH/KOH 1 N

Catatan: ZPT bersifat asam maka pelarutnya basa (NaOH 1 N), sedangkan ZPT bersifat basa maka pelarutnya adalah asam (HCl 1 N)

Tabel 14 Komposisi pembuatan vitamin Morell

No	Nama bahan	Jumlah bahan yang ditimbang	Keterangan
1	Calcium pantotenat	0,05 g	Larutkan seluruh bahan ke dalam 100 mL <i>aquadest</i> dan dipipet sebanyak 2 mL untuk membuat 1 L media.
2	Myo Inositol	0,5 g	
3	Biotine	0,0005 g	
4	Acid Nicotinic	0,05 g	
5	Pyridoxin HCl	0,05 g	
6	Thyamine HCl	0,05 g	

Tabel 15 Komposisi pembuatan vitamin Melamine

No	Nama bahan	Jumlah bahan yang ditimbang	Keterangan
1	Pyridoxine HCl	0,5 g	Larutkan seluruh bahan ke dalam 100 mL <i>aquadest</i> dan dipipet sebanyak 2 mL untuk membuat 1 L media.
2	Thyamine HCl	0,4 g	
3	Nicotinic Acid	0,5 g	
4	Glycine	2,0 g	

Pembuatan Media Kultur Jaringan

1. Tuang ± 200 mL *aquadest* ke dalam Erlenmeyer.



2. Tuang larutan stok A sebanyak 20 mL (a); larutan stok B sebanyak 20 mL (b); stok C sebanyak 10 mL (c); stok D sebanyak 10 mL (d); stok E sebanyak 10 mL (e); dan stok F sebanyak 10 mL (f) ke dalam masing-masing gelas ukur.



- Masukkan larutan stok A, B, C, D, E, F dari masing-masing gelas ukur yang sudah ditera ke dalam Erlenmeyer yang berisi *aquadest*.



- Pipet vitamin sebanyak 1 mL (sesuaikan dengan formula vitamin yang dipilih).



- Timbang gula 30 g (a) dan masukkan ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi campuran larutan stok (b).



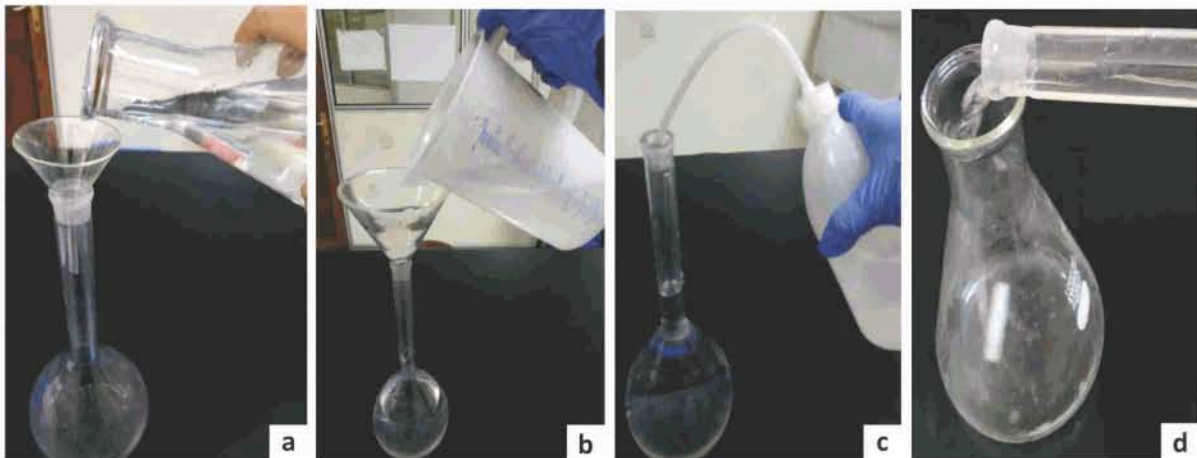
6. Timbang 100 mg Myo Inositol (jika terpisah dengan vitamin) (a) dan masukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi larutan stok dan vitamin (b).



7. Aduk media kultur jaringan hingga larutan homogen dengan *stirrer* dan *magnetic stirrer bar*.



8. Tuang larutan dari dalam Erlenmeyer ke dalam labu ukur (a), tambahkan *aquadest* ke dalam labu ukur sampai mendekati tera labu (b), tambahkan *aquadest* dengan labu semprot hingga meniskus bawah cairan tepat mengenai tera labu ukur (c), lalu tuang kembali larutan media ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi *magnetic stirrer bar* untuk menghomogenkan larutan (d).



9. Aduk media kultur jaringan dengan *stirrer* sehingga larutan media menjadi homogen.



10. Kalibrasi pH sebelum digunakan untuk mengukur pH media kultur jaringan. Dimulai dengan kalibrasi pH 4 (a), selanjutnya kalibrasi dengan pH 7 (b). Setelah tiap tahap kalibrasi, elektroda pH meter dibilas dengan *aquadest*.



11. Masukkan elektroda pH meter ke dalam larutan media kultur jaringan (a), cek monitor hingga pH sesuai kebutuhan (b).



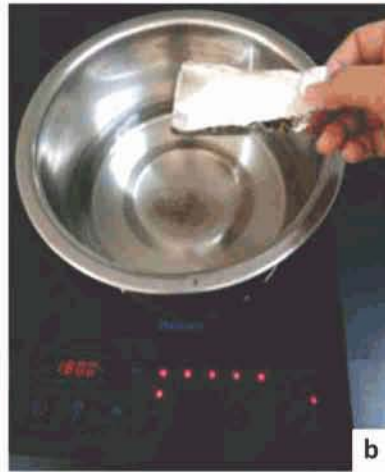
12. Tambahkan beberapa tetes KOH untuk menaikkan pH larutan media, atau tambahkan beberapa tetes HCl untuk menurunkan pH media (a). Penambahan KOH/HCl dilakukan sambil melihat monitor pH untuk mengetahui apakah pH larutan media sudah sesuai dengan pH yang dibutuhkan (b).



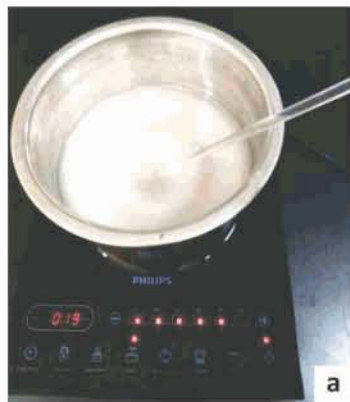
13. Setelah pH larutan media sesuai, lalu masukkan larutan media kultur jaringan ke dalam panci.



14. Timbang 7 - 8 g bubuk agar-agar sebagai pematat media (a), lalu masukkan agar-agar ke dalam panci yang berisi larutan media (b).



15. Aduk terus menerus larutan media dan agar-agar (a), sampai media mendidih (b).



16. Tuang media kultur jaringan yang sudah mendidih dari panci ke dalam gelas ukur plastik untuk memindahkan dan menampung larutan media (a), kemudian pindahkan larutan media ke dalam botol-botol jar berkapasitas ±35 mL (b).



17. Tutup rapat botol-botol media (a) dan sterilkan media dengan cara dimasukkan ke dalam autoklaf (b).

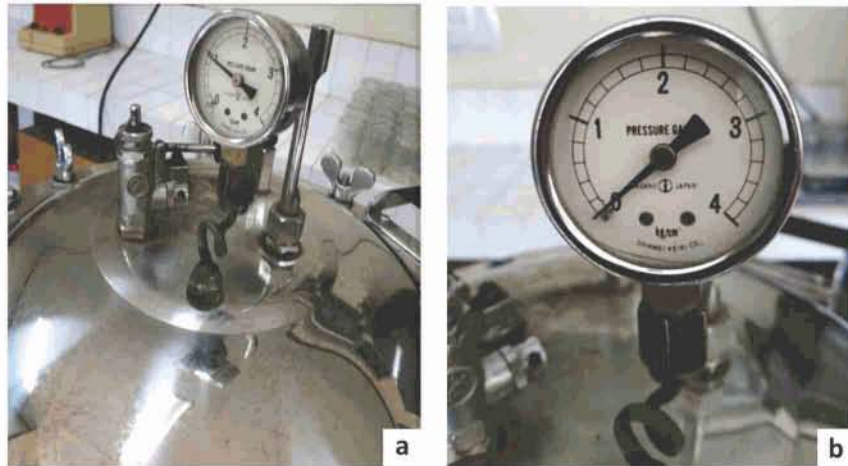


18. Tutup autoklaf dan kunci tutup autoklaf dengan cara mengencangkan sekrup pengaman hingga rapat. Pastikan katup uap sudah tertutup. Selanjutnya atur tekanan dan waktu sterilisasi pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.



19. Sambungkan steker autoklaf ke stop kontak dan nyalakan autoklaf dengan menekan tombol *on/off*.
20. Setelah proses sterilisasi selesai maka autoklaf akan berbunyi.

21. Tekan tombol *on/off* untuk mematikan autoklaf. Cabut steker autoklaf dari stop kontak. Pastikan tekanan autoklaf dari naik (a) menjadi turun dan tekanan harus sudah berada pada posisi 0 psi, yang berarti tekanan uap di dalam autoklaf sudah turun (b) sebelum membuka tutup autoklaf.



22. Keluarkan botol-botol media dari autoklaf. Gunakan sarung tangan tahan panas untuk mengambil media yang sudah disterilisasi.



23. Inkubasi botol media ± 3 hari di ruangan kultur sebelum digunakan, untuk memastikan bahwa media sudah steril/bebas kontaminasi.



Catatan:

- a. Media pra-kondisi biasanya mempunyai konsentrasi $\frac{1}{2}$ dari konsentrasi media kultur. Dengan demikian, bahan yang digunakan untuk membuat media pra-kondisi adalah $\frac{1}{2}$ dari berat atau volume bahan media kultur.
- b. Untuk tujuan induksi multiplikasi dan perakaran, maka media kultur ditambahi hormon sesuai fungsinya.
- c. Media kultur MS_0 adalah media tanpa hormon.

BAB 10 INDUKSI MULTIPLIKASI EKSPLAN

Pendahuluan

Salah satu tujuan dari kultur jaringan tanaman adalah mikropropagasi (perbanyak mikro/klonal *in vitro*). Untuk melakukan mikropropagasi, eksplan yang berhasil ditanam dalam media pra-kondisi, yang merupakan hasil inisiasi tunas, bisa diinduksi untuk membentuk tunas-tunas baru, baik tunas aksiler maupun tunas adventif.

Multiplikasi tunas terdiri dari tiga tahap, yaitu 1. tunas diinduksi untuk membentuk tunas-tunas baru di media induksi tunas; 2. tunas-tunas yang telah berhasil diinduksi kemudian disubkultur ke media elongasi tunas, sehingga tunas-tunas tersebut mengalami pertumbuhan tinggi; 3. tunas yang sudah tinggi dapat digunakan untuk penggandaan tunas berikutnya dengan cara memotong-motong tunas kembali dan disubkultur ke media induksi baru. Kegiatan tersebut dilakukan secara berulang-ulang untuk memperbanyak jumlah kultur *in vitro* hingga mencapai jumlah yang diinginkan.

Induksi pembentukan tunas dapat dilakukan dengan menambahkan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) ke dalam media. ZPT dapat mempengaruhi kecepatan pertumbuhan eksplan. Salah satu ZPT yang digunakan adalah benzyl amino purin (BAP). BAP berfungsi sebagai perangsang pertumbuhan tunas, berpengaruh terhadap metabolisme sel, dan berfungsi sebagai pendorong proses fisiologis yang bergantung pada konsentrasi yang digunakan (Ilham *et al.* 2019). ZPT yang ditambahkan ke dalam media kultur berfungsi untuk menginduksi eksplan agar dapat membentuk tunas yang kemudian disubkultur ke media kultur baru menjadi *plantlet* baru. Tipe eksplan bagian pucuk merupakan bagian terbaik untuk digunakan dalam pembiakan *in vitro*.

ZPT lain yang dapat digunakan untuk induksi eksplan adalah kombinasi zat pengatur tumbuh NAA (*Napthalene Acetic Acid*) yang merupakan golongan Auksin dan BAP (*6-Benzyl Amino Purine*) dan golongan sitokinin di mana kedua zat ini berfungsi untuk merangsang pembesaran sel, sintesis kromosom DNA, pembentukan tunas, pembentukan batang, serta untuk merangsang pertumbuhan akar. Akan tetapi, jika NAA digunakan dalam dosis tinggi, maka NAA akan menghalangi pertumbuhan bahkan membunuh tanaman.

Auksin dan sitokinin merupakan fitohormon yang bekerja secara antagonis. Rasio kedua hormon tersebut berperan dalam pembentukan akar, tunas, dan kalus. Pada tembakau, rasio auksin yang lebih tinggi dibandingkan sitokinin mampu memicu terbentuknya akar, sedangkan rasio sitokinin yang lebih tinggi daripada auksin mampu memicu terbentuknya tunas. Pada rasio yang sama antara auksin dan sitokinin, eksplan tembakau akan terinduksi membentuk kalus (Koike *et al.* 2017). Penelitian Wahyuni *et al.* (2019) menunjukkan bahwa interaksi konsentrasi auksin IAA (*Indole Acetic Acid*) dan BAP terbaik untuk eksplan ulin (*Eusideroxylon zwageri*) berkalus terjadi pada kombinasi konsentrasi

IAA 2 mg/L + BAP 0 mg/L (Wahyuni *et al.* 2019). Berdasarkan hasil pekerjaan tim Laboratorium Bioteknologi SEAMEO BIOTROP, maka kombinasi konsentrasi antara 0,1 mg/L NAA + 2,5 mg/L BAP dalam media MS merupakan kombinasi konsentrasi terbaik untuk multiplikasi subkultur tunas gaharu jenis *Aquilaria malaccensis* Lamk. Selain itu, juga menunjukkan bahwa kombinasi konsentrasi antara 0,1 mg/L NAA + BAP 0,7 mg/L adalah yang terbaik untuk multiplikasi tunas gaharu jenis *Gyrinops versteegii* (Tim Laboratorium Bioteknologi SEAMEO BIOTROP, *unpublished*).

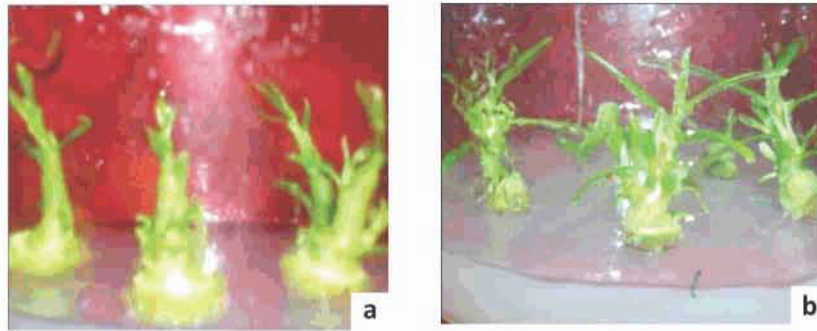
Media berperan penting dalam proses induksi pembentukan dan multiplikasi tunas, yang dipengaruhi oleh konsentrasi dan tipe hormon yang digunakan. Sebagai contoh, BAP lebih efektif daripada kinetin dan IBA (*Indole Butyric Acid*) untuk pembentukan tunas. BAP merupakan jenis sitokinin yang lebih umum digunakan dalam kultur *in vitro*, karena lebih efektif dan stabil dibandingkan dengan hormon sitokinin yang lainnya (Karolak *et al.* 2020).

Di dalam kultur jaringan, tahap induksi melibatkan hormon ekstrasel yang berfungsi mengarahkan pertumbuhan sel tumbuhan. Setiap tanaman memerlukan suplementasi yang berbeda untuk memicu pertumbuhan salah satu organ tanaman. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kandungan hormon endogen dalam tanaman serta reaksi suatu tanaman dalam merespons hormon ekstrasel. Percobaan perlu dilakukan untuk menemukan kombinasi konsentrasi yang optimum untuk propagasi dan induksi eksplan dari setiap tanaman. Sebagai contoh, percobaan sedang dilakukan untuk menemukan media yang cocok untuk menginduksi multiplikasi eksplan *A. mangium* (Gambar 16).

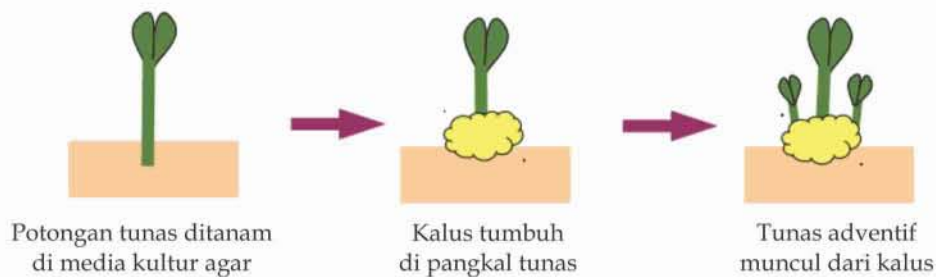


Gambar 16 Contoh percobaan eksplan *A. mangium* yang ditanam pada media pra-kondisi, kemudian diinduksi pada media multiplikasi eksplan

Proses induksi tunas selain menggunakan ZPT tunggal, juga menggunakan kombinasi ZPT seperti 0,1 mg/L NAA+1 mg/L BAP di dalam media MS. Kombinasi ZPT tersebut merupakan kombinasi ZPT terbaik untuk multiplikasi subkultur tunas *Aquilaria crassna* berumur 4 minggu (Gambar 17a) dan berumur 6 minggu (Gambar 17b).



Gambar 17 Hasil induksi eksplan pada *Aquilaria crassna* berumur 4 minggu (a) dan berumur 6 minggu (b)



Gambar 18 Ilustrasi perbanyakan *in vitro* tunas adventif

Gambar 18 menunjukkan perbanyakan *in vitro* tunas adventif, yaitu tunas yang muncul dari sel selain sel meristem tunas. Di dalam kultur jaringan *in vitro* sering muncul sekumpulan massa sel akibat induksi dari fitohormon yang disebut sebagai kalus. Tingkat multiplikasi tunas adalah jumlah tunas baru yang dihasilkan oleh tunas *in vitro* pada setiap subkultur. Informasi tentang tingkat multiplikasi tunas sangat penting untuk membuat perencanaan produksi bibit.

Pada awal proses multiplikasi tunas *in vitro*, tingkat multiplikasi tunas masih rendah dan akan semakin meningkat setelah induksi multiplikasi dilakukan berulang-ulang. Pada umumnya, tingkat multiplikasi tunas lebih banyak terjadi pada tunas adventif daripada tunas aksiler. Tingkat multiplikasi tunas pada setiap tanaman sangat bervariasi berkisar antara 3 - 6 tunas pada tunas aksiler dan 7 - 15 tunas pada tunas adventif. Namun, tingkat multiplikasi tunas yang terlalu tinggi dapat menimbulkan efek negatif, seperti mengakibatkan ketegaran tunas berkurang serta terjadi mutasi genetik pada tunas yang dihasilkan. Tingkat multiplikasi tunas dipengaruhi oleh cara memotong eksplan, ukuran potongan setiap eksplan, cara meletakkan eksplan, frekuensi subkultur, dan jumlah buku tunas *in vitro*. Setiap kultur *in vitro* memerlukan waktu optimal yang berbeda, tergantung pada jenis tanaman yang dikulturkan, untuk memperoleh pertumbuhan dan multiplikasi tunas yang baik dari segi kualitas dan kuantitas tanaman.

Medium kultur *in vitro* harus dibuat dengan cermat dan teliti sehingga memberikan pengaruh pertumbuhan yang optimal. Pada umumnya, media dasar kultur yang digunakan adalah sama yaitu media MS. Namun, setiap jenis tanaman mempunyai kebutuhan tambahan ZPT yang berbeda di dalam media kultur *in vitro*, sehingga perlu diketahui komposisi ZPT yang tepat melalui penelitian lebih lanjut. Tahapan penelitian dimulai dengan studi literatur untuk mengetahui fungsi dan sifat dari ZPT yang akan digunakan terhadap eksplan dan untuk mengetahui kisaran konsentrasi ZPT pada tanaman yang tergolong dalam satu genus atau satu famili dengan tanaman yang akan diteliti. Tahapan selanjutnya adalah menentukan jenis dan kisaran konsentrasi ZPT yang akan diterapkan di dalam setiap percobaan.

Tujuan

Praktikan dapat melakukan perbanyakan tunas dengan menggunakan media induksi.

Alat:

- a. Cawan Petri.
- b. Spidol.
- c. Keranjang.
- d. Lampu Bunsen.
- e. Alat diseksi.

Bahan:

- a. Alkohol 70%.
- b. Tisu/kapas.
- c. Media induksi.
- d. Eksplan *A. mangium*.
- e. Kertas saring.

Induksi Multiplikasi Tunas dari Media Pra-kondisi

Instruksi Latihan:

1. Lakukan induksi multiplikasi tunas di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Tata cara penggunaan LAF telah dijelaskan di dalam Bab 5.

2. Lakukan sterilisasi LAF dan peralatan lain sebelum digunakan untuk induksi tunas. Nyalakan lampu UV selama 30 menit hingga 1 jam dengan menekan tombol *on* sebelum melakukan aktivitas di dalam LAF.



3. Setelah selesai melakukan sterilisasi LAF, semprot bagian dalam LAF dengan alkohol 70% (a) dan lap meja LAF dengan kapas/tisu (b).



4. Nyalakan lampu Bunsen (a) dan lakukan sterilisasi bakar terhadap alat diseksi (b).



5. Semprotkan alkohol 70% pada botol-botol media sebelum dimasukkan ke dalam LAF.



6. Induksi tunas dilakukan setelah eksplan yang telah disterilkan dipelihara selama ± 30 hari pada media pra-kondisi.



7. Pindahkan tunas dari media pra-kondisi (a) ke media induksi, lalu lakukan subkultur eksplan di dekat api agar subkultur berada di dalam kondisi aseptik (b). Berbagai kombinasi konsentrasi ZPT yang ditambahkan ke dalam media induksi untuk latihan ini tertera pada Tabel 16.



8. Tutup botol dan beri seal yang rapat. Kemudian beri label dengan spidol. Label berisi informasi tentang nama klon dan tanggal dilakukannya transfer tunas ke media induksi.

9. Matikan lampu Bunsen dan bersihkan LAF setelah semua eksplan selesai ditransfer ke media induksi.
10. Simpan hasil induksi di dalam ruangan inkubasi laboratorium bersuhu 22 – 25 °C.
11. Amati pertumbuhan dan perkembangan eksplan selama 8 minggu setelah tanam (MST). Peubah yang diukur adalah:
 1. Waktu munculnya tunas
Lakukan pengamatan setiap hari dengan melihat perkembangan kemunculan tunas pada eksplan.
 2. Jumlah tunas
Hitung jumlah tunas pada akhir pengamatan, yaitu pada 8 MST dengan cara menghitung jumlah tunas yang terbentuk.
 3. Tinggi tunas
Ukur tinggi tunas, yaitu selisih tinggi tunas pada akhir pengamatan dengan tinggi tunas saat masuk media induksi. Pengukuran dilakukan menggunakan kertas milimeter yang diletakkan di bawah cawan Petri.
 4. Waktu munculnya kalus
Pengamatan dilakukan setiap hari dengan melihat kemunculan kalus pada eksplan.
 5. Ukuran kalus
Skoring penetapan eksplan yang berkalus dilakukan berdasarkan kriteria penilaian pada Tabel 17.
12. Isilah Tabel 18 dan Tabel 19 berdasarkan hasil pengamatan.

Media yang digunakan dalam kegiatan inisiasi awal tunas pucuk *A. mangium* adalah media MS ditambah ZPT sitokinin (BAP 0,5 mg/L). Setelah 1 bulan dimasukkan ke dalam media 0, yaitu media MS tanpa penambahan ZPT. Selanjutnya media perlakuan yang digunakan adalah media MS dengan penambahan ZPT berupa sitokinin (BAP) dan auksin (NAA), yang terdiri dari 9 kombinasi konsentrasi ZPT BAP dan NAA (Tabel 16).

Percobaan dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial, dengan 2 faktor perlakuan yaitu jenis ZPT dan konsentrasi ZPT. Jenis ZPT terdiri dari 2 taraf yaitu BAP dan NAA. Konsentrasi ZPT terdiri dari 3 taraf yaitu konsentrasi BAP (0; 0,5 dan 1,0 mg/L) dan konsentrasi NAA (0; 0,1 dan 0,2 mg/L). Masing-masing perlakuan memiliki 4 ulangan dengan 2 unit pengamatan pada setiap ulangan.

Tabel 16 Kombinasi konsentrasi dua macam ZPT sebagai perlakuan induksi dalam media dasar MS

Perlakuan	Kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (mg/L)	
	6-benzylaminopurine (BAP)	Naphthalene Acetic Acid (NAA)
A	0,0	0,0
B	0,5	0,0
C	1,0	0,0
D	0,0	0,1
E	0,5	0,1
F	1,0	0,1
G	0,0	0,2
H	0,5	0,2
I	1,0	0,2

Tabel 17 Kriteria penetapan skor pada eksplan berkalus

Skor	Kriteria
0	Eksplan hidup dan tidak membentuk kalus.
1	Eksplan membentuk sangat sedikit kalus dan bagian eksplan yang tertanam di dalam media mengembung hingga belah.
2	Eksplan membentuk kalus yang sedikit dan terdapat bulatan kalus dengan diameter kalus $\varnothing < 0,5$ cm.
3	Eksplan membentuk kalus sedang dan kalus remah dengan diameter kalus $\varnothing > 0,5 - 1,0$ cm.
4	Eksplan membentuk kalus banyak dengan diameter kalus $\varnothing > 1,0$ cm.
5	Eksplan membentuk kalus sangat banyak dan kalus membentuk <i>plantlet</i> .

Tabel 18 Pengaruh perlakuan induksi terhadap kemunculan kalus, kematian eksplan dan kontaminasi eksplan

Perlakuan	Rentang waktu kemunculan kalus (HST)	Persentase eksplan berkalus (%)	Persentase eksplan mati (%)	Persentase eksplan terkontaminasi (%)
A				
B				
C				
D				
E				
F				
G				
H				
I				

Tabel 19 Pengaruh perlakuan induksi terhadap kemunculan tunas pada eksplan berumur 8 MST

Perlakuan	Rentang waktu pertunasan (HST)	Jumlah tunas	Persentase eksplan bertunas (%)
A			
B			
C			
D			
E			
F			
G			
H			
I			

Induksi Multiplikasi Tunas dari Eksplan Tanaman Kultur Jaringan

Alat:

- Cawan Petri.
- Spidol.
- Keranjang.
- Lampu Bunsen.
- Alat diseksi.

Bahan:

- Alkohol 70%.
- Tisu/kapas.
- Media induksi.
- Eksplan gaharu
- Kertas saring.

Instruksi Latihan:

- Induksi tunas juga dapat dilakukan pada tanaman hasil elongasi yang telah cukup tua (daunnya terlihat dominan hijau tua).



2. Di dalam LAF, keluarkan eksplan dari dalam botol induksi dan letakkan di cawan Petri steril yang berisi kertas saring.



3. Pisahkan daun dan batang eksplan dengan menggunting daun-daun eksplan.



4. Ambil batang eksplan dan potong-potong ± 2 buku.



5. Tanam potongan-potongan batang eksplan di media induksi.



6. Simpan eksplan-eksplan yang telah dipindahkan ke dalam media induksi tersebut di dalam ruangan inkubasi kultur bersuhu 22 - 25 °C.

Catatan:

BAB 11 ELONGASI EKSPLAN

Pendahuluan

Elongasi merupakan cara multiplikasi yang dilakukan pada media kultur tertentu untuk memperpanjang nodus tanaman hingga 4 - 5 nodus untuk memperbanyak tanaman secara vegetatif. Tujuan dari tahap elongasi tunas adalah untuk memanjangkan tunas dan mendapatkan ukuran tumbuhan yang lebih besar sehingga tunas menjadi kokoh dan ketika memasuki tahapan aklimatisasi maka *plantlet* telah mampu berfotosintesis. Tunas yang berasal dari induksi eksplan biasanya berukuran pendek dan tidak memungkinkan untuk ditanam di lapangan, sehingga perlu dilakukan tahap elongasi tunas.

Untuk mendapatkan hasil yang memuaskan dalam tahap elongasi, maka dapat digunakan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Tingkat keberhasilan dalam penggunaan ZPT tergantung pada jenis dan konsentrasi yang digunakan untuk meningkatkan elongasi tunas. ZPT yang biasa digunakan di dalam tahap elongasi adalah dari jenis sitokinin dengan konsentrasi rendah atau tanpa sitokinin (MS_0). Pemanjangan tunas dan pembentukan akar dapat dilakukan baik secara bersamaan maupun terpisah. Tahap elongasi dan pembentukan akar penting dilakukan untuk tanaman yang akan diaklimatisasi karena dalam tahap aklimatisasi tanaman memerlukan perakaran yang baik dan pucuk tanaman yang kuat, agar memiliki peluang bertahan hidup yang lebih baik.

Seperti dalam tahap induksi, perpanjangan tunas melibatkan media elongasi. Dalam media elongasi terdapat beberapa ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) seperti IBA (*Indole Butyric Acid*), 2iP (*2-isopentenyl adenine*), BAP, Kinetin, dan TDZ (*Thidiazuron*) (Mazri 2015). Namun, jumlah dan jenis ZPT yang ditambahkan berbeda-beda tergantung pada jenis tanaman. Pada proses elongasi, asam giberelat atau lebih dikenal dengan giberelin (GA_3) memiliki peran penting dalam proses morfogenesis, membantu pertumbuhan meristem, meningkatkan internodus batang, dan mempercepat proses pembelahan sel, sehingga dapat mematahkan dormansi tanaman. Hasilnya adalah pertumbuhan tanaman secara normal, proses perkecambahan biji yang lebih cepat dan peningkatan proses pembungaan. Sebagai contoh, penambahan GA_3 pada akasia mampu menunjang tahap elongasi tunas dengan lebih baik (Yadav *et al.* 2015). Kombinasi auksin IBA 0,1 mg/L dan sitokinin BAP 0,05 mg/L pada *A. beccariana* memberikan hasil yang paling optimal dalam pertambahan tinggi dan jumlah ruas (Mulyono 2010).

Selama inokulasi atau penanaman elongasi, botol yang berisi media padat diletakkan pada kondisi horizontal, untuk mengurangi kontaminasi, terutama ketika tidak bekerja di dalam LAF. Tahap subkultur atau tahap penjarangan juga dilakukan di dalam LAF, dan merupakan tahap yang perlu dilakukan di dalam kegiatan kultur jaringan. Subkultur perlu dilakukan karena nutrisi media kultur yang semakin lama semakin berkurang, munculnya *browning* atau media kultur menjadi kecokelatan akibat senyawa toksik yang keluar dari

jaringan tanaman dan eksplan membutuhkan tahap perkembangan lebih lanjut seperti elongasi. Contoh subkultur hasil elongasi tunas pada *plantlet Aquilaria filaria* menggunakan media elongasi MS₀ tersaji dalam Gambar 19.



Gambar 19 Hasil elongasi tunas pada *plantlet Aquilaria filaria*

Tujuan

Praktikan dapat mentransfer eksplan hasil induksi ke dalam media elongasi.

Alat:

- Cawan Petri.
- Kertas saring yang diletakkan di dalam cawan Petri.
- Spidol.
- Keranjang.
- Lampu Bunsen.
- Alat diseksi.
- Botol.

Bahan:

- Alkohol 70% / *Hand sanitizer*.
- Tisu/kapas.
- Media elongasi (MS₀).
- Eksplan hasil dari tahap induksi *A. filaria*.

Instruksi Latihan:

1. Lakukan transfer eksplan di dalam LAF yang sudah disterilisasi (lihat Bab 5).
2. Lakukan sterilisasi bakar terhadap peralatan diseksi di dalam LAF.
3. Lap meja LAF dengan Alkohol 70%.
4. Nyalakan lampu Bunsen.
5. Semprotkan Alkohol 70% pada botol-botol media sebelum dimasukkan ke dalam LAF.
6. Bahan tanaman yang digunakan adalah tunas-tunas yang dihasilkan dari tahap induksi multiplikasi/perbanyak tunas.
7. Siapkan eksplan yang akan disubkultur di dalam LAF (a). Letakkan eksplan di dalam cawan Petri steril yang berisi kertas saring dan bersihkan bagian pangkal eksplan dari sisa agar-agar yang menempel dengan *scalpel*/gunting (b).



8. Setelah penutup media dibuka, lakukan subkultur di dekat api Bunsen (a) dan keluarkan tunas dari botol induksi dengan menggunakan pinset steril (b).



9. Buang sedikit kalus/bonggol eksplan (jika ada) dengan *scalpel* atau gunting.



10. Transfer eksplan dari media induksi ke media elongasi, transfer dilakukan di dekat api dari lampu Bunsen agar kondisinya aseptik.



11. Tutup botol media eksplan dan beri *seal* yang rapat agar terhindar dari kontaminasi.



12. Eksplan hasil transfer diberi label, yang berisi informasi tentang nama klon dan tanggal subkultur. Setelah itu, botol berisi eksplan hasil transfer siap disimpan di dalam ruangan kultur bersuhu 22 - 25 °C.



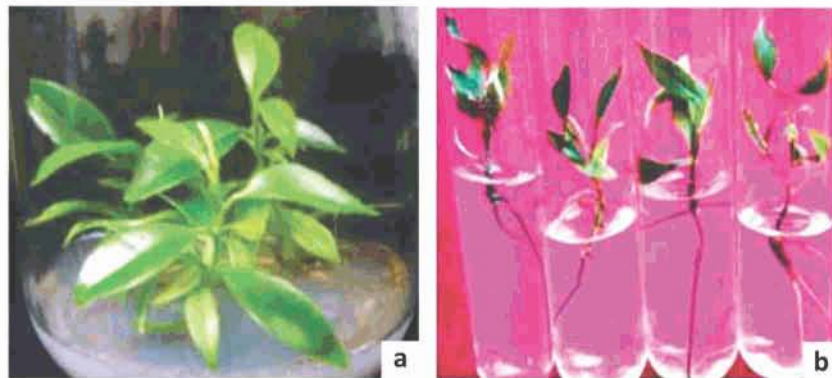
BAB 12 INDUKSI PERAKARAN EKSPLAN

Pendahuluan

Induksi perakaran eksplan adalah tahap di mana tunas-tunas *in vitro* yang dihasilkan pada tahap multiplikasi dan elongasi ditumbuhkan di media yang mengandung Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) atau media setengah konsentrasi untuk merangsang pertumbuhan akar. Induksi perakaran dapat dilakukan baik secara *in vitro* maupun *ex vitro*.

Perakaran mempengaruhi keberhasilan hidup eksplan pada proses aklimatisasi. Kondisi perakaran yang baik mencakup jumlah akar dan panjang akar yang cukup untuk hidup tanaman dan tergantung pada jenis tanaman. Jika dibandingkan dengan *plantlet* yang akarnya pendek, maka *plantlet* yang memiliki akar panjang akan memiliki kemampuan yang lebih baik untuk menyerap unsur hara dan air. Semakin panjang akar maka *plantlet* akan lebih kokoh dan lebih mudah menyerap air dan garam-garam mineral di dalam media tumbuh untuk disalurkan ke batang dan daun. Pertambahan panjang akar dipengaruhi oleh koordinasi gen yang membangun sistem perakaran dan sistem pertumbuhan daun karena daun merupakan tempat sintesis makanan yang kemudian ditranslokasikan menuju akar untuk perkembangan akar.

Pertumbuhan eksplan tunas pada awalnya tidak memiliki akar. Pembentukan akar dimulai dengan adanya metabolisme karbohidrat yang menghasilkan nutrisi untuk mendorong pembelahan sel dan membentuk sel-sel baru dalam jaringan. Untuk menumbuhkan akar, maka tunas dipotong terpisah dan diletakkan dalam media induksi perakaran. Aplikasi kombinasi IBA dan NAA bisa menginduksi pembentukan akar kultur jaringan. Media induksi akar biasanya mengandung hormon auksin dengan konsentrasi tinggi dan hormon sitokinin pada konsentrasi rendah atau nol, serta mengandung media dasar dengan konsentrasi nutrisi hara setengah dari konsentrasi normal. ZPT auksin eksogen tersebut bisa berinteraksi dengan auksin internal yang tidak bisa bersintesis karena jaringan/organ yang terbatas dan kecil dan membatasi kemampuan auksin internal dalam membentuk perakaran. IBA memiliki kemampuan yang lebih superior dibandingkan dengan auksin lainnya karena sifatnya stabil dan tidak mudah memecah enzim penting yang digunakan dalam pembentukan akar (Salih *et al.* 2016). Tipe sistem perakaran *plantlet* yang dihasilkan tergantung pada ZPT yang digunakan. Asam phenoxy pada 2,4-D dan 2,4,5-T menghasilkan sistem perakaran yang banyak, tebal dan kokoh, sedangkan IBA menghasilkan sistem perakaran serabut yang kuat. Tahap induksi perakaran dapat dilakukan di dalam botol jar atau di dalam tabung reaksi untuk mengetahui panjang akar (Gambar 20a; 20b).



Gambar 20 Perakaran *plantlet Aquilaria malaccensis* yang menggunakan $\frac{1}{2}$ konsentrasi media MS modifikasi + IBA 2 mg/L: (a) di dalam botol jar; (b) di dalam tabung reaksi sehingga panjang akar *A. malaccensis* dapat diukur

Konsentrasi yang sama dari IAA, NAA atau IBA digunakan tersendiri pada $\frac{1}{2}$ konsentrasi media MS untuk induksi akar yang sebanyak-sebanyaknya. Pertumbuhan akar tunas dipengaruhi oleh pH, tingkat auksin dan konsentrasi nutrisi pada media induksi akar. Hormon perakaran berperan meningkatkan persentase perakaran, mempercepat inisiasi perakaran, meningkatkan jumlah dan kualitas akar, serta mendorong perakaran yang seragam. Perbandingan antara konsentrasi sitokinin dan auksin yang tinggi akan menginduksi pembentukan tunas, sedangkan perbandingan antara konsentrasi sitokinin dan auksin yang rendah akan menginduksi pembentukan akar (Sulasiah *et al.* 2015).

Kombinasi hormon NAA berkonsentrasi 0,01 mg/L dengan hormon IBA berkonsentrasi 2,0 mg/L dapat menginduksi akar gaharu jenis *Gyrinops versteegii*. Dalam konsentrasi rendah, auksin memacu pembentukan dan pemanjangan akar, sedangkan pada konsentrasi tinggi auksin dapat menghambat proses elongasi akar. Hambatan tersebut terjadi karena akumulasi etilen dalam tubuh eksplan yang terdapat pada ujung akar.

Perbedaan pembentukan jumlah akar dan pertumbuhan panjang akar disebabkan oleh:

1. Eksplan masih memiliki kandungan sitokinin yang cukup tinggi dari tahap sebelumnya. Konsentrasi sitokinin yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan akar.
2. Serapan tiap eksplan yang berbeda-beda terhadap auksin yang diberikan dan waktu yang dibutuhkan oleh eksplan untuk memacu pertumbuhan dan perpanjangan akar. NAA dan IBA memiliki sifat translokasi auksin yang agak lambat dan aktivitasnya juga lambat (Akbar *et al.* 2017).
3. Eksplan masih memiliki kandungan auksin endogen yang tinggi, sehingga pemberian auksin eksogen menghambat perpanjangan akar. Dengan demikian penggunaan media MS_0 dan $MS_{1/2}$ tanpa ZPT sudah cukup untuk menumbuhkan akar (Febriyanti *et al.* 2013).

Tujuan

Praktikan dapat melakukan subkultur eksplan hasil elongasi ke dalam media induksi perakaran.

Alat:

- a. Cawan Petri.
- b. Kertas saring.
- c. Spidol.
- d. Keranjang.
- e. Lampu Bunsen.
- f. Alat diseksi.
- g. Botol.

Bahan:

- a. Alkohol 70% / *Hand sanitizer*.
- b. Tisu/kapas.
- c. Media perakaran.
- d. Eksplan gaharu tahap elongasi.

Instruksi Latihan:

1. Lakukan transfer eksplan di dalam LAF yang sudah disterilkan (lihat Bab 5).
2. Lakukan sterilisasi bakar untuk alat diseksi yang akan digunakan.
3. Nyalakan lampu spiritus.
4. Semprotkan alkohol 70% pada botol-botol media sebelum dimasukkan ke dalam LAF.
5. Tunas-tunas dikeluarkan dari dalam botol media elongasi dan pisahkan satu tunas dari tunas lainnya.



6. Bagian pangkal dari setiap tunas dibersihkan dari sisa agar-agar yang menempel dengan menggunakan *scalpel* dan keringkan dengan kertas saring yang sudah diletakkan di dalam cawan Petri. Buang sedikit kalus/bonggol eksplan (jika ada) dengan *scalpel* atau gunting.



7. Pindahkan eksplan dari media elongasi ke media perakaran. Pindahan dilakukan di dekat api agar berada dalam kondisi yang aseptik.



8. Tutup botol eksplan dan beri *seal* yang rapat, kemudian diberi label dengan cara menuliskan informasi tentang nama klon dan tanggal transfer pada tutup botol.



9. Inkubasi eksplan hasil transfer di dalam ruangan kultur bersuhu 22 - 25 °C



Catatan:

BAB 13 PEMELIHARAAN EKSPLAN DI RUANGAN INKUBASI LABORATORIUM

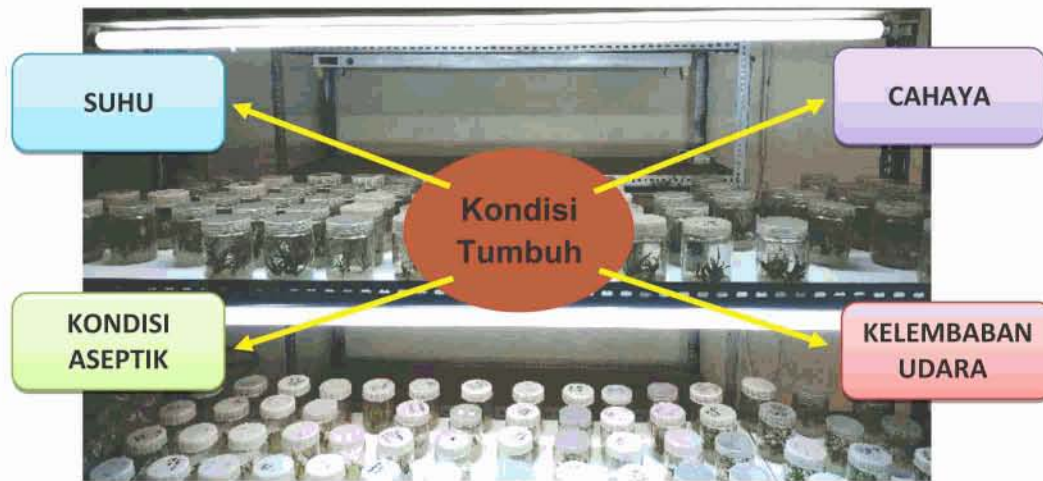
Pendahuluan

Ruangan inkubasi (*growing area*) adalah ruangan pertumbuhan atau ruangan penyimpanan hasil kultur jaringan dengan kondisi cahaya dan suhu yang terkontrol serta harus dijaga kesterilannya. Di dalam ruangan inkubasi terdapat rak-rak yang digunakan untuk inkubasi. Rak-rak tersebut dilengkapi dengan lampu neon di atasnya sebagai sumber cahaya pengganti cahaya matahari. Ruangan inkubasi dalam kegiatan kultur jaringan dilengkapi dengan *air conditioner* (AC) dan *termohigrometer* untuk mengontrol suhu dan kelembaban udara di dalam ruangan. Selain itu, terdapat juga *exhaust fan* di dinding ruangan inkubasi untuk mengeluarkan debu yang ada di dalam ruangan dan untuk mengeluarkan udara yang mengandung sisa formalin setelah kegiatan sterilisasi ruangan.

Ruangan inkubasi mutlak harus dilengkapi dengan AC untuk meminimalkan kontaminasi yang disebabkan oleh debu. Ruangan inkubasi dirancang sebagai ruangan yang tertutup tanpa ada ventilasi. Jendela-jendela yang ada di ruangan inkubasi dibuat dari kaca dan tidak bisa dibuka. Jendela kaca tersebut berfungsi sebagai jalan masuknya cahaya. Pintu ruangan inkubasi sebaiknya selalu tertutup dan sedapat mungkin tidak dikunjungi oleh orang yang tidak berkepentingan. Kondisi ruangan inkubasi harus dibuat dan dijaga seoptimal mungkin agar eksplan tumbuh secara normal.

Rak-rak di dalam ruangan inkubasi terbuat dari kaca atau tripleks yang permukaannya dilapisi melamin berwarna putih. Tiang rak kultur sebaiknya terbuat dari besi bulat atau besi siku berlubang yang sudah dicat berwarna terang (putih) sehingga ketika tiang kotor mudah terlihat dan segera dibersihkan. Kayu tidak dianjurkan sebagai bahan tiang rak kultur, karena bahan kayu bisa menjadi tempat tumbuhnya fungi. Rak-rak tersebut digunakan untuk meletakkan botol-botol kultur setelah proses subkultur/penanaman.

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan di ruangan inkubasi adalah suhu dan cahaya. Suhu optimum di dalam ruangan inkubasi adalah 22 - 25 °C dengan kelembaban udara 70%. Suhu menentukan respons fisiologi kultur dan kecepatan pertumbuhan, sedangkan cahaya berperan dominan pada proses fotosintesis, juga sebagai pengendali, pemicu, dan modulator respons morfogenesis, khususnya pada tahap awal pertumbuhan tanaman. Cahaya di dalam ruangan inkubasi adalah cahaya buatan dari lampu neon dengan intensitas cahaya 1.000 - 1.500 lux (135 - 210 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), atau setara dengan 2 buah lampu neon 2 watt pada ketinggian 40 cm di atas botol kultur. Pengaturan sumber cahaya dari samping juga dapat dilakukan. Peningkatan intensitas cahaya dapat mengurangi kebutuhan gula, mengurangi tingkat kontaminasi dan mempermudah tanaman untuk tumbuh dan beradaptasi di rumah kaca pada tahap aklimatisasi. Kondisi pemeliharaan eksplan di dalam ruangan inkubasi harus memenuhi standar inkubasi kultur jaringan (Gambar 21).



Gambar 21 Kondisi pemeliharaan *plantlet* di dalam ruangan inkubasi kultur

Keberhasilan kegiatan kultur jaringan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pemilihan eksplan yang tepat sebagai bahan dasar, komposisi media tumbuh dan penggunaan Zat Pengatur Tumbuh yang sesuai, metode sterilisasi, dan keadaan ruangan inkubasi yang aseptik disertai suhu, kelembaban udara dan intensitas cahaya yang optimum, dan pengaturan sirkulasi udara yang teratur. Propagasi tanaman menggunakan teknik kultur jaringan akan menghasilkan tunas dan akar yang lebih baik dibandingkan dengan propagasi tanaman secara konvensional.

Tujuan

Praktikan mengetahui cara memelihara eksplan di ruangan inkubasi.

Alat:

- Rak kultur.
- Lampu neon.
- AC.
- Termohigrometer*.
- Keranjang dorong.
- Timer* listrik.

Bahan:

- Eksplan.
- Label.
- Alkohol 70%.
- Tisu/kapas.
- Spidol.

Instruksi Latihan:

1. Letakkan botol-botol eksplan dari LAF di atas rak dorong dan masukkan ke dalam ruangan inkubasi.



2. Sterilkan rak di ruangan inkubasi dengan cara menyemprotkan alkohol 70% secara merata.





3. Lap rak yang sudah disemprot alkohol 70% dengan tisu/kapas.



4. Letakkan botol-botol eksplan berjejer rapi di atas rak kultur.



5. Catat riwayat eksplan di setiap rak dengan mengisi label yang berisi informasi tentang nama kultur (klon), tanggal tanam dan teknisi/pekerja.

 	LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI SEAMEO BIOTROP
Teknisi :	
Klon :	
Tanggal:	

6. Suhu ruangan inkubasi dijaga agar tetap berkisar 22 - 25 °C. Sebagai sumber cahaya adalah lampu neon/*fluorescent* yang diposisikan pada ketinggian 40 cm di atas botol kultur. Alat *termohigrometer* diletakkan di ruangan inkubasi untuk memonitor suhu dan kelembaban ruangan. Di ruangan kultur juga tersedia *timer* listrik untuk mengatur waktu penyinaran dengan durasi 16 jam *on* dan 8 jam *off* seperti waktu siang dan malam.
7. Lakukan sterilisasi ruangan inkubasi setiap minggu untuk menjaga kondisi aseptik ruangan inkubasi.

BAB 14 PENANGANAN KONTAMINASI

Selama kegiatan kultur jaringan, kontaminasi bisa saja terjadi di setiap tahap kegiatan kultur jaringan. Komponen yang paling rentan terhadap kontaminasi mikroorganisme adalah media kultur dan eksplan. Media kultur dan eksplan dapat terkontaminasi oleh mikroorganisme karena keduanya dapat berfungsi sebagai substrat yang baik bagi pertumbuhan mikroorganisme, termasuk bakteri dan fungi. Mikroorganisme akan tumbuh dengan cepat sehingga menutupi permukaan media dan eksplan yang ditanam.

Kontaminasi yang disebabkan oleh mikroorganisme merupakan salah satu masalah serius dalam kegiatan kultur jaringan tanaman karena menyebabkan hilangnya kultur tanaman. Usaha untuk meningkatkan skala produksi mikropropagasi dengan teknik kultur jaringan seringkali terhambat oleh kontaminasi mikroorganisme. Oleh sebab itu, jika terjadi kontaminasi di dalam kegiatan kultur jaringan, maka harus segera dilakukan pemusnahan eksplan yang terkontaminasi agar mikroorganisme tidak terus berkembang dan lingkungan kegiatan kultur jaringan tidak tercemar mikroorganisme.

Salah satu faktor penghambat dalam mikropropagasi tanaman secara *in vitro* adalah terjadinya kontaminasi pada setiap masa dalam periode kultur. Kontaminasi terdiri dari dua jenis, yaitu kontaminasi internal dan kontaminasi eksternal.

Kontaminasi internal adalah kontaminasi yang berasal dari eksplan yang bisa terjadi di permukaan eksplan atau di dalam sel eksplan. Biasanya, kontaminasi internal eksplan terjadi melalui luka-luka akibat pemotongan dan penanganan saat sterilisasi, yang mengakibatkan keluarnya mikroba dari dalam jaringan eksplan dan mengkontaminasi media. Kontaminasi yang terjadi di bagian luar eksplan adalah akibat kondisi yang tidak steril di permukaan eksplan.

Kontaminasi internal lebih sulit ditangani karena kontaminannya bersifat resistan terhadap agen sterilan yang biasa digunakan pada saat sterilisasi eksternal. Mikroba endofit yang menjadi penyebab kontaminasi internal dapat menghambat dan bahkan mematikan eksplan (Sinha *et al.* 2016). Mikroba endofit tersebut mampu bertahan pada beberapa siklus kultur *in vitro* tanpa menunjukkan gejala ataupun tanda-tanda yang dapat dilihat pada media tumbuh. Cara untuk mensterilkan mikroba endofit adalah dengan memberikan dua perlakuan tambahan sebelum sterilisasi di luar dan di dalam LAF, yaitu karantina kultur jaringan indukan bahan eksplan dan perendaman eksplan di dalam antibiotik selama minimal 24 - 48 jam dengan air beroksigen tinggi, dengan sistem aerator steril berfilter HEPA. Selain itu cara lain untuk mengatasi kontaminasi mikroorganisme endofitik, sumber eksplan bisa juga direndam selama 24 jam di dalam botol yang berisi larutan bakterisida dan fungisida. Pewarna jaringan ditambahkan ke dalam larutan tersebut hanya sebagai indikator bahwa larutan tersebut secara fisiologis sudah diserap oleh eksplan sehingga daun menjadi berwarna merah (Gambar 22). Secara fisiologis tanaman memiliki sistem transportasi yang mengalirkan air dan garam mineral

(ion-ion) dari tanah yang diserap oleh akar, dan dialirkan ke berbagai aerial tanaman melalui batang. Hal ini menggambarkan terjadinya proses transportasi intravaskuler yang merupakan pengangkutan air dan zat hara melalui pembuluh angkut yaitu xylem dan floem. Proses pengangkutan dalam pembuluh ini terjadi secara vertikal yang berarti pengangkutan air ke daun melalui pembuluh xylem, sedangkan pengangkutan hasil fotosintesis dari daun ke seluruh bagian tumbuhan dilakukan oleh pembuluh floem.



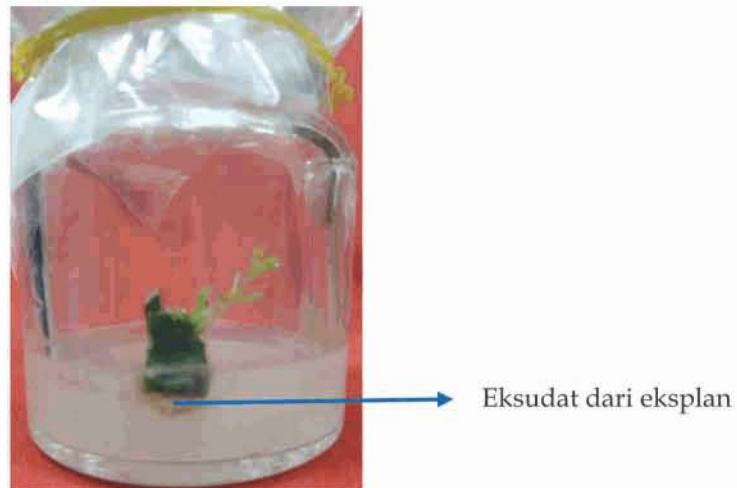
Gambar 22 Perendaman eksplan di dalam bakterisida dan fungisida selama 24 jam

Menurut Kekuda (2016), pada genus *Acacia* terdapat beberapa spesies bakteri endofit *Actinomycetes* yaitu *Streptomyces*, *Actinoallomurus*, *Amycolatopsis*, *Kribbella* dan *Microbispora*. Penelitian Wolf (2007) menunjukkan bahwa bakteri yang sering muncul pada kultur *in vitro* adalah *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, dan *Xanthomonas*.

Pada tanaman hias *Cantharanthus roseus*, jenis-jenis kontaminan kultur yang mengganggu adalah *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, dan *Sacharomyces* (Oratmangun *et al.* 2017). Bakteri kontaminan juga sering mengganggu kultur tanaman bunga Krisan. Gangguan tersebut bersifat tanpa gejala. Kultur tanaman bunga Krisan terlihat bebas bakteri. Namun setelah diteliti dengan menggunakan primer PCR berbasis gen 16S rRNA, ternyata terdapat beberapa genera utama yang menyebabkan kontaminasi tanaman bunga Krisan, yaitu *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Erwinia/Enterobacter* dan *Xanthomonas* (Vazquez *et al.* 2014). Bakteri tersebut termasuk bakteri asimtomatik di dalam kultur jaringan tanaman *in vitro*.

Tipe kontaminasi yang lain adalah kontaminan yang berasal dari spora dan kristal/kapsul bakteri yang terdapat di dalam eksudat eksplan yang keluar dari sel/jaringan dan mengkontaminasi media kultur (Gambar 23). Eksudat adalah zat kimia yang keluar dari tanaman dan berfungsi sebagai mekanisme perlindungan. Eksudat keluar dari eksplan ketika jaringan tanaman terluka akibat pemotongan atau perlakuan bahan kimia. Keluarnya eksudat merupakan reaksi fisiologis yang terjadi pada sel tanaman di sekitar luka. Di samping itu, kontaminasi mikroorganisme dapat menyerang eksplan melalui luka-luka akibat pemotongan

dan penanganan pada tahap sterilisasi. Dengan demikian, jaringan eksplan terkontaminasi dari luka tersebut. Selanjutnya, mikroba yang terdapat di dalam eksplan akan keluar dan mengkontaminasi media.

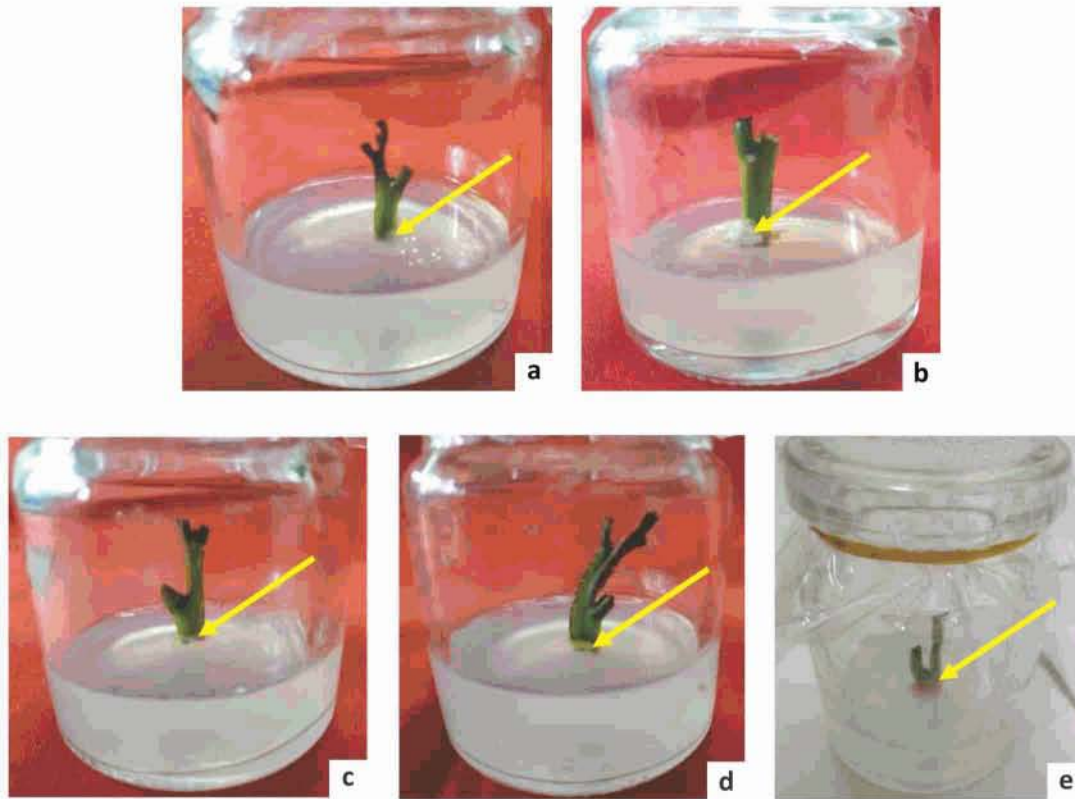


Gambar 23 Eksudat eksplan yang keluar dari sel/jaringan dan mengkontaminasi media kultur

Kontaminasi eksternal disebabkan oleh media kultur yang kurang steril, organisme kecil, botol kultur dan alat diseksi yang kurang steril, lingkungan kerja dan ruangan kultur yang kurang steril, serta kecerobohan teknisi dalam melaksanakan kegiatan mikropropagasi. Kontaminasi eksternal dapat diatasi dengan cara pencucian (sterilisasi) menggunakan berbagai agen sterilan/disinfektan, seperti NaOCl dan etanol/alkohol. Senyawa NaOCl sering digunakan sebagai disinfektan karena berpotensi untuk membunuh bakteri endofit atau mencegah bakteri endofit membentuk koloni (Kekuda 2016). Etanol/alkohol merupakan agen sterilan yang kuat, namun bersifat fitotoksik terhadap sel tumbuhan. Dalam konsentrasi tinggi, etanol dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan. Jadi, untuk mencegah kontaminasi, agen sterilan/disinfektan yang digunakan harus kuat untuk mengeliminasi kontaminasi tanpa merusak jaringan eksplan tanaman.

Kontaminasi yang sering terjadi pada kegiatan kultur jaringan tanaman terdiri dari 2 jenis yaitu kontaminasi oleh bakteri dan kontaminasi oleh fungi. Perbedaan kedua jenis kontaminasi dapat dilihat dari ciri-ciri fisik yang muncul pada eksplan dan media kultur jaringan.

Jika terkena kontaminasi bakteri maka tanaman akan berlendir di bagian bawah eksplan atau di permukaan media di sekitar eksplan. Selain itu, terdapat selaput bening yang membayang pada media dan berubah menjadi selaput berwarna putih (Gambar 24a), gumpalan putih (Gambar 24b), bening putih (Gambar 24c), kekuning-kuningan (Gambar 24d) dan merah (24e). Lendir dan selaput bening yang muncul di sekitar eksplan merupakan akibat dari bakteri yang langsung menyerang jaringan tumbuhan.



Gambar 24 Variasi kontaminasi bakteri pada eksplan *A. mangium* berupa (a) lendir, (b) gumpalan putih, (c) bening putih, (d) kuning, dan (e) merah

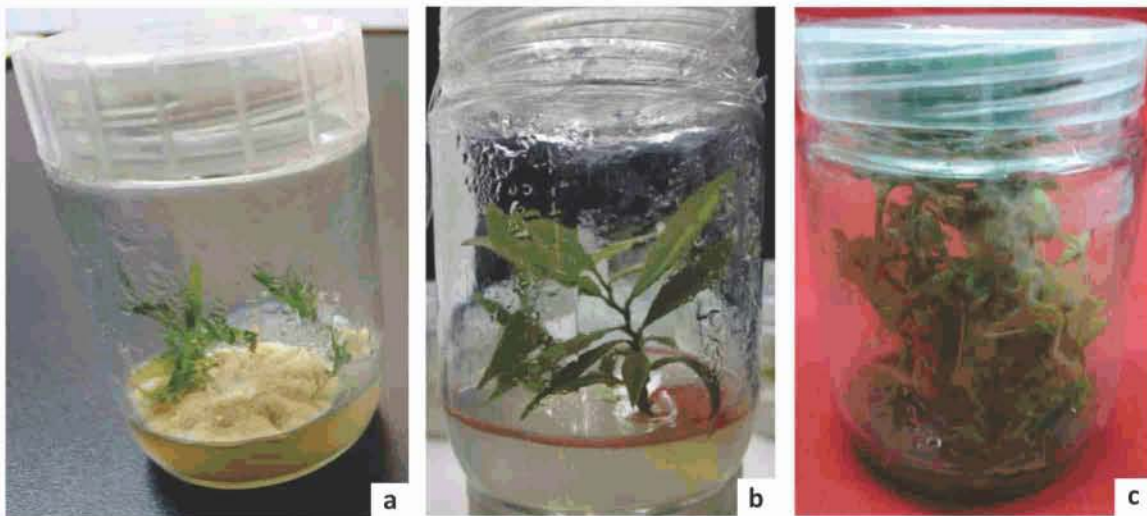
Kontaminasi fungi ditandai dengan terlihatnya hifa atau miselium (kumpulan hifa) pada media atau eksplan. Hifa atau miselium kontaminan biasanya berwarna putih, abu-abu sampai hitam (Gambar 25). Hifa atau miselium tersebut menyebar di sekeliling media dan menutupi seluruh permukaan eksplan, sehingga dapat menyebabkan kematian eksplan. Jika terkontaminasi oleh fungi, tanaman akan terlihat lebih kering.



Gambar 25 Variasi kontaminasi fungi pada eksplan *A. mangium*

Menurut Old *et al.* (1997) ada 11 jenis fungi yang biasa menyerang *A. mangium* di lapangan. Kesebelas fungi tersebut menyebabkan bintik hitam pada daun dan juga tumbuh di bagian dasar pohon. Kesebelas fungi tersebut yaitu *Altenaria alternata*, *Atelocauda digitata*, *Cercospora sp.*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Curvularia geniculata*, *Ganoderma shalceu*, *Glomerella cingulata*, *Nigrospora sphaerica*, *Oidium sp.*, *Pestalotiosissp.*, dan *Phomopsis sp.* Menurut Cassells *et al.* (2003), kontaminasi fungi pada kultur *in vitro* tanaman berkayu berasal dari beberapa spesies, yaitu *Penicillium*, *Aspergillus*, dan *Fusarium*. Menurut Damajanti *et al.* (2015), fungi yang menyerang kultur *in vitro* adalah jenis *Mucor* dan *Rhizopus* dengan ciri morfologi berupa hifa yang berbentuk seperti benang berwarna putih hingga hitam kelabu, dengan sporangium yang tampak pada eksplan.

Kontaminasi dapat juga terjadi pada tahap *plantlet*, seperti yang terjadi pada tanaman anggrek (Gambar 26a), gaharu (Gambar 26b), dan krisan (Gambar 26c).



Gambar 26 Contoh kontaminasi (a) fungi pada *plantlet* anggrek, (b) bakteri pada *plantlet* gaharu, dan (c) fungi pada *plantlet* krisan

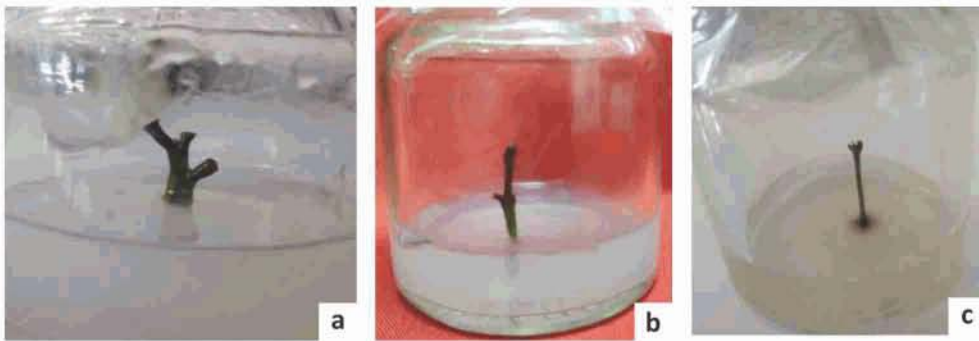
Kontaminasi di dalam proses kultur jaringan dapat dievaluasi dan dianalisis berdasarkan penyebabnya, antara lain:

1. Kontaminasi yang terjadi setelah 1 - 3 hari tanam dikelompokkan menjadi dua bagian yaitu:
 - a. Kontaminasi yang menempel pada eksplan. Kontaminasi tersebut terjadi akibat proses sterilisasi eksplan yang masih kurang baik atau eksplan masih mengandung mikroba yang berasal dari dalam eksplannya.
 - b. Kontaminasi yang terjadi pada media tumbuh, tetapi tidak menempel pada eksplan. Kontaminasi tersebut diakibatkan oleh cara kerja yang kurang steril pada saat penanaman, sehingga masih masuk mikroba pada saat proses penanaman.

2. Kontaminasi yang terjadi sekitar 1 minggu atau satu bulan berikutnya, padahal awal mulanya eksplan sudah steril, dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu:
 - a. Kontaminasi yang menempel pada eksplan. Kontaminasi ini terjadi akibat kontaminasi sistemik yang berasal dari dalam eksplan tersebut.
 - b. Kontaminasi yang terjadi pada media tumbuh, tetapi tidak menempel pada eksplan. Kontaminasi tersebut diakibatkan oleh bocornya atau kurang rapatnya penutupan botol kultur, sehingga mikroba masuk ke dalam botol dan mengkontaminasi media.
3. Kontaminasi yang terjadi setelah proses subkultur, padahal sebelumnya tidak ada kontaminan dan *Standard Operational Procedure* (SOP) penanaman sudah dilakukan dengan cara yang baik dan benar. Kontaminasi yang demikian ini disebabkan oleh kontaminasi sistemik yaitu kontaminasi yang berada dari dalam eksplan. Pada kasus seperti ini, mikroba yang ada di dalam sel atau jaringan eksplan tidak sempat keluar pada saat masa inisiasi eksplan. Demikian pula, luka eksplan akibat pemotongan di masa inisiasi sudah kering dan sembuh, sehingga mikroba masih tetap berada di dalam eksplan. Akan tetapi, ketika eksplan mengalami proses subkultur, maka luka yang dialami oleh eksplan akibat pemotongan membuat mikroba berkesempatan untuk kembali mengkontaminasi media tumbuh.

Selain mengalami kontaminasi, eksplan dapat mengalami *browning* pada tahap sterilisasi. *Browning* pada eksplan dapat disebabkan oleh penggunaan agen sterilan yang digunakan untuk menghambat perkembangan mikroorganisme. Biasanya, *browning* terjadi karena konsentrasi agen sterilan, seperti NaOCl, yang terlalu tinggi atau terlalu lama waktu perendaman di dalam larutan disinfektan. Proses terjadinya *browning* disebabkan oleh proses oksidasi fenolik dari eksplan yang terluka. Akibatnya, terbentuk zat yang disebut Quinon yang berwarna cokelat dan bersifat antiseptik, sebagai pertahanan diri dari suatu tanaman agar tidak terinfeksi (Gambar 27a). *Browning* tidak hanya terjadi pada sebagian eksplan (Gambar 27b), tapi juga bisa tersebar pada media di sekitar eksplan (Gambar 27c).

Browning dapat menghambat pertumbuhan eksplan dan menurunkan fungsi fisiologis dari eksplan, sehingga eksplan dapat mengalami kematian. Eksplan yang mengalami *browning* sebagian di ujung-ujungnya masih bisa diselamatkan dengan melakukan pemotongan bagian yang berubah warna. Namun, jika eksplan yang mengalami *browning* sudah berwarna cokelat kehitaman secara keseluruhan atau gosong, berarti eksplan sudah mati dan tidak dapat diselamatkan.



Gambar 27 Contoh *browning*: (a) pada seluruh eksplan *A. mangium*; (b) pada bagian atas eksplan; dan (c) tersebar pada media di sekitar eksplan

Media kultur jaringan yang digunakan untuk aktivitas inisiasi dan subkultur di laboratorium bioteknologi mengandung unsur hara makronutrien, mikronutrien, vitamin, gula yang didestruksi, dan kemudian dibuang sebagai limbah. Limbah dari media ini sangat cepat ditumbuhi oleh mikroorganisme karena komposisi nutrisinya hampir sama dengan komposisi untuk pertumbuhan bakteri atau fungi. Dengan demikian, dikhawatirkan limbah dari media kegiatan kultur jaringan ditumbuhi oleh mikroorganisme yang bersifat patogen dan mengganggu kesehatan lingkungan di sekitar laboratorium. Oleh karena itu, media yang sudah terpakai di dalam kegiatan kultur jaringan harus segera ditangani. Selain itu, limbah media tersebut menghasilkan aroma yang mengganggu jika disimpan dalam waktu lama.

Tujuan

Praktikan memahami prosedur pemusnahan *retain* (sisa sampel) dan media yang terkontaminasi pada kegiatan kultur jaringan.

Alat:

- a. Autoklaf.
- b. Wadah/keranjang.
- c. Sikat botol.
- d. Wadah penyaring sampah.
- e. Cawan Petri.
- f. Tabung reaksi.
- g. Botol kultur.

Bahan:

- a. Plastik.
- b. Air bersih yang mengalir.
- c. Sabun.
- d. Sisa sampel/limbah sampel

Instruksi Latihan:

1. Cawan Petri, tabung reaksi, *microtube*, atau sisa sampel dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat dengan karet agar tidak mengotori autoklaf. Sedangkan botol-botol kultur yang terkontaminasi bisa langsung dimasukkan ke dalam autoklaf.



2. Lakukan sterilisasi terhadap alat-alat dan limbah sampel/sisa sampel yang terkontaminasi dengan autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121 °C dan tekanan 15 psi.



3. Bahan padat seperti agar-agar dan sisa-sisa eksplan yang telah disterilkan dengan autoklaf, harus disaring terlebih dahulu agar tidak menyumbat saluran air dan tidak menjadi sumber kontaminasi baru, ketika dibuang ke tempat pembuangan. Selain itu, pisahkan limbah bekas media agar-agar dan eksplan dari limbah plastik dan buanglah di tempat yang berbeda.



- Cucilah botol, tabung reaksi, dan cawan Petri dengan sabun cuci (detergen) dan sikat botol.



- Bilas sabun cuci dengan menggunakan air mengalir (a) dan tiriskan botol-botol, cawan Petri dan tabung reaksi setelah bersih (b).



- Keringkan tabung reaksi, cawan Petri, dan botol di bawah sinar matahari atau di dalam oven.
- Peralatan yang sudah bersih dan kering, kemudian disterilkan kembali dengan autoklaf.
- Alat-alat yang sudah steril bisa digunakan untuk kegiatan kultur jaringan.
- Simpan botol dan peralatan lain yang tidak dipakai di dalam lemari besi agar tidak berdebu.

Catatan:

BAB 15 AKLIMATISASI

Pendahuluan

Aklimatisasi adalah proses pemindahan *plantlet* dari lingkungan *in vitro* yang terkontrol di dalam botol kultur yang berkondisi aseptik dan heterotrof ke kondisi lingkungan *ex vitro* di luar botol kultur yang tidak terkendali dan autotrof, baik dalam hal suhu, kelembaban udara maupun intensitas cahaya. Aklimatisasi merupakan tahap terakhir dari kegiatan kultur jaringan sebagai upaya untuk menyesuaikan *plantlet* dengan lingkungan alami di luar botol kultur.

Plantlet tanaman yang diaklimatisasi haruslah *plantlet* yang sudah memiliki organ utama lengkap, yaitu memiliki daun, batang dan akar. Salah satu keberhasilan kegiatan kultur jaringan adalah memindahkan *plantlet* dari lingkungan *in vitro* ke lingkungan luar (*ex vitro*). Proses pemindahan secara langsung dapat menyebabkan tingginya jumlah kematian *plantlet*, karena lingkungan luar memiliki kondisi yang berbeda dengan lingkungan laboratorium yang terkontrol.

Ketika suatu *plantlet* tanaman *in vitro* terekspos, *plantlet* dapat mengalami tekanan biotik dan abiotik. Tekanan biotik merupakan kondisi lingkungan yang septic dan mengandung banyak mikroba yang menyebabkan *plantlet* tanaman perlu membentuk pertahanan untuk bertahan hidup. Tekanan abiotik berasal dari perbedaan intensitas cahaya, suhu, dan nutrisi dari lingkungan botol kultur yang menyebabkan *plantlet* tanaman perlu menyesuaikan diri dalam mengatur morfologi dan fisiologi *plantlet* tanaman.

Selain itu, ketika *plantlet* tanaman dikeluarkan ke lingkungan *ex vitro*, *plantlet* memerlukan adaptasi, baik secara morfologi maupun fisiologi. Perubahan morfologi yang terjadi di antaranya adalah penyempitan stomata, pelebaran daun dan pembentukan kloroplas yang lebih baik. Perubahan morfologi tersebut menyebabkan perubahan fisiologi, di antaranya perubahan sifat *plantlet* dari heterotrof menjadi autotrof, peningkatan produksi hormon ABA, perubahan metabolisme untuk mencegah tekanan abiotik dan biotik, serta penebalan dinding sel. Perubahan fisiologi tersebut menyebabkan *plantlet* tidak mengalami dehidrasi, meningkatkan kemampuan metabolisme *plantlet*, memperbaiki fungsi akar untuk penyerapan unsur hara *ex vitro* dan meningkatkan kemampuan *plantlet* untuk beradaptasi dari lingkungan steril ke lingkungan yang kurang aseptik dengan adanya mikroorganisme. Adaptasi kemampuan yang juga sangat penting dan harus terjadi pada *plantlet* adalah kemampuan *plantlet* untuk meningkatkan laju fotosintesis dan laju penyerapan unsur hara agar *plantlet* dapat bertahan hidup setelah dikeluarkan dari dalam botol kultur. *Plantlet* tanaman *in vitro* memiliki ukuran daun yang lebih kecil daripada ukuran daun pada saat berada di dalam lingkungan *ex vitro*. Selain itu, kelembaban udara pada kondisi *in vitro* lebih tinggi dari pada kelembaban udara pada kondisi *ex vitro*, sehingga daun *in vitro* tidak membentuk lapisan lilin dalam jumlah normal. Keadaan ini menyebabkan daun *plantlet in vitro* akan cepat mengering pada saat dikeluarkan dari botol kultur.

Oleh sebab itu, *plantlet* perlu menjalani tahap aklimatisasi sebelum ditanam di lapangan, sebagai upaya adaptasi *plantlet* terhadap lingkungan baru. Biasanya, jika *plantlet* tidak diaklimatisasi terlebih dahulu, maka *plantlet* tidak akan dapat bertahan di kondisi lapangan. Selain itu, tahap aklimatisasi juga dilakukan untuk mengetahui daya tahan *plantlet* yang akan dijadikan tanaman induk dan diharapkan dapat memproduksi tinggi serta bertahan hidup di lingkungan yang kurang aseptik. Tahap aklimatisasi terdiri dari 3 bagian, yaitu 1. normalisasi hormonal; 2. *in vitro hardening*; dan 3. aklimatisasi akhir.

Normalisasi hormonal adalah bagian pertama dari tahap aklimatisasi di mana *plantlet* tanaman dilatih untuk menghasilkan hormon secara mandiri, sehingga *plantlet* tanaman tidak kaget ketika dikeluarkan dari botol kultur akibat tidak adanya hormon yang memadai pada saat aklimatisasi. Normalisasi hormonal dilakukan dengan cara melakukan subkultur *plantlet* dari media induksi yang mengandung hormon ke media kontrol yang tidak mengandung hormon. Namun, jika media kultur *plantlet* sudah dibuat tanpa mengandung hormon, maka *plantlet* bisa langsung masuk ke tahap selanjutnya, yaitu *in vitro hardening*.

In vitro hardening adalah upaya penguatan *plantlet* tanaman hasil kultur jaringan dengan cara memberikan perlakuan pra-aklimatisasi pada *plantlet* yang masih berada di dalam botol kultur untuk meningkatkan keberhasilan aklimatisasi. *In vitro hardening* dilakukan dengan cara meletakkan botol kultur berisi *plantlet* di dalam *greenhouse* agar *plantlet* dapat menyesuaikan diri dengan fluktuasi suhu dan kelembaban udara harian serta radiasi sinar matahari, sehingga dinding sel *plantlet* akan lebih kuat dan *plantlet* terlatih untuk bermetabolisme tinggi. Di dalam *in vitro hardening*, kelembaban udara masih terkontrol, ketersediaan makanan masih terjamin, dan kondisi masih steril karena *plantlet* masih berada di dalam botol kultur, sehingga tidak ada serangan mikroba. *In vitro hardening* yang dilakukan pada *plantlet* hasil kultur jaringan tanaman akan membuat bibit tanaman memiliki vigor yang lebih baik, daun yang lebih hijau, tanaman yang lebih kokoh dengan persentase hidup *plantlet* yang lebih tinggi.

Saat aklimatisasi akhir, *plantlet* tanaman tidak secara langsung berhadapan dengan lingkungan luar karena *plantlet* tanaman masih ditutupi sungkup. Sungkup ini berguna untuk melindungi *plantlet* tanaman dari ekspos terlalu banyak terhadap udara luar dan dari serangan hama penyakit. Setelah *plantlet* tanaman dapat beradaptasi, maka secara bertahap sungkup dilepas, kemudian *plantlet* tanaman yang telah bertumbuh menjadi bibit tanaman dipelihara dengan cara yang sama dengan pemeliharaan bibit generatif.

Salah satu tempat yang biasa digunakan untuk tahap aklimatisasi adalah *greenhouse* (rumah kaca). *Greenhouse* dirancang beratap kaca dan ber dinding kasa aluminium untuk mencegah masuknya hama serangga yang dapat membawa penyakit atau merusak tanaman. *Greenhouse* juga dilengkapi dengan bukaan ventilasi di bagian bubungan agar udara dari dalam *greenhouse* dapat mengalir ke luar secara lancar dan dapat pula dilengkapi kipas angin, yang dinyalakan hanya pada pagi dan sore saja. Perlu diperhatikan pula tersedianya parit pembuangan air limbah dari penyiraman di dalam *greenhouse*. Suhu dan kelembaban udara di

dalam *greenhouse* lebih tinggi daripada suhu dan kelembaban udara di luar *greenhouse*. Oleh sebab itu, untuk mencegah kematian *plantlet* tanaman pada saat tahap aklimatisasi di dalam *greenhouse*, maka penurunan suhu dan kelembaban udara dilakukan secara bertahap dan perlahan-lahan.

Setelah aklimatisasi akhir selesai dan *plantlet* tanaman bertumbuh menjadi bibit tanaman, maka dilakukan aklimatisasi *ex vitro* dengan menggunakan media tanam berupa *potting mix*. Selain itu, media tanam juga dilengkapi dengan substrat berupa tanah gembuk, perlit, pasir, vermikulit, arang sekam, eceng gondok, dan sabut kelapa. Selain menggunakan substrat, aklimatisasi *ex vitro* juga dapat dilakukan dengan mengatur kelembaban udara dan pemberian senyawa retardan.

Vermikulit yang ditambahkan sebagai substrat mengandung aluminosilikat yang terhidrasi (Hugget 2015). Vermikulit bertujuan untuk mempersiapkan akar agar kuat sebelum ditanam dalam tanah. Menurut Yunida (2019), pembentukan akar (panjang dan jumlah akar) sangat penting karena kondisi perakaran menentukan keberhasilan aklimatisasi *plantlet*, baik aklimatisasi *in vitro* di rumah kaca maupun aklimatisasi *ex vitro* di lapangan, serta penanaman bibit tanaman di lapangan. Jumlah akar dan kecepatan pertumbuhan akar dipengaruhi oleh komposisi media tanam, zat pengatur tumbuh (ZPT) yang ditambahkan pada media tanam, sumber eksplan yang sesuai, dan cara aklimatisasi yang tepat (Ridhawati *et al.* 2017).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aklimatisasi antara lain:

- a. Kondisi *plantlet* saat diaklimatisasi: *plantlet* yang digunakan harus sehat, terhindar dari serangan hama dan penyakit. Aklimatisasi *plantlet* tanpa akar akan membutuhkan waktu aklimatisasi yang lebih lama dibandingkan dengan *plantlet* yang sudah mempunyai akar pada saat diaklimatisasi.
- b. Media aklimatisasi: media tersebut harus dapat mensuplai oksigen dan air yang cukup untuk daerah perakaran. Dengan demikian wadah aklimatisasi harus memiliki drainase yang baik.
- c. Lingkungan aklimatisasi: harus lingkungan yang optimal untuk mempertahankan hidupnya.
- d. Kelembaban udara: tanaman akan kehilangan banyak air karena penguapan melalui daun. Oleh karena itu, perlu dilakukan penyungkupan, hingga daun mengalami penebalan dinding sel secara bertahap dengan adanya radiasi sinar matahari yang meningkat saat aklimatisasi. Tanaman melakukan penyesuaian dari kelembaban udara tinggi ke kelembaban udara rendah dengan cara mengendalikan kehilangan air melalui perbaikan fungsi kutikula, stomata dan pembentukan lapisan lilin.
- e. Cahaya: digunakan untuk fotosintesis agar tersedia suplai makanan yang cukup untuk membentuk jaringan baru yang akan menjadi tunas dan akar. Intensitas cahaya yang terlalu rendah akan membuat *plantlet* tanaman lambat membentuk akar. Namun, intensitas cahaya yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan *plantlet* menjadi stres. Pemberian naungan

merupakan cara untuk menurunkan intensitas cahaya dan suhu udara. Selain itu, naungan juga bertujuan untuk mempertahankan kelembaban udara agar tetap tinggi.

- f. Suhu udara: suhu udara harus selalu dijaga pada tingkat optimal untuk membantu proses pertumbuhan *plantlet*, tetapi tidak membuat *plantlet* tanaman kehilangan kelembaban udara.

Tujuan

Praktikan dapat melakukan aklimatisasi *plantlet* hasil kultur jaringan di *greenhouse*.

Alat:

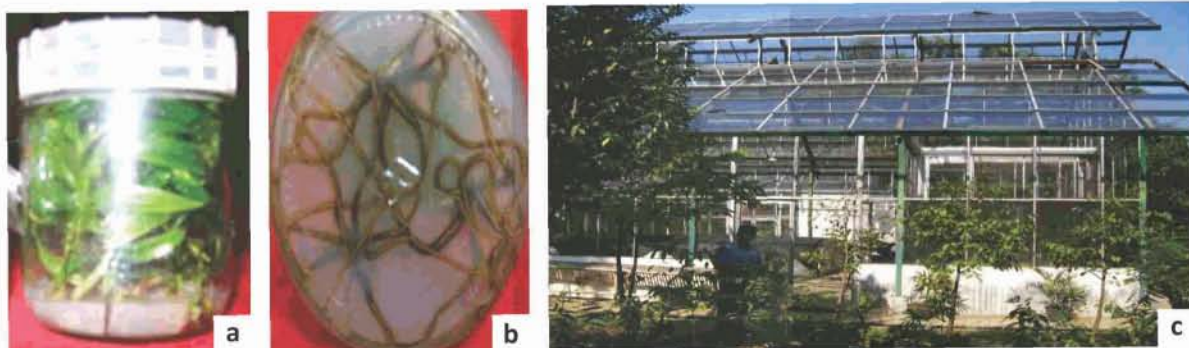
- a. Bak plastik.
- b. Pinset.
- c. *Sprayer*.
- d. Gunting

Bahan:

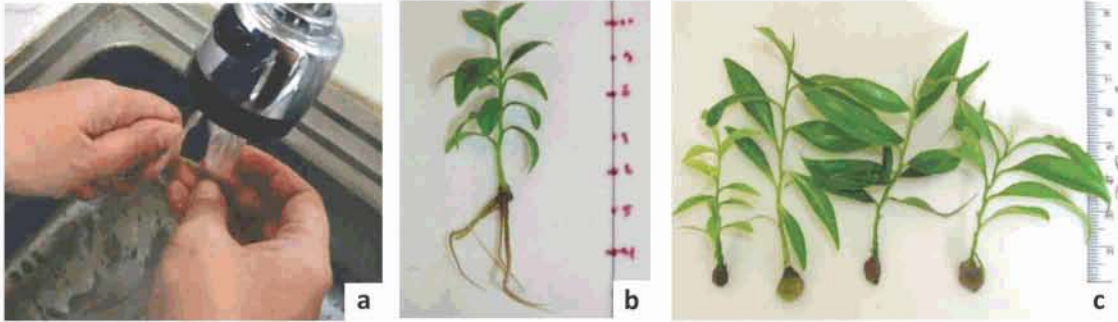
- a. Media aklimatisasi.
- b. Paranet.
- c. Karet.
- d. Sungkup plastik.
- e. *Plantlet* gaharu.
- f. Bakterisida.
- g. Fungisida.
- h. Air.

Instruksi Latihan:

1. Setelah proses *hardening*, lakukan aklimatisasi pada *plantlet* yang sudah mengalami elongasi (a), berakar (b) di *greenhouse* (c).



2. Bersihkan *plantlet* dengan cara mengeluarkannya dari botol kultur dan dicuci dengan air mengalir sampai bersih hingga tidak ada lagi media kultur yang menempel, karena media kultur bisa menjadi sumber kontaminasi (a). *Plantlet* yang berakar yang sudah bersih dari media kultur (b), *plantlet* berkalus yang sudah bersih dari media *in vitro* (c)



3. Rendam *plantlet* di dalam bak plastik yang berisi larutan fungisida 2 g/L dan bakterisida 2 g/L selama ± 20 menit. Jika *plantlet* bergerombol pisahkan dengan menggunakan gunting yang sudah disemprot alkohol 70%.



4. Ayak media tanam pasir : tanah (1 : 1), sehingga strukturnya menjadi seragam dan halus untuk menghindari kerusakan akar. Kemudian masukkan media tanam ke dalam karung dan kemudian disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf (a) atau dikukus di dalam drum dengan menggunakan kompor gas semawar selama ± 7 jam (b). Sebelum media digunakan, diamkan selama semalam agar media aklimatisasi menjadi dingin. Jika media tanam yang dibutuhkan dalam jumlah banyak, maka sterilisasi dengan drum akan lebih efektif.



- Siapkan bak plastik yang telah dilubangi bagian bawahnya agar air tidak menggenang (a); lalu masukkan media tanam yang sudah steril dan dingin ke dalam bak plastik tersebut dengan tinggi media maksimal 2 cm. Media tanam dapat juga dimasukkan ke dalam gelas plastik (b). Selanjutnya media tanam disemprot dengan fungisida dan bakterisida.

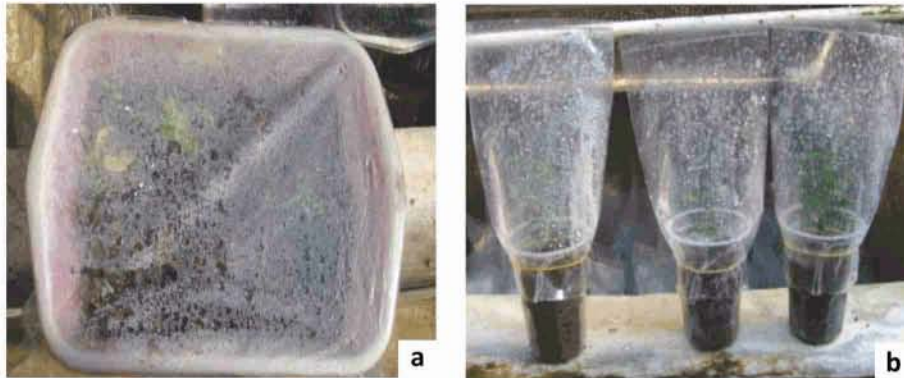


- Siapkan hormon penumbuh akar rootone F yang ditambahi dengan sedikit air (a), kemudian aduk sehingga berbentuk pasta (b). Jika *plantlet* belum berakar tetapi berkalus, maka kalus yang ada pada pangkal *plantlet* dibuang dengan cara dipotong menggunakan *scalpel*/gunting (c). Selanjutnya, ujung pangkal tunas *plantlet* dicelupkan ke dalam pasta penumbuh akar (d).



- Tanam satu persatu *plantlet* ke dalam bak plastik dengan jarak sekitar 5 x 5 cm. Jika menggunakan gelas plastik, maka ke dalam setiap gelas ditanamkan satu *plantlet*, kemudian semprot dengan fungisida dan bakterisida. Agar penanaman *plantlet* seragam berdasarkan ukuran tinggi *plantlet*, maka *plantlet* yang tinggi ditanam di dalam bak yang terpisah dengan *plantlet* yang pendek.

8. Tutup bak plastik yang telah ditanami *plantlet* dengan plastik bening yang sudah disemprot dengan larutan fungisida dan bakterisida, serta diikat dengan tali atau karet (a). Jika aklimatisasi dilakukan dengan menggunakan gelas plastik, maka tutup setiap gelas yang telah ditanami *plantlet* dengan plastik bening yang telah disemprot dengan larutan fungisida dan bakterisida (b). Tiap-tiap bak aklimatisasi diberi label keterangan yang memuat tanggal aklimatisasi, jumlah *plantlet*, dan jenis *plantlet*.



9. Letakkan bak/gelas plastik yang berisi *plantlet* ke dalam sungkup plastik dan paranet 70%. Bak ditutup/disungkup agar *plantlet* tidak terkena cahaya matahari secara langsung dan agar kelembaban udara tetap tinggi. Sungkup ditutup oleh tiga lapis yaitu plastik, kawat dan paranet.



10. Kontrol dan pelihara tanaman selama di dalam sungkup. Perhatikan kondisi tanaman agar kelembaban udara terjaga. Jika uap air di permukaan bawah plastik bening penutup bak telah berkurang, maka berarti media tanam sudah kering.
11. Siram secara berkala jika media tanam terlihat kering dan segera buang *plantlet* yang mati atau terkontaminasi agar tidak menjadi sumber kontaminasi bagi *plantlet* yang lain.
12. Semprotkan fungisida, bakterisida, dan insektisida untuk mengantisipasi serangan fungi, bakteri, dan hama serangga setiap 2 minggu - 1 bulan.

13. Buka plastik bening penutup *plantlet* secara bertahap.



14. Akar *plantlet* pasca aklimatisasi (a) dan pindahkan *plantlet* ke dalam *polybag* setelah umur *plantlet* mencapai 2 - 3 bulan (b).



BAB 16 PEMANFAATAN TEKNOLOGI KULTUR JARINGAN

Pendahuluan

Perkembangan teknologi budidaya tanaman di Indonesia menghendaki pembiakan tanaman agar dapat dilakukan dengan teknik mikropropagasi *in vitro*. Tujuannya adalah: 1. mendukung konservasi *ex situ* bagi spesies tanaman langka dan rentan serta tanaman yang bernilai ekonomi tinggi; dan 2. mendukung perbanyakan klon unggul secara massal hasil pemuliaan tanaman pada area yang lebih sempit, dengan tenaga kerja yang lebih terbatas, curahan waktu yang lebih sedikit, dan dana yang lebih hemat.

Contoh pemanfaatan teknologi kultur jaringan dengan menggunakan kandungan metabolit sekunder antara lain kultur jaringan pada kalus *Elephantopus scaber* L. (tapak liman) yang mengandung flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan saponin (Maya 2019). Penelitian Faizurrahmi (2020) menunjukkan bahwa induksi alkaloid kalus johar (*Senna siamea* Lam.) dengan pemberian beberapa prekursor tirosin mampu meningkatkan kadar cassiarin A (alkaloid). Pengembangan secara *in vitro* kakao tahan *Vascular Streak Dieback* (VSD), di mana VSD merupakan penyakit penting pada tanaman cokelat yang menyebabkan kerugian 30 - 45% dari produksi cokelat (Harni *et al.* 2020).

Pemanfaatan teknologi kultur jaringan di bidang pemuliaan di antaranya percobaan teknik sambung mikro (*micrografting*) secara *in vitro* pada tanaman manggis (Handayani 2012), kina (Toruan-Mathius *et al.* 2007), protea (Wu *et al.* 2007), dan jeruk (Singh *et al.* 2008). Sobhana *et al.* (2001) mempelajari aspek fisiologis dan biokimia dari interaksi antara batang atas dan batang bawah pada tanaman *Hevea brasiliensis*, dan menemukan bahwa laju asimilasi batang atas dipengaruhi oleh jenis batang bawah yang digunakan dalam penyambungan. Perubahan kandungan gula total, gula reduksi, fenol dan asam amino pada batang atas, juga mempengaruhi batang bawah.

Pada teknologi kultur jaringan ada risiko mutasi yang menyebabkan terjadinya variasi genetik atau variasi somaklonal. Variasi genetik merupakan komponen esensial bagi program pemuliaan untuk memperbaiki karakteristik tanaman. Variasi yang dihasilkan menggunakan siklus kultur jaringan dikenal dengan istilah variasi somaklonal.

Variasi somaklonal adalah variasi genetik tanaman yang berasal dari kultur somatik seperti sel daun, sel akar, dan lain-lain. Variasi tersebut dapat berasal dari variasi genetik eksplan dan variasi genetik yang terjadi di dalam kegiatan kultur jaringan. Variasi genetik eksplan disebabkan oleh sel-sel yang bermutasi (mutan) dan adanya polisomatik dari jaringan tertentu.

Variasi genetik yang terjadi di dalam kegiatan kultur jaringan *in vitro* disebabkan oleh penggandaan jumlah kromosom (fusi, endomitosis), perubahan struktur kromosom (pindah silang, mitosis, atau somatik), perubahan gen dan perubahan sitoplasma. Dengan demikian, teknologi kultur jaringan dapat menseleksi genotipe yang berguna bagi pemuliaan tanaman.

Melalui teknik kultur jaringan *in vitro* terdapat dua hal yang berbeda kepentingannya bagi pemuliaan tanaman, yaitu mempertahankan kestabilan genetik dan merangsang variasi genetik. Kestabilan genetik dapat dicapai dengan mendorong sesingkat mungkin fase pertumbuhan tidak berdiferensiasi (fase kalus bebas), sedangkan variasi genetik dapat dicapai dengan fase tidak berdiferensiasi yang relatif panjang jangka waktunya.

Ada tiga cara untuk mendapatkan variasi somaklonal, yaitu regenerasi langsung, kultur sel tunggal, dan kultur protoplasma. Pada tanaman hias, variasi sangat diharapkan terjadi dan tergantung pada tujuan yang diinginkan. Mutasi, variasi genetik dan variasi somaklonal bisa berperan ganda pada tanaman tertentu.

Variasi somaklonal dapat ditingkatkan dengan mengaplikasikan mutagen pada eksplan secara: 1. fisika menggunakan sinar X, sinar gamma (γ), iradiasi ultraviolet (UV), dan neutrons (N^0); 2. kimia menggunakan EMS (*ethyl methanesulfonate*), DES (*diethylsulfate*), EI (*ethylenimine*), NMUT (*N-nitroso-N-methyl urethane*), NMU (*N-nitro-N-ethyl urea*), NEUT (*N-nitroso-N-ethyl urethane*) dan NEU (*N-nitrose-N-ethyl urea*). Penanganan yang sangat berhati-hati harus diterapkan saat menggunakan senyawa-senyawa ini karena bersifat karsinogenik.

Pengaplikasian mutagen pada eksplan lebih baik daripada pengaplikasian mutagen pada kalus karena pemberian mutagen pada eksplan akan menghasilkan mutan utuh (*solid mutant*), sedangkan pemberian mutagen pada kalus menghasilkan mutan parsial (*chimeric mutant*). *Non chimeric*/mutan utuh mempunyai nilai di dalam perbaikan tanaman. *Chimeric mutant* banyak terjadi pada tanaman bunga dan tanaman hias daun. Salah satunya adalah tanaman variegata.

Variegata adalah bagian dari suatu tanaman yang memiliki perbedaan warna dengan warna aslinya dan pada umumnya warna yang berbeda tersebut letaknya berdampingan pada satu bagian tubuh tanaman. Variegata dapat dilihat dalam bentuk bagian tanaman yang berwarna belang atau memiliki bercak warna yang berbeda dengan warna aslinya. Tanaman variegata bisa dibentuk dengan cara melakukan mutasi (perubahan genetik) atau bahkan dengan proses radiasi.

Di dalam dunia tanaman hias, tanaman variegata mempunyai nilai estetika dan nilai ekonomi yang lebih tinggi karena corak dan warna dari tanaman variegata memiliki daya tarik yang lebih dan terkadang langka, karena di luar kewajaran warna tanaman pada umumnya. Tanaman variegata dapat dibuat sendiri dengan menggunakan hormon/ZPT tanaman.

Variabilitas baru dan variasi genetik yang luas dapat ditingkatkan melalui induksi mutasi dengan menggunakan mutagen kimia seperti etil metan sulfonat (EMS). Faktor penyebab variasi genetik dalam kultur jaringan antara lain komposisi zat kimia yang terkandung dalam media kultur, jenis dan konsentrasi ZPT, sumber eksplan, lamanya masa pengkulturan (subkultur berulang), serta mutasi atau lingkungan terkendali yang mengalami gangguan. Salah satu metode variasi somaklonal yang banyak dimanfaatkan adalah seleksi *in vitro*. Metode tersebut lebih efektif dan efisien karena seleksi *in vitro* terfokus pada perubahan sifat yang diharapkan.

Untuk mendeteksi variasi genetik yang terjadi, maka perlu dilakukan evaluasi dengan menggunakan penanda genetik (marka molekuler). Salah satu teknik yang menggunakan marka molekuler adalah *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*.

Marka molekuler dapat digunakan untuk mengetahui variasi klon tanaman yang dikembangkan secara *in vitro* dan variasi tanaman yang secara morfologi hampir mirip.

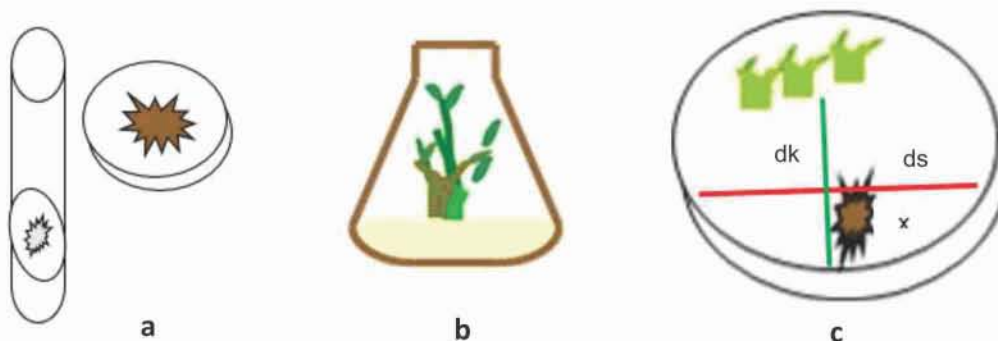
Subbab selanjutnya menjelaskan pemanfaatan teknik *in vitro*, di antaranya interaksi kultur ganda *in vitro*, *micrografting in vitro*, dan variasi genetik *plantlet in vitro* dengan marka molekuler RAPD.

Interaksi Kultur Ganda *In Vitro*

Tanaman menghasilkan berbagai jenis metabolit sekunder, namun kadarnya sangat rendah dan pembentukannya tergantung pada tahap perkembangan tanaman. Metabolit sekunder tanaman dapat diperoleh dengan mengekstrak tanaman utuh. Namun ekstraksi metabolit sekunder sering menghadapi kendala karena keterbatasan jumlah pasokan serta besarnya biaya yang dibutuhkan untuk purifikasi. Kultur *in vitro* merupakan alternatif yang efisien untuk memproduksi metabolit sekunder dengan berbagai keuntungan, antara lain:

- Dapat membentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat.
- Bebas dari kontaminasi mikroba.
- Setiap sel dapat dihasilkan untuk memperbanyak senyawa metabolit sekunder tertentu.
- Pertumbuhan sel teramati dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional.
- Tidak tergantung pada kondisi lingkungan, seperti keadaan geografi, iklim, dan musim.

Pembentukan resin gaharu berhubungan dengan mekanisme pertahanan tanaman, sebagai bagian dari proses patogenesis untuk membentuk metabolit sekunder. Salah satu pemanfaatan kultur *in vitro* dalam hal menginduksi metabolit sekunder tanaman dan uji potensi cendawan adalah Interaksi Kultur Ganda (IKG) pada gaharu jenis *Aquilaria* sp. (Gambar 28).



Gambar 28 Uji potensi fungi dan induksi metabolit sekunder tanaman dengan persiapan inokulum fungi yang sudah diremajakan dari: (a) tabung reaksi ke cawan Petri; (b) stok lini eksplan; dan (c) IKG

Interaksi Kultur Ganda (IKG) adalah salah satu cara untuk mempelajari sifat interaksi antara inang dengan mikroba dalam kondisi terkontrol. Di laboratorium, produksi metabolit sekunder dapat diinduksi oleh fungi sebagai bioelisor. Salah satu penginduksi komponen senyawa metabolit sekunder gaharu melalui IKG adalah *Acremonium* spp.

Keberhasilan proses infeksi oleh patogen pada inang dipengaruhi oleh 4 faktor penting, yaitu inang yang rentan, patogen yang virulen, lingkungan yang mendukung dan peranan manusia dalam memanipulasi kondisi lingkungan. Respons klon-klon tanaman terhadap infeksi suatu jenis patogen berbeda-beda.

Resin kayu gaharu yang sangat wangi adalah produk yang unggul mutunya dan sangat diminati. Tingkat kewangian resin gaharu berpengaruh pada nilai jual resin gaharu tersebut. Kebutuhan yang besar terhadap resin gaharu, menuntut produksi resin gaharu secara lestari. Tuntutan tersebut tidak dapat dipenuhi jika hanya mengandalkan proses alami. Oleh karena itu, usaha untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder gaharu melalui induksi buatan perlu dilakukan. IKG menggunakan MS_{mod} 50% menghasilkan resin gaharu yang memiliki skor wangi khas gaharu yang sangat wangi.

Kultur *in vitro* dapat dimanfaatkan untuk menyeleksi beberapa fungi potensial yang dapat menginduksi metabolit sekunder senyawa gaharu (Gambar 29). Selain itu, kultur *in vitro* dapat juga menguji lini-lini eksplan gaharu jenis *A. malaccensis* dengan 1 isolat *Acremonium* sp. (Gambar 30).



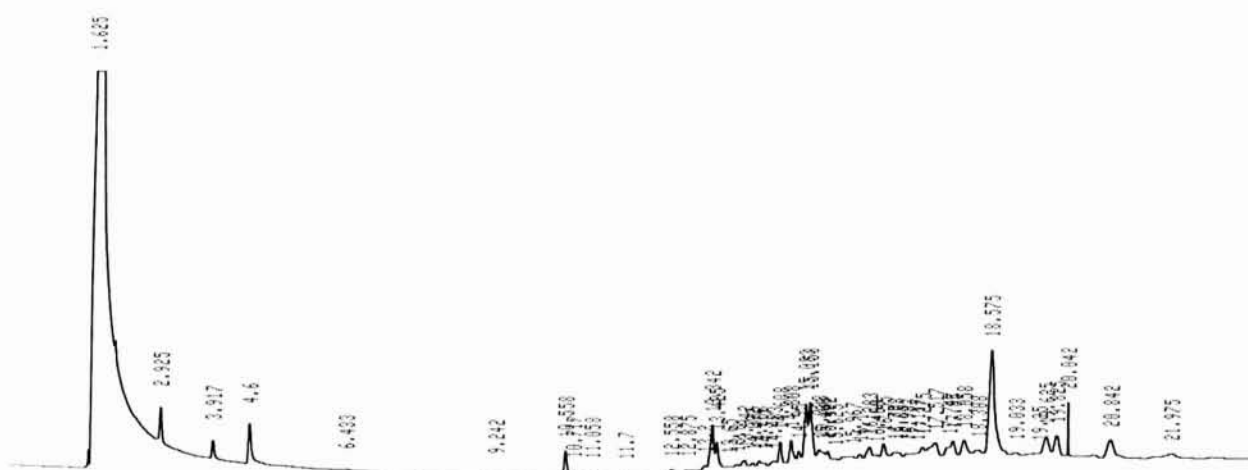
Gambar 29 Seleksi *in vitro* beberapa isolat *Acremonium* sp. (MP1, Sr3, Sr7 dan LM2) yang berpotensi menggunakan teknik Interaksi Kultur Ganda (IKG) dengan eksplan gaharu jenis *A. malaccensis*



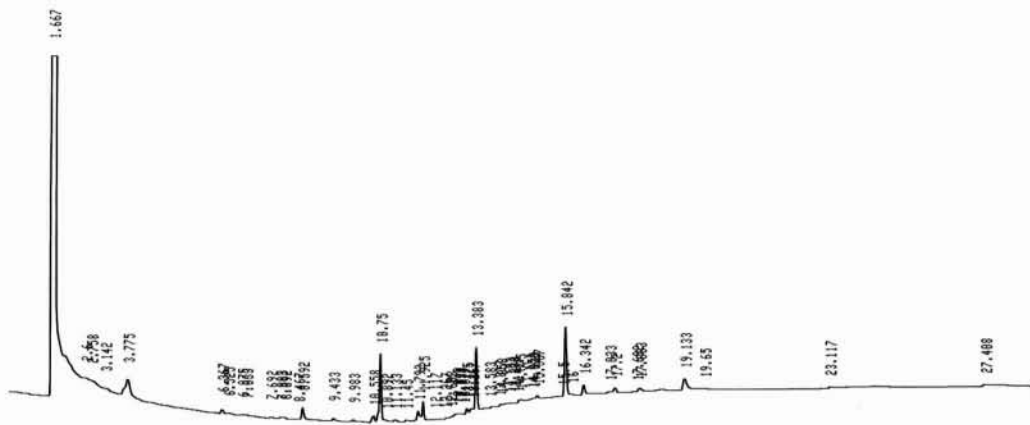
Gambar 30 Uji Interaksi Kultur Ganda (IKG) *in vitro* antara lini-lini eksplan gaharu jenis *A. malaccensis* dengan isolat *Acremonium* sp. strain F menunjukkan bahwa ada respons dengan eksplan gaharu jenis *A. malaccensis* yang diuji

Metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman dapat berupa beberapa senyawa. Akumulasi senyawa fenol pada tanaman mengindikasikan adanya reaksi pertahanan yang berhubungan dengan pelepasan senyawa fitoaleksin. Ada perbedaan beberapa komponen kimia antara gubal gaharu yang berkualitas tinggi dengan yang berkualitas rendah. Perbedaan ini terlihat jelas ketika kualitas gubal gaharu diuji dengan analisis *Gas Liquid Chromatography* (GLC), yang menunjukkan adanya perbedaan jumlah dan bentuk senyawa yang terdeteksi. Aroma harum gaharu mulai tercium pada pengamatan minggu kedua dan ketiga. Aroma wangi hanya tercium pada eksplan yang berinteraksi dengan fungi, dan tidak pernah ditemukan pada eksplan kontrol. Hasil analisis GLC menunjukkan bahwa gubal gaharu alami mengandung 29 senyawa gaharu (Gambar 31). Pada perlakuan *plantlet A. malaccensis* dengan isolat Sr 6 memiliki 15 *Retention Time* (RT) senyawa gaharu yang mendekati RT senyawa gaharu standar (Gambar 32).

Hasil analisis GLC menunjukkan bahwa gubal gaharu alami mengandung 29 senyawa gaharu (Tabel 20). Perlakuan *plantlet A. malaccensis* dengan isolat F memiliki 7 RT senyawa gaharu yang mendekati RT senyawa gaharu standar yaitu 10,80; 13,51; 15,81; 16,30; 17,19; 18,84; 22,32. Sedangkan pada isolat Sr3 terdapat 12 senyawa gaharu, Sr 6 terdapat 15 senyawa gaharu, Sr 7 terdapat 10 komponen senyawa gaharu dan pada isolat MP1 terdapat 11 senyawa gaharu.



Gambar 31 Puncak-puncak kromatografi dari senyawa utama gaharu alami yang digunakan sebagai standar uji untuk senyawa gaharu yang dikandung di dalam lini-lini *plantlet*

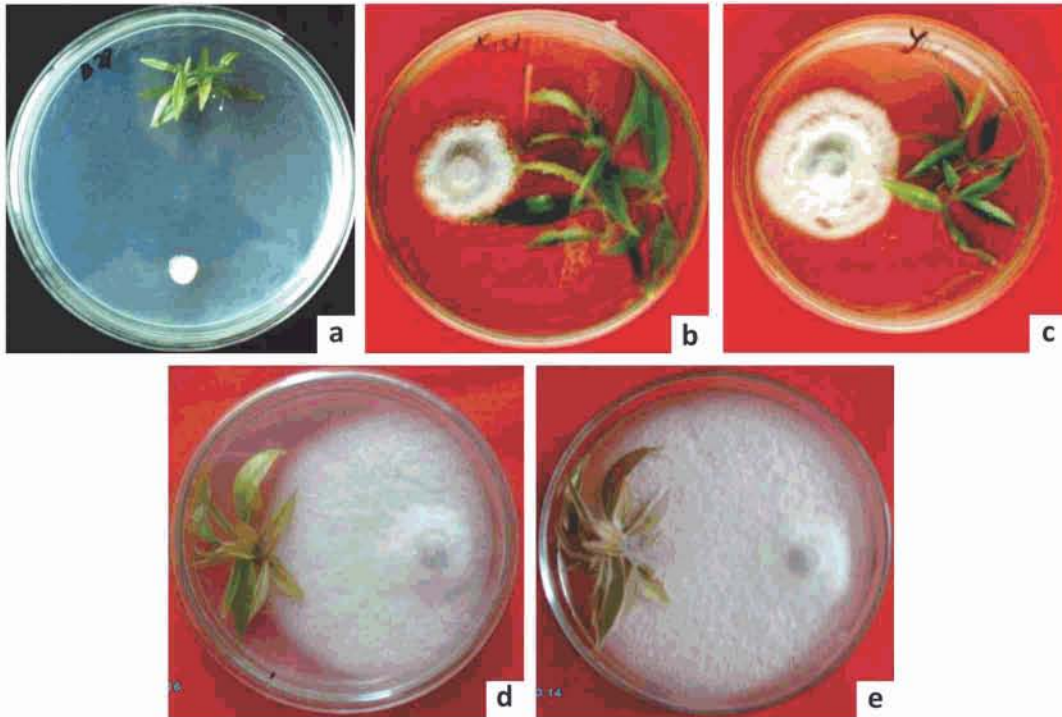


Gambar 32 Puncak-puncak dari senyawa gaharu pada *A. malaccensis* yang diinteraksikan dengan *Acremonium* Sr6

Tabel 20 Komponen senyawa gaharu pada sampel ekstrak yang terdeteksi dengan gas kromatografi (GLC)

No.	Senyawa utama Gaharu Kelas A Waktu Retensi (menit)	Isolat fungi				
		F	Sr 3	Sr 6	Sr 7	MP 1
1	3.81	-	√	√	-	-
2	4.81	-	-	-	√	√
3	5.44	-	-	-	-	-
4	10.80	√	√	√	√	√
5	13.51	√	√	√	√	√
6	14.97	-	√	√	-	√
7	15.12	-	-	√	√	√
8	15.27	-	√	-	-	√
9	15.52	-	-	√	-	√
10	15.67	-	√	-	-	-
11	15.81	√	√	√	√	√
12	15.97	-	-	√	-	-
13	16.30	√	√	√	-	-
14	16.47	-	-	-	-	-
15	16.63	-	-	-	-	-
16	16.76	-	-	-	-	-
17	17.00	-	√	√	-	-
18	17.19	√	√	√	√	√
19	17.34	-	-	-	-	-
20	17.51	-	-	-	-	-
21	17.75	-	-	√	√	√
22	18.09	-	-	√	√	-
23	18.32	-	√	-	-	-
24	18.57	-	-	-	√	√
25	18.84	√	√	√	-	-
26	19.92	-	-	√	√	-
27	20.13	-	-	-	-	-
28	21.17	-	-	-	-	-
29	22.32	√	-	-	-	-
Total senyawa		7	12	15	10	11

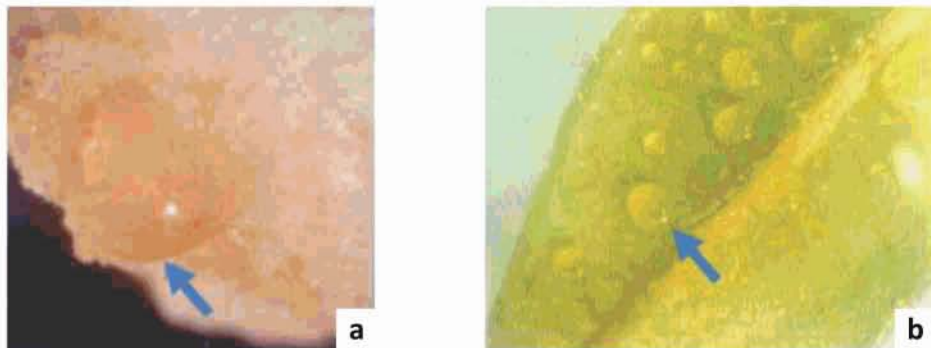
Uji Interaksi Kultur Ganda (IKG) *in vitro* antara lini-lini eksplan gaharu jenis *Aquilaria malaccensis* dengan isolat *Acremonium* sp. menunjukkan bahwa ada perbedaan respons antar isolat dengan eksplan gaharu jenis *A. malaccensis* yang diuji (Gambar 33).



Gambar 33 Seleksi isolat *Acremonium* sp. dan lini eksplan gaharu jenis *Aquilaria* sp. unggul menggunakan teknik Interaksi Kultur Ganda (IKG)

Catatan: Kultur ganda berumur (a) 1 hari; (b) 5 hari; (c) 7 hari; (d) 10 hari; dan (e) 14 hari.

Eksplan *in vitro* yang ditumbuhkan pada media yang diberi elisitor menunjukkan tetesan minyak yang terbentuk pada kalus (Gambar 34 a) dan di bawah permukaan daun (Gambar 34 b). Timbulnya tetesan minyak merupakan respons eksplan terhadap elisitor. Eksplan yang tidak diberi elisitor tidak membentuk tetesan minyak.



Gambar 34 Pembentukan tetesan minyak pada kalus gaharu (a) dan daun gaharu (b), setelah ditanam pada media *in vitro* dan diberi elisitor biotik fungi

Seleksi menggunakan teknologi Interaksi Kultur Ganda (IKG) *in vitro* relatif lebih mudah dilakukan dan lebih efisien, karena yang digunakan adalah eksplan, dalam lingkungan yang terkontrol, dan tidak ada kontaminan. Teknik Interaksi Kultur Ganda (IKG) dapat menyeleksi lini-lini unggul tanaman atau menyeleksi mikroorganisme yang mampu menginduksi senyawa metabolit sekunder. Seleksi *in vitro* sering dilakukan dalam penelitian karena memiliki kelebihan antara lain:

- a. Lebih efisien dan luasan tempat yang diperlukan relatif kecil.
- b. Intensitas seleksi lebih homogen.
- c. Efektivitas seleksi tinggi.
- d. Sebagai *screening*/seleksi awal.
- e. Gradien konsentrasi lebih homogen dibandingkan dengan di lapangan.
- f. Untuk mempelajari fenotipe dan genotipe.
- g. Pendekatan bioteknologi yang tidak kontroversial untuk memperoleh tanaman yang resisten/rentan.

Metode kultur jaringan mutlak diperlukan bagi perbanyak pohon-pohon potensial hasil seleksi, sehingga dihasilkan bibit-bibit yang identik dengan induknya (*true to type*). Selain itu, metode kultur jaringan juga bermanfaat untuk mendukung tujuan konservasi dan perbanyak pohon mandul.

Peningkatan produksi gubal gaharu dapat dicapai melalui tersedianya 3 faktor utama yaitu: 1. pohon-pohon gaharu potensial yang memiliki sifat responsif terhadap agen penginduksi gubal gaharu; 2. agen penginduksi gaharu yang sesuai; serta 3. lingkungan spesifik yang mendukung proses interaksi antara material pertahanan pohon gaharu dengan patogen. Pencarian pohon/genotipe gaharu potensial dilakukan melalui metode seleksi. Seleksi pohon *A. malaccensis* dan *A. microcarpa* yang berpotensi menghasilkan gubal gaharu harus menggunakan agensia penginduksi gaharu (*selector*) yang terbaik. Penetapan pohon/genotipe potensial dilakukan berdasarkan pengamatan visual dan analisis kimia produk gaharu yang dihasilkan.

Tujuan

Praktikan mengetahui cara melakukan Interaksi Kultur Ganda (IKG) antara eksplan gaharu jenis *A. malaccensis* dan *Acremonium sp.*

Alat:

- a. Pisau bedah *stainless steel* (*scalpel*).
- b. Pinset.
- c. LAF (*Laminar Air Flow*).
- d. Lampu Bunsen.

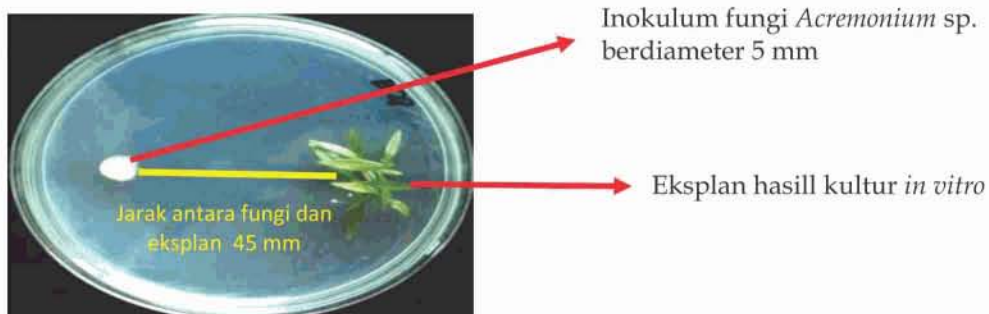
- e. Cawan Petri.
- f. Kertas saring.
- g. Tabung reaksi.
- h. *Magnetic stirrer bar*.
- i. *Stirrer*.
- j. Lumpang dan alu (*Mortar and pestle*).

Bahan:

- a. Beberapa eksplan gaharu dari jenis *A. malaccensis*.
- b. *Acremonium* sp. strain F.
- c. Media MS 50%.
- d. Aseton.
- e. Natrium sulfat anhydrous (Na_2SO_4).
- f. Eter.
- g. Etanol absolut.

Instruksi Latihan Melakukan IKG:

- 1. Gunakan eksplan gaharu jenis *A. malaccensis* dari kultur *in vitro* yang berumur 2 bulan.
- 2. Gunakan *Acremonium* sp. sebagai penginduksi senyawa gaharu jenis *A. malaccensis*.
- 3. Pasangkan eksplan gaharu jenis *A. malaccensis* dan *Acremonium* sp. dalam bentuk kultur ganda. Eksplan gaharu jenis *A. malaccensis* dari kultur *in vitro* dipasangkan dengan sepotong inokulum *Acremonium* sp. berdiameter 5 mm dengan jarak ± 45 mm antara satu dengan yang lainnya pada media 50% Murashige-Skoog modifikasi yang diletakkan di dalam cawan Petri berdiameter 90 mm.



- 4. Gunakan kultur eksplan tunggal pada media yang sama sebagai kontrol.
- 5. Amati diameter koloni, kematian eksplan, dan tingkat wangi selama masa inkubasi. Diameter koloni diukur dari dua arah terhadap posisi eksplan, yaitu arah menuju eksplan (dk) dan arah tegak lurus dk (ds). Pengukuran dimulai pada hari ke-3 dan selanjutnya setiap dua hari sekali sampai koloni fungi mencapai eksplan. Nilai diameter yang terukur

diubah menjadi nilai radius koloni fungi (R_a) yang dinyatakan sebagai parameter pertumbuhan fungi. Radius koloni fungi dapat dihitung dengan persamaan:

$$R_a = \frac{dk + ds}{4} \text{ atau } R_a = \frac{(dk - x) + ds}{3}, \text{ jika } dk > 4 \text{ cm}$$

Keterangan:

R_a = radius koloni fungi

dk = diameter fungi ke arah eksplan

ds = diameter fungi yang tegak lurus terhadap dk

X = Jarak titik inokulasi *Acremonium* sp. ke tepi cawan yang terdekat

6. Eksplan dikatakan mati bila satu daun atau lebih gugur atau berubah warnanya menjadi kuning hingga coklat. Jumlah eksplan yang mati dinyatakan dalam persentase kematian eksplan. Adanya tetesan pada permukaan daun dan munculnya aroma wangi juga diamati. Tinggi rendahnya ketajaman aroma wangi dinyatakan dalam skor atau tingkat wangi. Skor yang dipakai adalah sebagai berikut:

0: tidak wangi

1: wangi sedikit sekali.

2: Sedikit wangi.

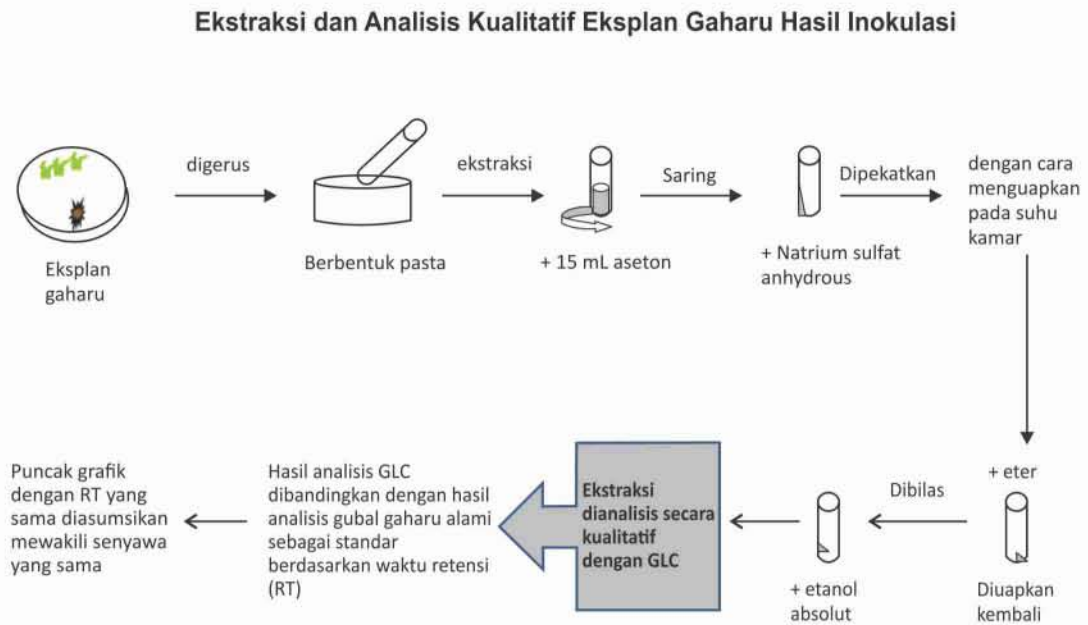
3: Wangi.

4: Sangat wangi.

Instruksi ekstraksi dan analisis senyawa gaharu (Gambar 35):

1. Pilih eksplan yang beraroma wangi, setelah masa interaksi berakhir.
2. Haluskan eksplan dari kultur tunggal dengan menggunakan *mortar* dan *pestle* sampai berbentuk pasta.
3. Ekstraksi pasta dengan 15 mL aseton selama 15 menit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer bar* dan *stirrer*.
4. Filtrasi ekstraksi kasar dengan natrium sulfat anhydrous (Na_2SO_4) dan pekatkan kembali menjadi $\frac{1}{10}$ volume awal atau ± 2 mL.
5. Lakukan analisis lebih lanjut secara kualitatif tentang keberadaan senyawa gaharu dalam sampel ekstraksi dengan menggunakan *Gas Liquid Chromatography* (GLC). Operasi GLC ini menggunakan *packed column Carbowax 20 on chromosob WAW 80/100 mesh* pada suhu injektor 230°C dan suhu oven kolom 195°C dengan gas pembawa N_2 (50 mL/menit), kecepatan aliran udara $0,55 \text{ kg/cm}^2$, dan detektor FID.

6. Pembacaan hasil senyawa analisis GLC dilakukan dengan membandingkan *Retention Time* (RT) yang mewakili masing-masing senyawa sampel dengan waktu retensi standar senyawa-senyawa gaharu alami. Puncak-puncak grafik dengan RT yang sama berarti mewakili senyawa yang sama.



Gambar 35 Alur ekstraksi dan analisis kualitatif eksplan gaharu hasil inokulasi

Mikrografting *In Vitro*

Teknologi mikrografting *in vitro* atau sambung mikro *in vitro* adalah perbanyakan vegetatif yang dilakukan dalam kondisi aseptik dengan menggunakan teknik kultur *in vitro* yang bertujuan untuk menggabungkan keunggulan sifat batang bawah dan batang atas. Keunggulan penggunaan teknik mikrografting *in vitro* antara lain:

- Meremajakan jaringan dari tanaman tua.
- Memungkinkan terjadinya produksi sepanjang tahun.
- Mempersingkat waktu penyediaan bibit sambung dan menghasilkan tanaman bebas penyakit.
- Meningkatkan studi mengenai kompatibilitas dan hubungan antara batang bawah dan batang atas.
- Membuat kombinasi spesifik antar genotipe yang akan meningkatkan produktivitas.
- Menekan pengaruh lingkungan, khususnya pada tanaman yang tidak toleran terhadap kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan.
- Memperpendek siklus pemuliaan dengan mengurangi objektivitas untuk mendapatkan tanaman yang toleran terhadap penyakit yang disebabkan oleh mikroba tanah dan nematoda.

- h. Meningkatkan resistensi penyakit dan parasit asal tanah.
- i. Meningkatkan serapan hara nutrisi.
- j. Meningkatkan vigor tanaman dan masa berproduksi yang lebih panjang.
- k. Menyeragamkan kualitas dan fisik tanaman serta memproduksi dalam jumlah banyak.
- l. Mengetahui secara dini/lebih awal hasil sambung mikro yang kompatibel atau yang tidak kompatibel. Pada sambung mikro yang kompatibel hubungan timbal balik antara batang bawah dan batang atas terjadi secara normal. Hubungan antara batang bawah dan batang atas akan mempengaruhi keragaman dalam pola distribusi hara, kemampuan hara untuk bergerak melintasi bagian penyatuan sambungan, dan regulasi transpor hormon.

Produksi gaharu di lapangan secara berkesinambungan melalui penanaman spesies menghadapi kendala-kendala antara lain:

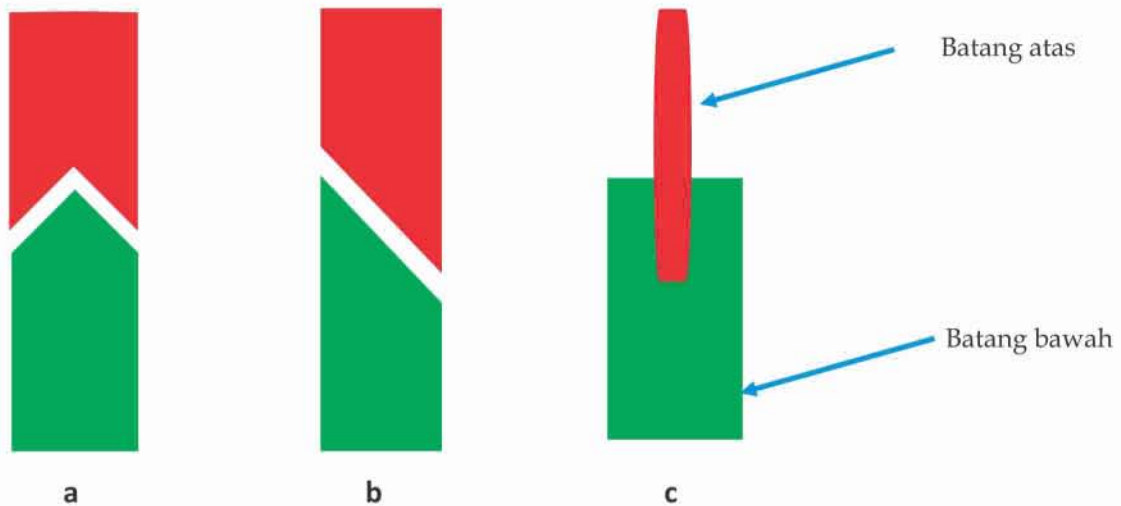
1. Belum tersedianya program seleksi untuk mendapatkan tanaman unggul.
2. Rentannya gaharu jenis *A. malaccensis* terhadap penyakit akar putih dan tikus.
3. Lambatnya pertumbuhan gaharu jenis *A. malaccensis* dibandingkan dengan gaharu dari spesies yang lain.
4. Rendahnya viabilitas benih rekalsitran gaharu jenis *A. malaccensis*. Benih yang dipanen dengan tangan memiliki persentase perkecambahan 67% pada awal panen, dan segera menurun menjadi 47% satu minggu setelah panen.
5. Rendahnya persentase keberhasilan perbanyakan secara vegetatif dengan teknik stek, *stump* atau cangkok.

Untuk mengatasi berbagai kendala tersebut, dapat dilakukan mikrografting *in vitro* antara *A. malaccensis* sebagai batang atas dan spesies lain *A. crassna* sebagai batang bawah untuk perbanyakan klonal. Mikrografting ujung tunas *in vitro* terdiri dari penyambungan (*grafting*) dalam kondisi aseptik, ujung tunas *plantlet* yang tumbuh dalam kondisi *in vitro* pada batang bawah dari *plantlet* spesies atau genotipe lain. Mikrografting *in vitro* terdiri dari beberapa tahapan, yaitu:

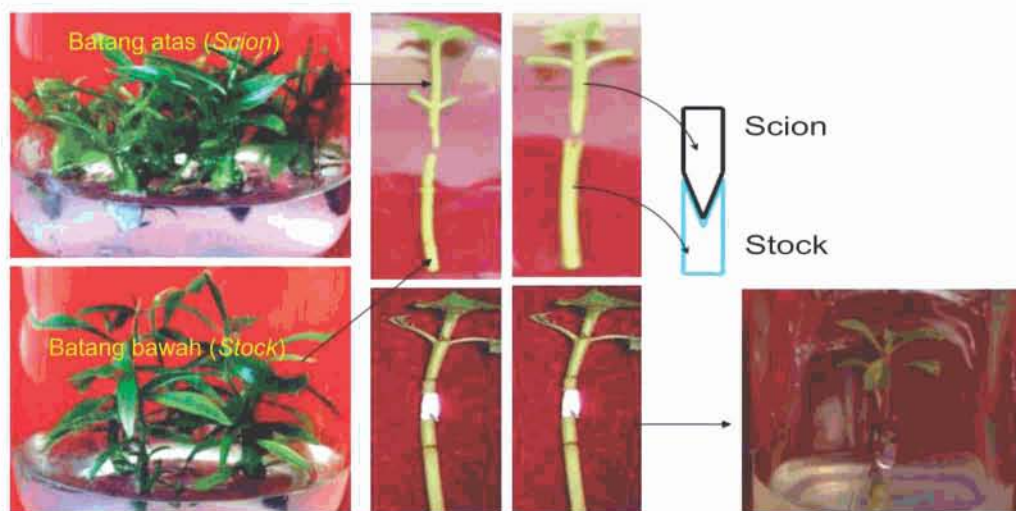
1. Penyiapan batang bawah.
2. Penyiapan batang atas.
3. Prosedur mikrografting.
4. Pemeliharaan *plantlet* hasil mikrografting *in vitro*.
5. Aklimatisasi.
6. Transfer ke tanah.

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan mikrografting adalah tipe penyambungan batang bawah dan batang atas yang digunakan. Metode sambung umumnya tergantung pada spesies tanaman yang disambung. Beberapa tipe penyambungan yang umum digunakan adalah *tounge approach grafting*, penyambungan dengan penyisipan, penyambungan dengan pemotongan, penyambungan dengan pemotongan miring, horizontal, dan

penyambungan dengan bantuan selang plastik. Di samping itu ada juga penyambungan berbentuk V dan L. Contoh tipe penyambungan (a) berbentuk V, (b) potongan miring, dan (c) *cleft grafting*, di mana potongan batang atas kemudian ditempelkan ke bagian batang bawah yang sudah dipersiapkan sampai melekat secara fisik (Gambar 36). Teknik mikrografting antara *A. malaccensis* dan *A. crassna* dengan tipe sambungan V (Gambar 37).



Gambar 36 Beberapa tipe sambungan untuk mikrografting *in vitro* yang digunakan yaitu: (a) berbentuk V; (b) potong miring; dan (c) *cleft grafting*



Gambar 37 Ilustrasi tipe sambungan V pada teknik mikrografting antara *A. malaccensis* dan *A. crassna*

Dari berbagai macam tipe mikrografting, maka tipe sambungan berbentuk V lebih tepat digunakan dalam metode mikrografting *in vitro* plantlet gaharu (Gambar 38). Hal ini dikarenakan pada sambungan tipe V posisi kambium antara batang bawah dan batang atas berada pada posisi pertautan yang tepat dan kokoh. Kondisi yang demikian menyebabkan

eksplan tidak mudah bergeser dan jaringan ikatan pembuluh xilem, floem dan kambium antara kedua *plantlet* dengan sangat mudah akan menyatu.



Gambar 38 Mikrografting tanaman gaharu dengan tipe sambungan berbentuk V pada *plantlet* gaharu

Dalam proses penyembuhan *plantlet* yang terluka akibat pemotongan, maka masing-masing sel, baik *plantlet* batang bawah maupun batang atas membentuk jaringan kalus berupa sel-sel parenkim. Sel-sel parenkim dari batang bawah dan batang atas saling berkontak, menyatu, membaaur, dan terdiferensiasi, sehingga membentuk kambium sebagai lanjutan dari lapisan kambium yang lama dari batang bawah dan batang atas. Dari lapisan kambium yang baru akan terbentuk jaringan pembuluh untuk melancarkan proses translokasi hara dari batang bawah ke batang atas, atau sebaliknya hasil fotosintesis dari batang atas ke batang bawah.

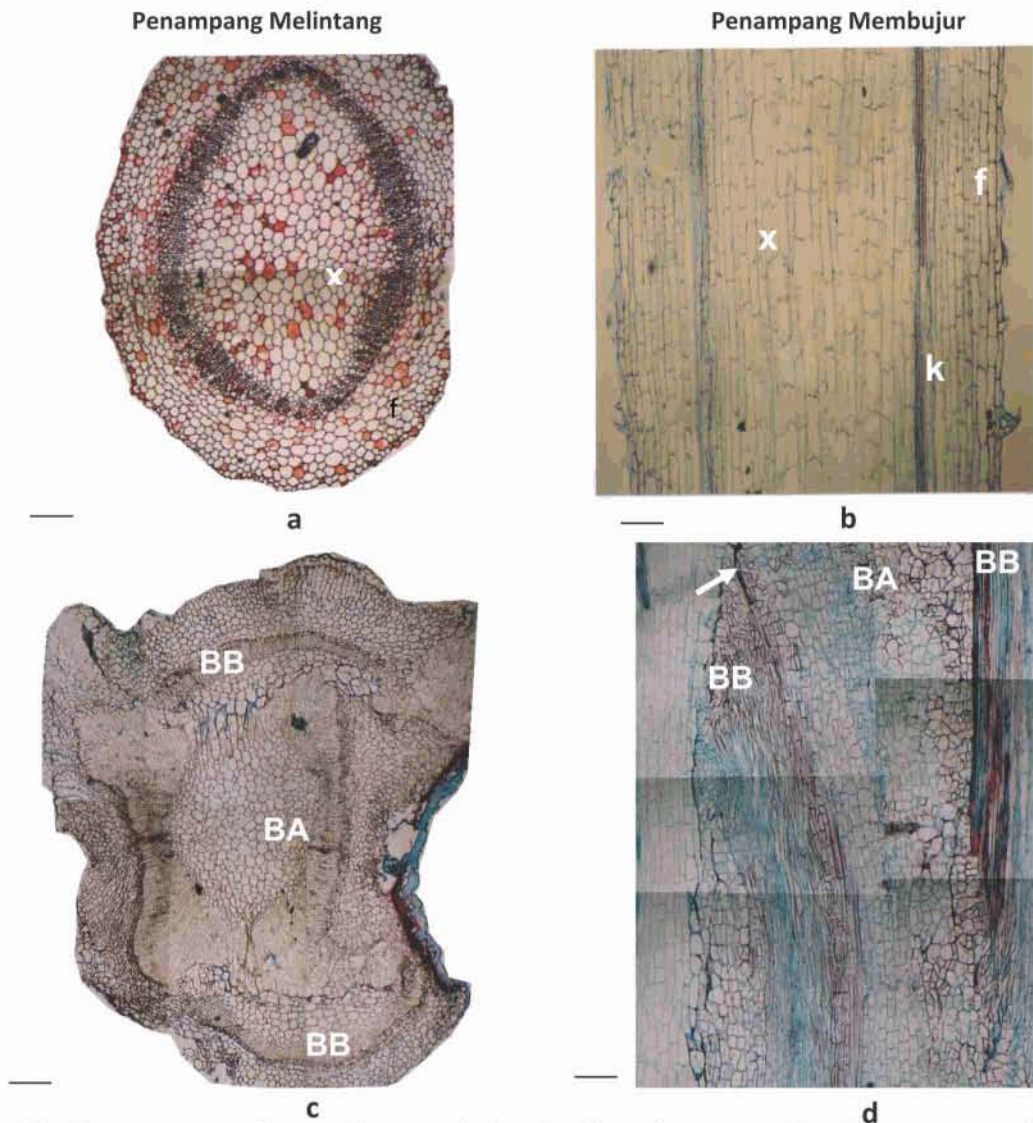
Struktur anatomi daerah pertautan sama dengan struktur anatomi batang *plantlet* yang tidak disambung, di mana jaringan batang atas dapat menyatu lebih sempurna dengan jaringan batang bawah. Pada daerah penyambungan tampak daerah irisan atau potongan bekas luka akibat mikrografting.

Proses penyembuhan luka pada *plantlet* akibat penyambungan berbeda-beda tergantung pada jenis dan karakter dari *plantlet* yang diuji. Posisi jaringan *plantlet* batang bawah yang dengan tepat mengenai jaringan batang atas dapat mempercepat proses penyembuhan akibat mikrografting. Posisi kambium batang bawah dengan batang atas sangat menentukan perkembangan *plantlet* selanjutnya.

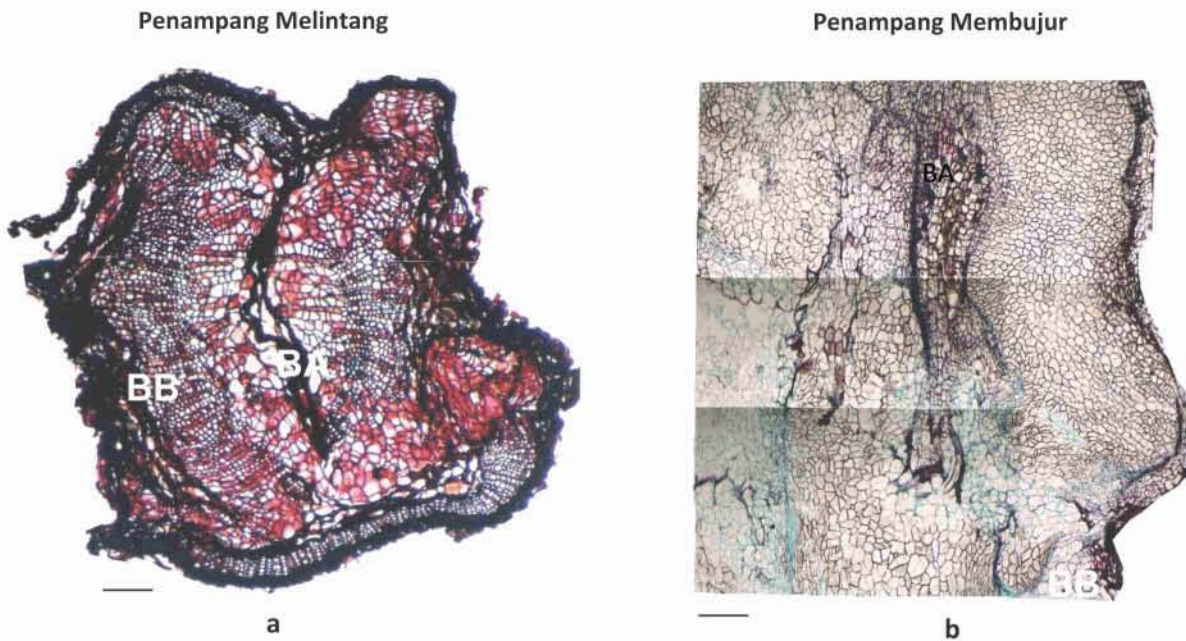
Kontak kambium yang tidak tepat atau *partial* dapat mengakibatkan pertautan jaringan pembuluh antara batang bawah dengan batang atas tidak sempurna. Hal tersebut akan mengakibatkan terhambatnya translokasi senyawa-senyawa penting untuk metabolisme pertumbuhan *plantlet*. Dengan demikian semua aspek dalam penyambungan baik secara fisik, mekanik maupun fisiologis perlu diusahakan dalam kondisi seoptimal mungkin untuk menjamin keberhasilan mikrografting.

Analisis kompatibilitas mikrografting *in vitro* secara histologi pada penampang melintang dan membujur hasil mikrografting *in vitro* *plantlet* gaharu dapat dilihat pada Gambar 39 dan 40.

Definisi kompatibilitas adalah pertumbuhan *plantlet* normal dan tidak terjadi lignifikasi; dengan demikian transportasi air, hara dan fotosintat berlangsung dengan baik.



Gambar 39 Penampang melintang dan membujur *plantlet* gaharu umur 8 minggu, tanpa mikrografting (a dan b), setelah mikrografting *in vitro* (c dan d) pada pembesaran 40x
 Catatan: f. Pembuluh kulit kayu (floem); k. kambium; x. Pembuluh kayu (xilem); BB. Batang bawah; BA. Batang atas; (a) dan (b) *plantlet* tidak disambung; (c) dan (d) mikrografting *in vitro* gaharu Am/Am daerah pertautan; bars = 4 μ m.



Gambar 40 Penampang melintang (a) dan membujur (b) *plantlet* gaharu gv/am umur 8 minggu setelah mikrografting *in vitro* pada pembesaran 40x
Catatan: BA= Batang Atas; BB= Batang Bawah; bars = 4 μ m.

Hasil kompatibilitas secara histologi yang diperoleh menunjukkan bahwa struktur anatomi batang *plantlet* gaharu sama dengan struktur anatomi batang *plantlet* berkayu dikotiledon lainnya, yaitu terdiri dari jaringan floem, jaringan kambium dan jaringan xilem. Jaringan kambium adalah jaringan yang berbentuk lingkaran yang membatasi antara jaringan floem dan xilem. Ke arah dalam kambium disebut xilem (pembuluh kayu) yang berfungsi untuk mengangkut air dan hara mineral dari akar ke atas dan ke arah bagian luar kambium yaitu floem (pembuluh kulit kayu) yang mengangkut hasil fotosintesis dari atas ke bawah tanaman.

Penampang melintang dan membujur *plantlet* yang tidak disambung memperlihatkan sel yang masih utuh, di mana antara satu dengan yang lain merupakan satu ikatan yang tidak terputus-putus, baik pada jaringan floem, jaringan kambium maupun jaringan xilem. Hal ini, terjadi karena struktur anatomi *plantlet* tersebut masih merupakan satu individu (Gambar 39 a dan 39 b).

Penampang melintang dan membujur daerah pertautan antara batang bawah dan batang atas hasil mikrografting *in vitro* kombinasi *A. crassna* dan *A. malaccensis* menunjukkan bahwa jaringan kambium, xilem dan floem tidak berbentuk lingkaran yang utuh (Gambar 39c dan 39d). Hal ini disebabkan adanya pemotongan berbentuk huruf V pada batang bawah dan batang atas. Pada daerah pertautan antara batang bawah dan batang atas tampak adanya sel-sel berukuran kecil, dengan sitoplasma sel yang penuh dalam jumlah cukup banyak. Sel-sel tersebut membentuk kalus yang tumbuh aktif.

Kalus adalah sekelompok sel parenkim yang berkembang di sekitar jaringan yang terluka. Produksi sel-sel parenkim merupakan langkah awal dari pembentukan kalus pada *plantlet* yang terluka akibat penyambungan, baik terhadap batang bawah maupun terhadap batang atas. Perkembangan sel dan anatomi *plantlet* akan berubah sejalan dengan perubahan waktu. Fungsi masing-masing jaringan/sel antara satu dengan lainnya berbeda-beda. Jaringan yang belum terdiferensiasi berbeda fungsinya dengan jaringan yang sedang dan sudah berdiferensiasi.

Kalus tersebut berdiferensiasi menjadi sel dewasa. Selanjutnya, jaringan akan tergabung antara jaringan batang bawah dan batang atas, baik berupa jaringan xilem gabungan, jaringan floem gabungan maupun jaringan kambium gabungan.

Reaksi awal yang ditimbulkan pada mikrografting adalah terjadinya proliferasi kalus pada daerah pertautan antara batang bawah dengan batang atas. Pada mikrografting kombinasi yang kompatibel, pertumbuhan *plantlet* tampak normal dan menghasilkan sambungan yang mulus. Sedangkan pada kombinasi yang tidak kompatibel pertumbuhan *plantlet* akan menjadi kerdil serta membentuk sambungan yang tidak normal. Misalnya kulit pada daerah pertautan lebih tebal dan lebih keras.

Pada umur 8 minggu setelah mikrografting *in vitro* sel kalus pada daerah penyambungan belum menjadi sel dewasa. Namun, tampaknya translokasi fotosintat, air dan hara mineral pada *plantlet* hasil mikrografting berlangsung dengan baik. Hal ini dapat terlihat dari pertumbuhan dan perkembangan *plantlet* yang vigor.

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada kombinasi Ac/Am terdapat garis memanjang memotong tengah lingkaran batang (Gambar 39). Diduga garis tersebut merupakan bagian dari pembentukan xilem gabungan yang belum sempurna antara batang bawah dan batang atas, sehingga belum dapat terlihat karakteristik yang khas sebagai xilem. Bentuk xilem yang masih samar tersebut dapat diduga akan membentuk sel batu. Sel batu kemungkinan akan menghambat translokasi air dan hara mineral menuju ke tajuk atau translokasi fotosintat dari daun ke bagian bawah *plantlet*, yang menyebabkan pertumbuhan *plantlet* menjadi terhambat.

Selain melihat kompatibilitas secara histologi dapat juga melakukan pengecekan melalui elektroforesis SDS - page protein. Gaharu hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa protein daun batang atas yang diuji memiliki protein dengan berat molekul 14 - 45 kDa. Pada umumnya pola pita protein SDS-PAGE dari batang atas adalah sama dengan *plantlet* kontrol atau yang tidak mengalami mikrografting.

Ada beberapa strategi dasar untuk mengidentifikasi interaksi antara batang atas dan batang bawah pada tingkat biokimia. Hal yang paling penting diamati untuk mengidentifikasi interaksi antara batang atas dan batang bawah berbasis biokimia adalah terbentuknya protein tertentu. Terbentuknya protein baru dari sambungan yang tidak kompatibel antara batang atas dan batang bawah mungkin diatur oleh protein tertentu, yang berperan sebagai penggerak proses metabolisme. Pola pita protein dari kombinasi mikrografting yang kompatibel adalah

sama dengan pola pita protein dari tanaman yang berasal dari benih atau kecambah. Di sisi lain, pola pita protein dari kombinasi yang tidak kompatibel akan menghasilkan pita protein baru dengan berat molekul sekitar 21 dan 30 kDa.

Tujuan

Praktikan mampu melakukan teknik mikrografting *in vitro* tipe penyambungan berbentuk V dan menggunakan teknik histologi untuk mengetahui pertautan hasil mikrografting.

Latihan Penyambungan Batang Atas dan Batang Bawah:

Alat:

- a. Pisau bedah *stainless steel* (*scalpel*).
- b. Pinset.
- c. LAF (*Laminar Air Flow*).
- d. Lampu Bunsen.
- e. Cawan Petri.
- f. Kertas saring.
- g. Botol.

Bahan:

- a. *Plantlet* batang atas *A. malaccensis*.
- b. *Plantlet* batang bawah *A. crassna*.
- c. *Aluminium foil* steril.
- d. Media sambung mikro.

Instruksi Latihan Penyambungan Batang Atas dan Batang Bawah:

1. Gunakan *plantlet* *A. malaccensis* sebagai batang atas dan *A. crassna* hasil kultur *in vitro* berumur tiga bulan sebagai batang bawah.
2. Bagian *plantlet* untuk batang atas dipotong sepanjang dua buku dari tajuk, sedangkan *plantlet* untuk batang bawah dipotong dua buku dari pangkal batang bawah.
3. Batang bawah harus seragam yaitu memiliki diameter yang sama dan sedikit lebih besar daripada diameter batang atas.
4. Potong eksplan dengan tinggi sekitar 2 cm dari kultur *plantlet* untuk batang atas, kemudian 1 cm ujung batang bagian pucuk digunakan sebagai batang atas. Batang bawah merupakan *plantlet* dari spesies berbeda yang batang bagian atasnya dibuang.

5. Pangkas bagian tajuk batang bawah, kemudian dibuat sayatan sesuai perlakuan yaitu tipe sambung V sepanjang 1 cm dengan menggunakan pisau *scalpel*. Sayatan batang atas dibuat sesuai dengan sayatan batang bawah, baik bentuk maupun ukurannya.
6. Tancapkan batang atas pada batang bawah yang sudah disayat. Untuk memperkokoh sambungan eksplan diikat dengan menggunakan *aluminium foil* yang sudah disterilkan, kemudian dikulturkan pada medium sambung mikro.
7. Medium MS (Murashige & Skoog) dengan penambahan IBA 3 mg/L digunakan sebagai media tumbuh untuk pertumbuhan dan perakaran *plantlet* hasil mikrografting *in vitro*. Penambahan IBA pada medium MS sangat berpengaruh terhadap perakaran mikrografting *in vitro plantlet* gaharu.
8. Inkubasi kultur di ruangan inkubasi pada suhu 25 - 27 °C dengan pencahayaan selama 12 jam per hari dengan kelembaban udara relatif 70 - 80% selama 2 - 3 bulan.
9. Aklimatisasi dilakukan dengan menggunakan media arang sekam yang dicampur dengan tanah *top soil* steril dengan perbandingan (1:1) di dalam rumah kaca yang bernaungan paranet 70%.

Analisis Pertumbuhan

Keberhasilan mikrografting *in vitro* dan *in vivo* dapat diketahui setelah 6 bulan penyambungan. Keberhasilan ditentukan berdasarkan jumlah batang atas yang masih tetap bertahan hidup dari seluruh perlakuan. Perpanjangan batang atas juga dicatat 2 bulan setelah penyambungan, untuk setiap contoh. Pengamatan dilakukan sampai tanaman berumur 6 bulan. Pengamatan keberhasilan penyambungan diklasifikasi dengan menggunakan skala 1 - 5, di mana 1 = pertumbuhan sangat jelek dan 5 = pertumbuhan baik. Kemampuan untuk menghasilkan tunas setelah penyambungan ditetapkan dengan indeks respons penyambungan, yaitu jumlah tunas x kualitas tunas. Lingkar batang (2 cm di atas penyambungan) diukur dengan cara yang sama dengan pengukuran panjang batang.

Pada akhir percobaan, secara perlahan semua tanaman dipanen untuk dipelajari sistem perakarannya. Jumlah dan panjang akar primer serta sekunder dievaluasi dengan skala 1 - 5, di mana 1 = akar sangat sedikit dan 5 = akar banyak.

Observasi mikroskopis untuk menganalisis kompatibilitas dilakukan dengan menggunakan lima tanaman dari setiap kombinasi penyambungan dan kontrol, di mana batang dipotong secara melintang dan membujur.

Latihan Observasi Secara Histologi:

Alat:

1. Mikroskop
2. Gelas objek (*object glass*)
3. Gelas penutup (*cover glass*)
4. Jarum preparat/jarum inokulasi (*inoculating needle/transfer needle*)
5. Pipet tetes
6. Mikrotom

Bahan:

1. Alkohol 50-70-80-90-95-100%
2. Larutan FAA (Formalin, Asam, Asetat Glasial)
3. Etanol absolut
4. Xilen
5. Pewarna *fast green*

Instruksi Latihan:

1. Potong daerah pertautan menjadi segmen sepanjang 2 cm dan dengan mikrotom dipotong menjadi sayatan 25 μm .
2. Fiksasi sampel selama 24 jam di dalam larutan FAA (Formalin, Asam, Asetat glasial).
3. Dehidrasi sampel di dalam etanol dengan seri konsentrasi yang semakin meningkat, yaitu konsentrasi 50, 70, 80, 90, 95, dan 100% masing-masing selama 30 menit.
4. Rendam sayatan sampel di dalam safranin (2%) yang ditambahkan 70% etanol dan pewarna *fast green* (1%) di dalam 100% etanol selama 15 menit.
5. Letakkan sayatan sampel di dalam larutan yang dibuat dengan perbandingan 1 etanol absolut: 1 xilen, selama 30 menit.
6. Rendam sayatan sampel di dalam larutan xilen murni, masing-masing 2 kali selama 30 menit.
7. Amati histologi terjadinya kompatibilitas dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x.

Variasi Genetik *Plantlet* dengan Marka Molekuler RAPD

Salah satu teknologi molekuler yang berbasis pada DNA adalah marka molekuler. Marka molekuler merupakan alat yang berguna bagi pemulia dan ahli genetik untuk menganalisis genom makhluk hidup, sehingga dapat membedakan karakteristik makhluk hidup pada tingkat gen. Penggunaan marka molekuler terutama untuk memonitor variasi susunan DNA pada

sejumlah spesies serta merekayasa sumber baru variasi genetik dengan mengintroduksi karakter-karakter yang baik.

Identifikasi galur-galur dengan marka molekuler juga sangat bermanfaat dalam analisis sidik jari (*fingerprinting*), karena dapat memberikan informasi untuk perencanaan program pemuliaan, terutama dalam pembentukan segregasi baru, varietas hibrida dan sintetik unggul baru serta dalam menentukan tetua yang digunakan untuk memilih pasangan persilangan baru. Pemilihan marka molekuler yang akan digunakan dalam analisis genetik perlu mempertimbangkan tujuan yang diinginkan, sumber dana yang dimiliki, fasilitas yang tersedia serta kelebihan dan kekurangan masing-masing tipe marka molekuler.

Kegiatan marka molekuler dimulai dengan mengambil bagian tumbuhan seperti daun-daun muda, kemudian mengisolasi DNA dari bagian tumbuhan tersebut dan dicari bagian yang bertanggung jawab terhadap karakter unggulnya. DNA hasil isolasi lebih lanjut dapat dihubungkan dengan bank data genetika untuk mengidentifikasi gen dan menduga karakter yang diekspresikannya. Melalui teknik marka molekuler, maka kepemilikan varietas akan diperkuat dengan identitas tumbuhan secara spesifik dalam bentuk gambar atau karakter gen, sehingga informasi tersebut menjadi data pendukung deskripsi fisik yang diperoleh dari hasil observasi langsung di lapangan.

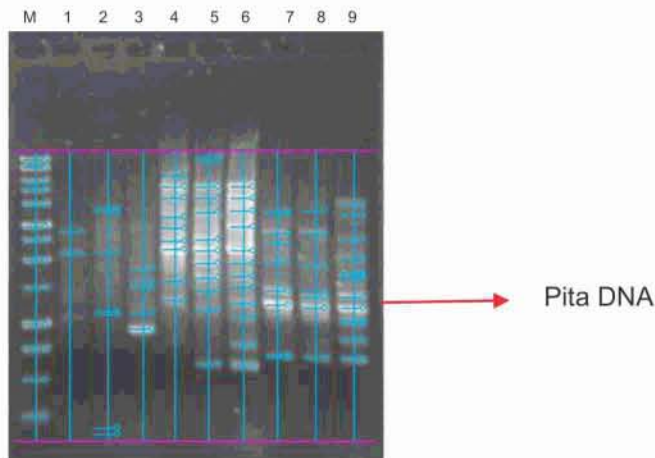
Untuk membedakan varietas baru dengan varietas yang sudah ada tidak hanya dilakukan dengan menggunakan karakter morfologis, namun juga dengan menggunakan teknik molekuler. Uji karakter molekuler sebagai persyaratan utama dalam perlindungan varietas tanaman harus dievaluasi melalui uji substantif, untuk membuktikan sifat kebaruan, keunikan, keseragaman, dan kestabilan dari varietas yang dimintakan hak perlindungan varietas tanamannya. Selama ini pembedaan varietas baru dengan varietas yang sudah ada dilakukan hanya secara morfologis. Namun karena varietas yang dihasilkan pada umumnya memiliki tetua yang tidak berbeda jauh, maka secara morfologis sulit dibedakan, terutama untuk varietas tanaman yang berasal dari spesies dengan keragaman genetik yang sempit.

Salah satu marka molekuler adalah teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) yang mengamplifikasi DNA yang bersifat polimorfik dengan menggunakan primer acak serta bantuan enzim Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase. Kelebihan teknik RAPD adalah lebih sederhana, tidak memerlukan waktu yang lama, memerlukan DNA yang lebih sedikit, tidak memerlukan DNA yang terlalu murni, tidak menggunakan radioisotop maupun DNA *probe*, cocok digunakan untuk sampel dalam jumlah banyak, cukup menggunakan satu primer serta pengerjaannya relatif mudah.

Sumber genetik tanaman dapat digunakan untuk merakit varietas baru dengan sifat unggul dan memiliki daya adaptasi yang lebih baik terhadap berbagai kondisi lingkungan. Oleh karena itu, informasi mengenai keragaman genetik sangat diperlukan untuk program pemuliaan. Pembeda antar spesies ini secara genetik juga sangat penting untuk mencegah terjadinya pemalsuan, terutama untuk tanaman yang memiliki kemiripan secara fenotipik.

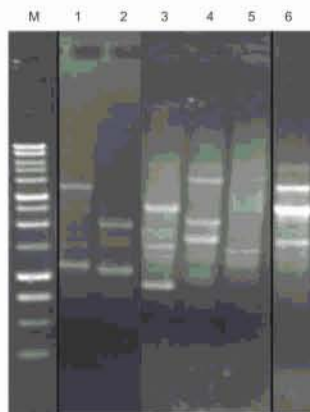
Teknik RAPD dilakukan berdasarkan penggunaan primer sekuen-sekuen nukleotida untuk mengamplifikasi segmen genomik DNA acak melalui pemanfaatan PCR, sehingga menunjukkan polimorfisme. Primer untuk analisis teknik RAPD mengandung sekitar 9 - 10 basa panjangnya. Polimorfisme teramati dengan menggunakan teknik RAPD karena adanya perubahan basa tunggal yang mencegah perpasangan primer dengan sekuen target, delesi sisi utama, insersi atau delesi sehingga memodifikasi ukuran DNA. Keuntungan dari teknik RAPD adalah set oligonukleotida yang sama dapat digunakan untuk berbagai spesies atau organisme. Teknik RAPD digunakan untuk pemetaan genom, penanda gen dan penelitian kekerabatan tanaman.

Ada 4 tahap dalam analisis RAPD yang harus dilakukan, yaitu tahap ekstraksi DNA, tahap pengujian kuantitas DNA, tahap amplifikasi DNA (PCR) dan tahap elektroforesis. Contoh profil DNA *plantlet* gaharu hasil PCR dengan menggunakan marka RAPD dan seleksi primer yang mampu menghasilkan pita-pita polimorfis (Gambar 41). Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPD 03 (Gambar 42).



Gambar 41 Seleksi primer pada *plantlet* gaharu (*Aquilaria* sp.) yang mampu menghasilkan pita-pita polimorfis

Catatan: M = Marka DNA; 1 = P8-OPA 01; 2 = P8-OPA 02; 3 = P8-OPB 02; 4 = P8-OPB 04; 5 = P8-OPC 02; 6 = P8-OPC 04; 7 = P8-OPD 03; 8 = P8-OPD 04; 9 = P8-OPE 03.



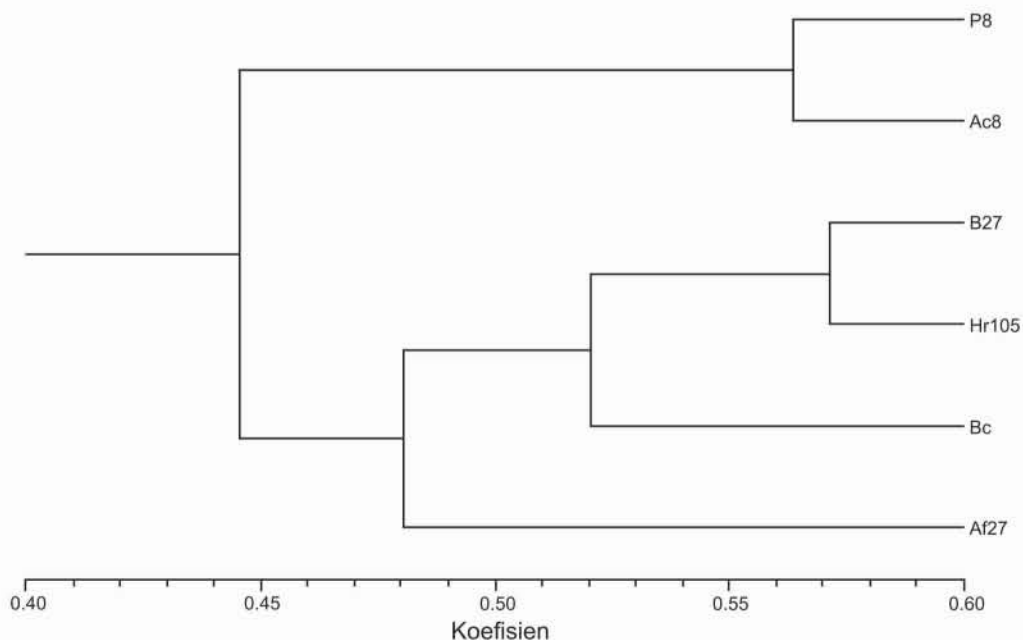
Gambar 42 Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPD 03

Catatan: M = Marka 1Kb DNA ladder; 1 = *A. microcarpa* P8; 2 = *A. crassna* Ac 8; 3 = *A. malaccensis* B27; 4 = *G. verstiegii*; 5 = *A. beccariana*; dan 6 = *A. hirta*105.

Analisis kemiripan genetik berdasarkan marka RAPD menunjukkan bahwa tingkat kemiripan genetik antara spesies *Aquilaria* berkisar 0,35 - 0,57 (Tabel 21). Kemiripan genetik yang tertinggi diperoleh antara *A. malaccensis* dan *A. hirta*, yaitu 57%, sedang kemiripan yang terendah diperoleh antara *A. beccariana* dan *A. crassna*. Hasil dendrogram menunjukkan bahwa keenam spesies *Aquilaria* terbagi dalam dua kelompok pada koefisien jarak genetik 0,45 (Gambar 43).

Tabel 21 Matriks kemiripan genetik *plantlet* gaharu

	P8	Ac8	B27	Af27	Bc	Hr105
P8	1,0000					
Ac8	0,5636	1,0000				
B27	0,4058	0,4603	1,0000			
Af27	0,5217	0,3968	0,4545	1,0000		
Bc	0,4276	0,3459	0,5217	0,4969	1,0000	
Hr105	0,5344	0,4706	0,5714	0,4898	0,5195	1,0000



Gambar 43 Dendrogram hasil analisis RAPD untuk variasi genetik *plantlet* klon gaharu
 Catatan: P8 = *A. microcarpa*; Ac8 = *A. crassna*; B27 = *A. malaccensis*; Hr105 = *A. hirta*;
 Bc = *A. beccariana*; Af27 = *G. verstiegii*.

Kelompok I beranggotakan *A. microcarpa* dan *A. crassna*, sedangkan empat spesies lainnya berada di dalam kelompok II. Kelompok II terbagi menjadi dua subkelompok pada koefisien jarak genetik 0,48 yang terdiri dari subkelompok I yang terdiri dari *A. malaccensis*, *A. hirta* dan *A. beccariana*. Sedangkan subkelompok II dengan jarak genetik 0,57 terdiri dari *G. verstegii*, *A. malaccensis* dan *A. hirta*. Terpisahnya *G. verstegii* disebabkan oleh asal genus yang berbeda.

Tujuan

Praktikan mengetahui kekerabatan/keragaman *plantlet* secara molekular melalui teknik RAPD.

Alat:

- a. *Microtube*.
- b. Gelas piala.
- c. Gelas ukur.
- d. Sarung tangan (*Gloves*).
- e. *Gel Doc*.
- f. Lumpang dan alu (*mortar and pestle*)
- g. Neraca analitik.
- h. *Vorteks*.
- i. PCR.
- j. Alat elektroforesis.
- k. Mikropipet.
- l. *Tips* mikropipet.
- m. *Microwave*.
- n. *Centrifuge*.
- o. *Heat block/Waterbath*.
- p. Desikator.
- q. *Freezer*/kulkas.

Bahan:

- a. Daun muda berbagai *plantlet* klon gaharu.
- b. *Buffer TE*.
- c. PVP (*polyvinylpyrrolidone*) 2%.
- d. *Agarose*.
- e. ETBR.
- f. *Buffer* ekstrak CTAB.
- g. *Choloroform:Isoamyl alcohol*.
- h. Fenol.

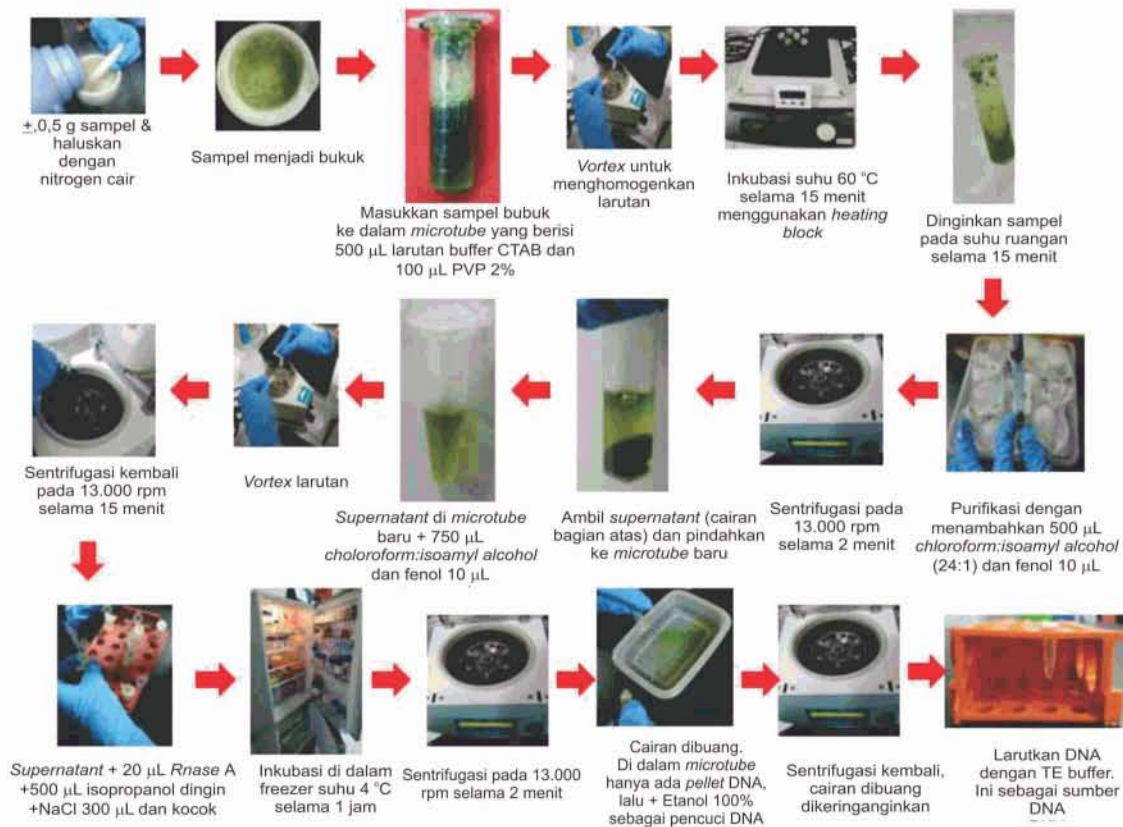
- i. Propanol.
- j. NaCl.
- k. Etanol 100%.
- l. *Taq Polymerase*.
- m. Primer (10 jenis primer acak 10-mer yang digunakan untuk seleksi primer-primer yang mampu menghasilkan pita DNA yang polimorfim yaitu OPA 01, OPB 02, OPC 02, OPC 04, OPD 01, OPD 02, OPD 03, OPD 04, OPE 02, dan OPE 03 (Operon, Alameda, USA).

Instruksi Latihan Teknik RAPD:

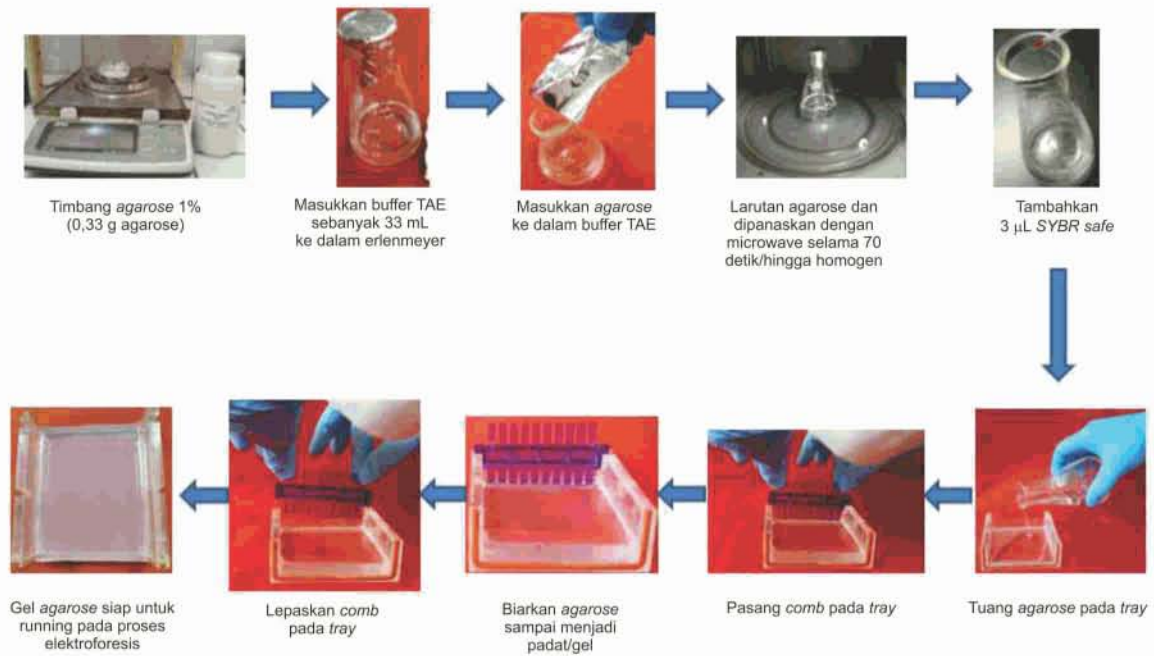
1. Timbang *plantlet* daun gaharu $\pm 0,5$ g dan masukkan ke dalam lumpang.
2. Tuang nitrogen cair ke dalam lumpang dan gerus sampel dengan alu hingga halus seperti bubuk tepung.
3. Masukkan sampel daun yang sudah halus seperti bubuk tepung tersebut ke dalam *microtube* yang berisi *buffer* ekstraksi CTAB sebanyak 500 μL dan 100 μL PVP 2%.
4. *Vortex* sampel dan inkubasi di dalam *waterbath/heating block* pada suhu 65 °C selama 60 menit. Setiap 15 menit sampel diangkat dan dikocok.
5. Dinginkan sampel pada suhu ruangan selama 15 menit dan purifikasi dengan menambahkan 500 μL *chloroform : isoamyl alcohol* (24 : 1) dan fenol 10 μL .
6. Goyang sampel tersebut perlahan-lahan dan sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit.
7. Ambil *supernatant* (cairan bagian atas) dan pindahkan ke dalam *microtube* baru.
8. Tambahkan 750 μL *chloroform : isoamyl alcohol* dan fenol 10 μL .
9. *Vortex* larutan dan sentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 15 menit.
10. Ambil *supernatant* dan pindahkan ke dalam *microtube* baru dan tambahkan 20 μL *RNase A* (10 mg/mL) ke dalam *microtube*.
11. Tambahkan 500 μL isopropanol dingin dan NaCl 300 μL ke dalam *microtube* dan kocok.
12. Inkubasi di dalam *freezer* pada suhu 4 °C selama 1 jam.
13. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 2 menit dan cairan dibuang sehingga yang tertinggal di dalam *microtube* adalah *pellet* DNA.
14. Tambahkan etanol 100% sebanyak 300 μL sebagai pencuci DNA.
15. Sentrifugasi kembali dan cairan dibuang.
16. Keringanginkan sampel yang ada di dalam *microtube* di dalam desikator selama 15 menit.
17. Larutkan DNA dengan menambahkan larutan TE *buffer*. Alur isolasi DNA (Gambar 44).
18. Uji kualitas DNA dengan menimbang *agarose* 1% (0,3 g *agarose* dalam 30 mL TAE) untuk proses elektroforesis. Alur pembuatan *agarose* (Gambar 45).
19. Ambil 3 μL DNA ditambahkan 2 μL *blue juice* 10x dan *dirunning* pada 100 volt selama ± 30 menit.
20. Hasil elektroforesis direndam di dalam larutan etidium bromida (ETBR) 10 μL per 200 mL *aquadest* selama 30 menit agar DNA terlihat. Namun jika *agarose* sudah diberi pewarna

DNA SYBR safe, hasil elektroforesis bisa langsung dilihat di UV transiluminator/Gel doc (Gambar 46).

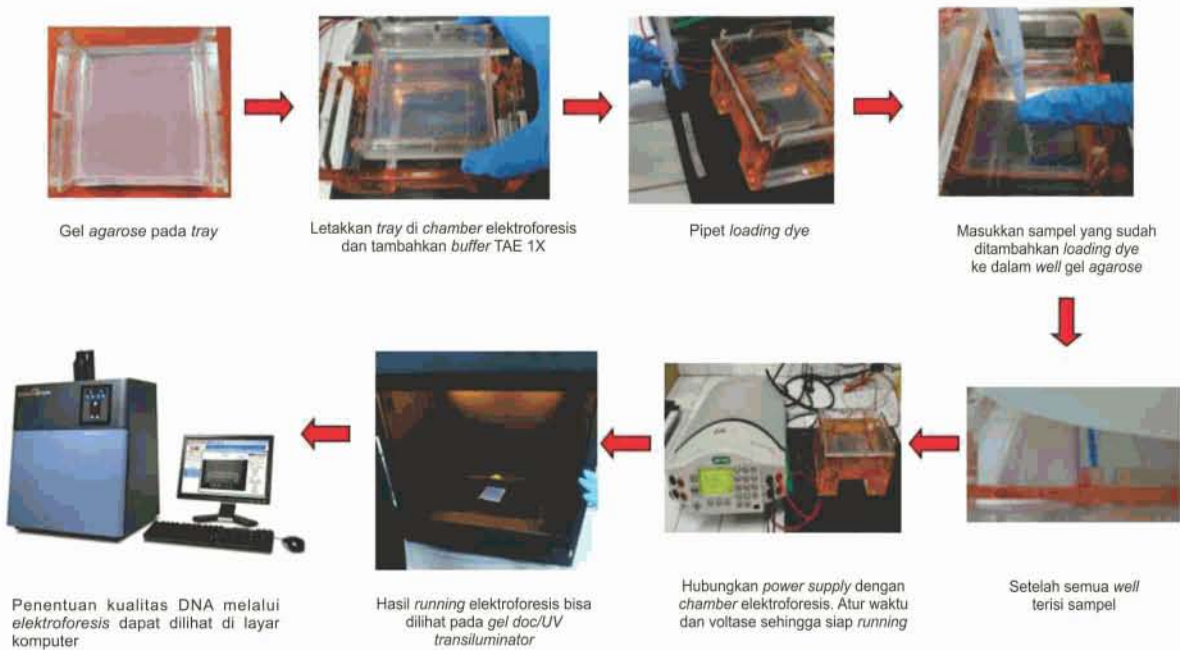
21. Reaksi PCR menggunakan bahan yang tertera pada Tabel 22 dan tahapan PCR pada Tabel 23.
22. Keragaman pola pita DNA diamati dari pita yang dihasilkan dari proses PCR. Terjemahkan pola pita DNA dalam data biner berdasarkan ada tidaknya pita, dengan ketentuan nilai 0 (nol) tidak ada pita, dan nilai 1 (satu) untuk adanya pita pada suatu posisi yang sama dari setiap individu yang dibandingkan. Cara pemberian nilai dapat dilihat pada Gambar 47.
23. Lakukan pengelompokkan data matriks dan pembuatan dendrogram dengan metode *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic* (UPGMA), fungsi *Similarity Qualitative* (SIMQUAL) menggunakan program komputer *NTSYSpc*.



Gambar 44 Alur kerja isolasi DNA



Gambar 45 Alur kerja pembuatan gel agarose 1%



Gambar 46 Alur kerja elektroforesis

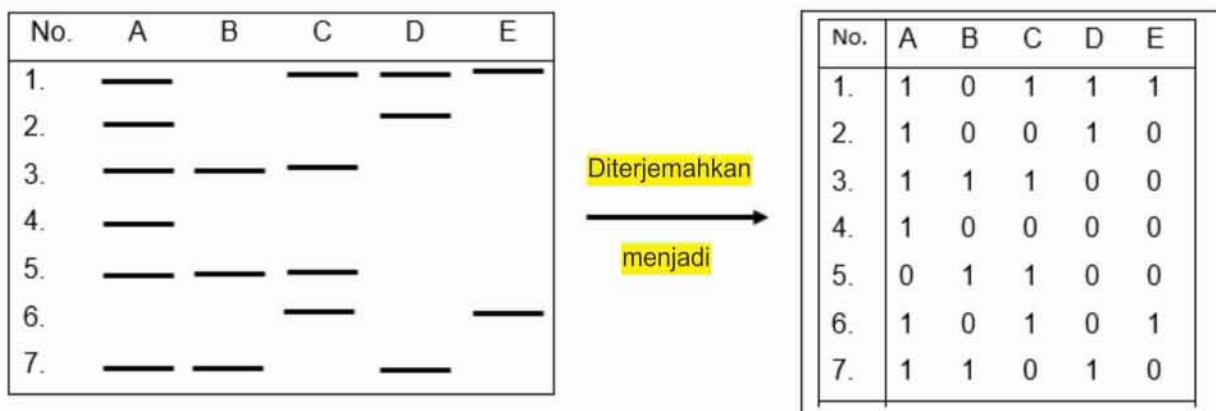
Amplifikasi DNA dengan PCR

Tabel 22 Komponen bahan yang digunakan dalam reaksi PCR

No.	Nama Bahan	1 Sampel Reaksi	X Sampel Reaksi
1.	H ₂ O	2 µL	X x 2 µL
2.	Green Go Tag /HotStar Mix	7,5 µL	X x 6,5 µL
3.	Primer	1,5 µL	X x 1,5 µL
4.	Cetakan DNA	2 µL	X x 2 µL

Tabel 23 Tahapan dalam proses PCR

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Jumlah Siklus
Pre-denaturasi	95	10	1
<i>Denaturation</i>	95	1	35
<i>Annealing</i>	37	3	
<i>Extention</i>	72	2	
<i>Final Extention</i>	72	10	1



Gambar 47 Pola terjemahan pita DNA

DAFTAR PUSTAKA

- Abdin MZ. 2017. Plant Biotechnology: Principles and applications. Singapore (SG): Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- Akbar A, Faridah E, Indrioko S, Herawan T. 2017. Induksi Tunas, Multiplikasi dan Perakaran *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke Secara *In Vitro*. Jurnal PemuliaanTananam Hutan 11(1): 155-68.
- Andersen, Marit B. 2019. Prevention and Control of Infection in Hospitals. Switzerland (CH): Springer International Publishing.
- Anis M. 2016. Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation, and Crop Improvement. Singapore (SG): Springer Singapore.
- Cadnum JL, Shaikh AA, Piedrahita CT, Sankar T, Jencson AL, Larkin EL, Ghannoum MA, Donskey CJ. 2017. Effectiveness of Disinfectants Against *Candida auris* and Other *Candida* Species. Infection Control and Hospital Epidemiology 38(10):1240-3.
- Campagna MV, Faure-Kumar E, Treger JA, Cushman JD, Grogan TR, KasaharaN, Lawson GW. 2016. Factors in the Selection of Surface Disinfectants for Use in a Laboratory Animal Setting. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 55(2):175-88.
- Cassells AC, O'Herlihy EA. 2003. Micropropagation of Woody Trees and Fruits: Pathogen Elimination and Contamination Management. Forestry Sciences. Germany (DE): Kluwer Academic Publisher. pp.103-28.
- Chauhan SR, Jha SK. 2018. Genetic Stable Mass Propagation of *Acacia mangium* Willd. from Mature Plus Tree. Indian Journal of Biotechnology 17:128-33.
- Damajanti N, Anis S. 2015. Pengembangan Metode Sterilisasi pada Berbagai Eksplan Guna Meningkatkan Keberhasilan Kultur Kalus Kencur (*Kaempferia galanga* L.). Agritech 17(1):55-64.
- Dewanto MW. 2014. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh BAP dan NAA terhadap Pertumbuhan Tunas Ulin (*Eusideroxylon zwageri* T. et B.) Secara *In Vitro*. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Dias MI, Sousa, João M, Alves, Rita C, Ferreira, Isabel CFR. 2016. Exploring Plant Tissue Culture to Improve the Production of Phenolic Compounds: A Review. Industrial Crops and Products 82:9-22.
- Elbasheer YHA, Osman EE. 2017. Effective and Economical Explants Surface Sterilization Protocol for Microbial Contamination of Field Grown Explants *In Vitro* Cultures of Some Forest Trees:*Acacia senegal* as A Model. Basic Research Journal of Microbiology 4(2):12-7.
- Fauziaturrahmi. 2020. Induksi Alkaloid Kalus Johar (*Senna siamea* Lam) dengan Pemberian Beberapa Konsentrasi Prekursor Tirosin. [Thesis]. Padang (ID): Universitas Andalas.

- Febriyanti E, Suwirman, Idris M. 2013. Induksi Perakaran Tunas *Tetrastigma rafflesiae* Miq. pada Media Murashige-Skoog dengan Penambahan Beberapa Konsentrasi Indole-3-Butyric Acid (IBA) Secara *In Vitro*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas* 2(3):188-93.
- Gantait S, Kundu S, Das PK. 2018. Acacia: An exclusive survey on *In Vitro* Propagation. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17(2):163-77.
- George EF, Hall, MA, Klerk GJD. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd ed. New York (US): Springer. pp.205-26.
- Girijashankar V. 2011. Micropropagation of Multipurpose Medicinal Tree *Acacia auriculiformis*. *Journal of Medicinal Plant Research* 5(3):462-6.
- Handayani RS. 2012. *Rekayasa Teknologi Sambung Mikro dan Setek Mikro pada Tanaman Manggis (Garcinia mangostana)*. [Disertasi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Harjanto H, Rakhmania N. 2007. *Memperbanyak Tanaman Hias Favorit*. Jakarta (ID): Penebar Swadaya.
- Harni R, Wahyuno D, Trisawa IM. 2020. Perspektif Review Penelitian Tanaman Industri. *E-Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 18:2.
- He ML, QI SY, Hu J. 2005. Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Aquilaria gallocha*. *Journal of Zhejiang University Science C* 6B(8):849-52.
- Hugget JM. 2015. Clay Minerals. *Encyclopedia of Geology* 1:358-65.
- Ilham M, Sugiyono, Prayoga L. 2019. Pengaruh Interaksi BAP dan IAA terhadap Multiplikasi Tunas Talas Satoimo (*Colocasia esculenta* (L.) Schott var. *antiquorum*) secara *In Vitro*. *Jurnal Ilmiah Universitas Jenderal Soedirman* 1(2):48-55.
- Ismail, Syafikah F, Malahubban, Masnindah, Sajili, Mohammad Hailmi, Aziz A, Fitri Z. 2016. Plant Growth-promoting Properties of Cultivable Endophytic Root Nodule Bacterial Isolates from *Acacia mangium* Willd. *Research in Plant Biology* 6:14-8.
- Jain S, Reed M. 2019. Laminar Air Flow Handling Systems in the Operating Room. *Surgical Infections* 20(2):151-8.
- Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. 2020 Persistence of Corona Viruses on Inanimate Surfaces and Their Inactivation with Biocidal Agents. *Journal of Hospital Infection* 104(3):246-51.
- Karolak IG, Konka KH, Zarzycka M, Ku'zma L. 2020. The Stimulatory Effect of Purine-Type Cytokinins on Proliferation and Polyphenolic Compound Accumulation in Shoot Culture of *Salvia viridis*. *Biomolecules* 10:178.
- Kekuda TRP. 2016. Isolation, Characterization and Antimicrobial Potential of Endophytic Actinomycetes. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences* 5(7): 100-16.

- Koike I, Taniguchi K, Shimomura K, Umehara M. 2017. Dynamics of Endogenous Indole-3-acetic Acid and Cytokinins during Adventitious Shoot Formation in Ipecac. *Journal of Plant Growth Regulation* 36(4):805-13.
- Malav S, Saxena N. 2018. Assessment of Disinfection and Cleaning Validation in Central Laboratory, MBS Hospital, Kota. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences* 7(10):1259-62.
- Mashud N. 2013. Efek Zat Pengatur Tumbuh BAP terhadap Pertumbuhan *Plantlet* Kelapa Genjah Kopyor dari Kecambah yang Dibelah. *Buletin Palma* 14(2):82-7.
- Maya FD. 2019. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) dan 6-Benzyl Amino Purine (BAP) terhadap Induksi Kalus dan Profil Metabolit Sekunder Kultur Kalus Daun Tapak Liman (*Elephantopus scaber* L.). [Skripsi]. Surabaya (ID): Universitas Airlangga.
- Mazri MA. 2015. Role of Cytokinins and Physical State of the Culture Medium to Improve In Vitro Shoot Multiplication, Rooting and Acclimatization of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. *Boufeggous*). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 24(3): 268-75.
- Mulyono D. 2010. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Auksin: Indole Butiric Acid (IBA) dan Benzil Amino Purine (BAP) dan Kinetin dalam Elongasi Pertunasan Gaharu (*Aquilaria beccariana*). *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 12(1):1-7.
- Old KM, See SS, Sharma JK. 1997. *Diseases of Tropical Acacias*. Jakarta(ID): CIFOR.
- Opabode JT, Akinyemiju OA. 2017. Somatic Embryogenesis and Regeneration of Five Multipurpose Cassava Landraces Extensively Integrated In African Cropping System. *Journal of Crop Improvement* 31(1):56-71.
- Oratmangun KM, Pandiangana D, Kandao FE. 2017. Deskripsi Jenis-Jenis Kontaminan dari Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Jurnal MIPA Unsrat Online* 6(1):47-52.
- Philip GC, Garda M. 2019. Plant Tissue Culture Media and Practices: An overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 55(3):1-8.
- Putri AI, Herawan T, Prastyono, Haryjanto L. 2017. Pengaruh Teknik Sterilisasi Explan terhadap Tingkat Perolehan Kultur Jaringan Aksenik Ramin (*Gonystylus bancanus*). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 11(2):131-8.
- Rica FN, Roosmarinto, Martono B. 2019. Perbedaan Jumlah Angka Kuman Udara Sebelum dan Sesudah Penggunaan Dua Ultraviolet Tube di Ruang Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analisis Kesehatan. [Thesis]. Yogyakarta (ID): Politeknik Kesehatan, Kementerian Kesehatan.

- Ridhawati A, Anggraeni TDA, Purwati RD. 2017. Pengaruh Komposisi Media terhadap Induksi Tunas dan Akar Lima Genotipe Tanaman Agave pada Kultur *In Vitro*. Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri 9(1):1-9.
- Saikia M, Shrivastava K, Sureshkumar SS. 2012. An Efficient Protocol for Callus Induction in *Aquilaria malaccensis* Lam. using Leaf Explants at Varied Concentrations of Sucrose. International Journal of Plant Research 2(6):188-94.
- Salih MI, Shmarey IAA, Dabagh FMKA. 2016. Indole-3-Butyric Acid and Naphthalene Acetic Acid impact on *In Vitro* of Mariana and Nemaguard Root Stocks. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science 9(7):50-3.
- Sing CR. 2018. Review on Problems and Its Remedy in Plant Tissue Culture. Asian Journal of Biological Sciences 11(4):165-72.
- Singh B, Sharma S, Rani G, Hallan V, Zaidi AA, Virk GS, Nagpal A. 2008. *In vitro* Micrografting for Production of Indian Citrus Ringspot Virus (ICRSV)-Free Plants of Kinnow Mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *C. Deliciosa* Tenora). Plant Biotechnology Reports 2:137-43.
- Sinha K, Deka AC. 2016. Effect of Osmotic Stress on *In Vitro* Propagation of *Musa* sp. (Malbhog variety). African Journal of Biotechnology 15(12):465-71.
- Sobhana P, Gopalakrishnan J, Jacob J, Sethuraj MR. 2001. Physiological and Biochemical Aspects of Stock-Scion Interaction in *Hevea brasiliensis*. Indian Journal of Natural Rubber Research 14(2):131-6.
- Sulasiah A, Tumilisar C, Lestaria T. 2015. Pengaruh Pemberian Jenis dan Konsentrasi Auksin terhadap Induksi Perakaran pada Tunas *Dendrobium* sp Secara *In Vitro*. Jurnal BIOMA 11(2):153.
- Sumarna Y. 2015. Kayu Jati Budi Daya dan Prospek Bisnis. Jakarta(ID): Penebar Swadaya.
- Sunarti S, Putri AI. 2009. Inisiasi Tunas Acacia Hibrid (*Acacia mangium* x *A. auriculiformis*) Secara *In Vitro*. Jurnal Pemuliaan Hutan 3(1):11-22.
- Swenson VA, Stacy AD, Gaylor MO, Ushijima B, Philmus B, Cozy LM, Videau NM, Videau P. 2018. Assessment and Verification of Commercially Available Pressure Cookers for Laboratory Sterilization. PLoS ONE 13(12)doi.org/10.1371/journal.pone.0208769.
- Syahid SF, Kristina NN. 2012. Pengaruh Auksin IBA dan NAA terhadap Induksi Perakaran Inggu (*Ruta graveolens* L.) *In Vitro*. Jurnal Penelitian Tanaman Industri 20(3):122-9.
- Trigiano RN, Gray DJ (eds). 1999. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. 2nd ed. Boca Raton (US): CRC Press.
- Trigiano R, Gray DJ (eds). 2011. Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology. Boca Raton (US): CRC Press.

- Toruan MN, Lukman, Purwito A. 2007. Kompatibilitas Sambung Mikro *Cinchona ledgeriana* dengan *C. Succirubra* Berdasarkan Anatomi dan Elektroforesis SDS-PAGE Protein Daerah Pertautan. *Menara Perkebunan* 75(2):56-69.
- Toungos MD. 2018. Plant Growth Substances in Crop Production: A Review. *International and Innovative Agriculture and Biology Research* 6(3):1-8.
- Vazquez SM, Larranaga N, Uberhuaga EC, Braga EJB. 2014. Bacterial Contamination of *In Vitro* Plant Cultures: Confounding Effects on Somaclonal Variation and Detection of Contamination in Plant Tissues. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 119(3):533-41.
- Wahyuni H, Wulandari RS, Muflihati. 2019. Konsentrasi IAA (*Indole Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) pada Kultur Jaringan Ulin (*Eusideroxylon zwageri*). *Jurnal Hutan Lestari* 7(4):1660-7.
- Wolf JB. 2015. *Tissue Culture Methods*. Baltimore (US): University of Maryland.
- Wu HC, du Toit ES, Reindhardt CF. 2007. Micrografting of *Protea cynaroides*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 89:23-8.
- Yadav R, Kumar S, Yadav N. 2015. An Improved Micropropagation and Assessment of Genetic Fidelity in Multipurpose Medicinal Tree, *Acacia auriculiformis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India - Section B: Biological Sciences* 86(4).
- Yunida E. 2019. Studi Pengakaran *In Vitro* dan Aklimatisasi *Plantlet* Pisang Ambon Kuning (*Musa paradisiaca* Linn.). [Skripsi]. Bandar Lampung (ID): Universitas Lampung.

Catatan:

TENTANG PENULIS



Dewi Rahmawati adalah asisten peneliti di Laboratorium Bioteknologi SEAMEO BIOTROP. Beliau menyelesaikan strata satu dari Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor (IPB) dan strata dua dari Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (IPB). Beliau banyak membimbing mahasiswa magang dan mahasiswa yang melakukan penelitian dari berbagai universitas di Indonesia. Beliau sering menjadi narasumber pelatihan molekuler dan berpengalaman dipenelitian marka molekuler serta kultur jaringan. Sertifikat yang pernah diperoleh antara lain:

1. Webinar Kriteria Penting Memilih *Trichoderma* berkualitas. 20 Oktober 2020. Penyelenggara BPI (*Best Planter Indonesia*).
2. Training Online Teknik Pengelolaan Limbah Laboratorium. 6 Oktober 2020. Penyelenggara Lab Mania.
3. Webinar Gulma dan Herbisida (Problematika & Solusinya). 6 Oktober 2020. Penyelenggara BPI (*Best Planter Indonesia*).
4. Webinar Pengendalian Rayap di Perkebunan Sawit. 29 September 2020. Penyelenggara BPI (*Best Planter Indonesia*).
5. Webinar *Molecular Approach of Pathogen Detection: Enhancement of Food Safety Level*. 26 September 2020. Penyelenggara SEAFast Center.
6. Webinar Mewaspada Degradasi Tanah Menghindari Ancaman Ketidakberlanjutan Perkebunan. 22 September 2020. Penyelenggara BPI (*Best Planter Indonesia*).
7. Webinar Bioteknologi untuk Peningkatan Produktivitas Tanaman. 16 September 2020. Penyelenggara Kementerian Pertanian.
8. Webinar Strategi Membangun Motivasi di Era Pandemi dan Trek Produksi. 14 September 2020. Penyelenggara BPI (*Best Planter Indonesia*).
9. Webinar Ancaman Ganoderma di Hutan Tanaman Industri. 1 September 2020. Penyelenggara BPI (*Best Planter Indonesia*).
10. Webinar Peran Mikoriza Dalam Pertumbuhan Tanaman. 25 Agustus 2020. Penyelenggara BPI (*Best Planter Indonesia*).
11. Webinar *An Update on ISO Method for Your Microbiology Laboratory* 13 Agustus 2020. Penyelenggara Merck.
12. Webinar Industrialisasi Tumbuhan Obat berbasis Riset. 12 Agustus 2020. Penyelenggara Universitas Lambung Mangkurat.
13. Webinar Sumber Daya Lahan Basah, Peranannya dalam Pengembangan Obat Covid-19 dan Koleksi Kultur Mikroorganisme Indonesia. 25 Juli 2020. Penyelenggara PERMI.
14. Webinar Potensi dan Pengembangan Tanaman Rempah dan Obat. 24 Juli 2020. Penyelenggara Kementerian Pertanian.

15. Webinar Regulasi tentang Produk Rekayasa Genetika (PRG) pada sektor pertanian, Perbaikan Genetik Tanaman & Potensinya untuk Industri Pertanian di Indonesia, Teknik Pengeditan Genom dan Aplikasi pada Tanaman. 21 Juli 2020. Penyelenggara Konsorsium Bioteknologi Indonesia & Badan Standarisasi Nasional.
16. Webinar *Precision Breeding for Adaptation to Climate Change*. 16 Juli 2020. Penyelenggara Departemen AGH, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
17. Webinar Peningkatan Produksi Sayuran Nasional untuk Mengurangi Ketergantungan Impor. 9 Juli 2020. Penyelenggara Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
18. Webinar Diversifikasi Pangan Lokal untuk Ketahanan Pangan. Jakarta 2 Juli 2020. Penyelenggara Kementerian Pertanian Indonesia.
19. Webinar *Advance Technique in Producing Mutated and Variegated Plant in Agriculture*. Juni 2020. Penyelenggara Merck.
20. Bimbingan Teknis "Hidup Sehat dengan Pangan Fungsional Berbasis Beras". 30 Juni 2020. Penyelenggara Kementerian Pertanian Indonesia.
21. Webinar Produksi dan Agronomi Tanaman Sumber Karbohidrat untuk Menopang Diversifikasi Karbohidrat dan Eskpor. 11 Juni 2020. Penyelenggara Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
22. *Workshop The Art of Patent Drafting*. 13 Mei 2020. Penyelenggara LIPI.
23. Webinar Potensi Sumber Daya Genetik Tanaman Lokal Indonesia untuk Penanggulangan Covid-19. 10 Mei 2020. Penyelenggara ICTS.
24. Seminar Deteksi Dini Covid: Rapid Test dan Swab Test. 12 Mei 2020. Penyelenggara Universitas Atmajaya,.
25. Pelatihan *Next Generation Sequencing for Genomic & Transcriptomic Research* di Lampung, 19-21 November 2019.
26. Teknologi PCR Berbasis Digital (ddPCR) "*Breaking The limits on Detection Disease, Halal & GMO Issues*". LIPI Cibinong, 29 Oktober 2019.
27. Seminar Benih Produk Rekayasa Genetik (PRG) sebagai Salah Satu Strategi Penguatan Ketahanan Pangan Indonesia di Swiss-Belhotel, Bogor 22 Juli 2019.
28. Seminar "*Fast Forwarding Agriculture: from Research to Industry*". Bogor 2 April 2019. Penyelenggara Merck.
29. Seminar Pemuliaan Berbasis Biologi Molekuler pada Tanaman dan Ternak untuk Meningkatkan Ketahanan Pangan di Indonesia. Bogor 26 Maret 2019.
30. *Training Course on Isolation and Identification of Aspergillus, Penicillium and Talaromyces*. Bogor, 28-31 August 2018.
31. Seminar Nanotechnology Research in Indonesia : Status, Prospects, and Challenges. Bogor 29 June 2018.
32. One day seminar "*South East Asia Proteomics Roadshow*". IPB ICC, 8 Mei 2018.
33. "*Halal Identification using Real Time PCR Methode*" IPB ICC 28 February 2018.
34. *Workshop HPC Tools For Bioinformatics*. Cibinong, LIPI, 12 - 15 Desember 2017.
35. "*Workshop on Genetic Data Analysis*" World Class Professor Program Scheme B, Prof. Emer. Ko Harada. Bogor, Institut Pertanian Bogor, 18 - 19 Oktober 2017.



Edhi Sandra adalah dosen di Jurusan Konservasi Keanekaragaman Tumbuhan, Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor (IPB). Beliau menyelesaikan strata satu dari Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor (IPB) dan strata dua dari Program Studi Ilmu Pengetahuan Kehutanan, Institut Pertanian Bogor (IPB). Penelitian skripsi berjudul Kultur Meristem Anggrek *Laeliocattleya laurie* Linn Westernberger. Penelitian S3 (tidak tuntas) berjudul Kultur Jaringan *Rafflesia arnoldii*. Saat ini beliau menjabat sebagai Kepala Unit Kultur Jaringan, Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata (KSHE), Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor (IPB) dan Kepala Laboratorium Bioteknologi Lingkungan, Lembaga Pengabdian Pada Masyarakat (LPPM) Institut Pertanian Bogor (IPB). Selain itu, beliau adalah pemilik Esha Flora, *Plant and Tissue Culture*. Beliau juga banyak melakukan penelitian kultur jaringan keanekaragaman plasma nuftah Indonesia dan memiliki lebih dari 350 kultur tumbuhan berbagai jenis. Sejak tahun 1994, beliau merintis kultur jaringan skala rumah tangga hingga saat ini. Beliau sering menjadi narasumber seminar dan pelatihan kultur jaringan, serta mendampingi perorangan maupun perusahaan yang ingin mengembangkan dan mengelola laboratorium kultur jaringan. Beliau membentuk group alumni peserta pelatihan Esha Flora yang ribuan anggotanya tersebar di seluruh Indonesia. Beliau menulis berbagai buku, di antaranya Buku Panduan dan Buku Praktik Pelatihan Kultur Jaringan Esha Flora, Kultur Jaringan Anggrek Skala Rumah Tangga, Kiat Mengatasi Permasalahan Praktis Anggrek Rajin Berbunga, Cara Mudah Memahami dan Menguasai Kultur Jaringan Skala Rumah Tangga, dan Rahasia Membuat Tanaman Mutasi dan Variegata. Sertifikat yang pernah diperoleh antara lain:

1. Sertifikat Pelatihan dan Pendidikan Online “Menjadi Ekspertir Berbasis SKKNI” Angkatan II Tanggal 2 Juni – 20 Juni 2020.
2. Serifikat Profil Inspiratif & Perubahan Indonesia. Pribadi Kreatif & Inovatif. Menghasilkan SDM dan Produk Teknologi Berkualitas serta Meningkatkan Eksistensi Indonesia. 23 Agustus 2019.
3. Sertifikat Rekor Prestasi Indonesia. Kategori Rekor Prestasi Profesional. 26 Juli 2019.
4. Tanda Kehormatan Satyalancana Karya Satya XX Tahun. Presiden RI. Joko Widodo.

Catatan:

Kelestarian sumber daya dan produksi tanaman dapat dilakukan melalui upaya pembudidayaan. Salah satu alternatif pembudidayaan yang efisien adalah dengan menggunakan teknologi kultur jaringan. Strategi pemuliaan tanaman melalui teknologi kultur jaringan sangat penting dilakukan untuk mengantisipasi berbagai permintaan konsumen dan proyeksi perubahan keadaan iklim atau lingkungan di masa kini dan masa yang akan datang. Buku panduan ini membahas secara ringkas dan jelas mengenai teknologi kultur jaringan pada tanaman, berdasarkan hasil penelitian dan pengalaman di bidang kultur jaringan, serta studi berbagai literatur yang mengulas tentang kultur jaringan.

Buku panduan ini memuat Pengenalan tentang Teknologi Kultur Jaringan; Pengenalan Peralatan Kultur Jaringan dan Fungsinya; Sanitasi Ruang Laboratorium; Pembuatan *Hand Sanitizer*; Prosedur Penggunaan dan Pemeliharaan *Laminar Air Flow*; Sterilisasi Peralatan Gelas, Alat Diseksi, *Aquadest* Steril dan Media Kultur; Penyiapan Sumber Eksplan di Lapangan; Sterilisasi Eksplan; Preparasi Pembuatan Larutan Stok dan Media Kultur Jaringan; Induksi Multiplikasi Eksplan; Elongasi Eksplan; Induksi Perakaran Eksplan; Pemeliharaan Eksplan di Ruang Inkubasi Laboratorium; Penanganan Kontaminasi; Aklimatisasi; Pemanfaatan Teknologi Kultur Jaringan (interaksi kultur ganda *in vitro*, mikrografting *in vitro*, dan variasi genetik *plantlet in vitro*). Pemaparan yang jelas dan terarah menjadikan buku panduan ini bermanfaat bagi para peminat teknologi kultur jaringan.

SEAMEO BIOTROP

Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology

Jalan Raya Tajur Km. 6

Bogor 16134, Indonesia

Phone : +62-251-8323848

Fax : +62-251-8326851

Email : kmd@biotrop.org

www.biotrop.org

