

**Petunjuk Praktikum**

**KULTUR JARINGAN TUMBUHAN  
(SBG 147)**



**Disusun Oleh :**

**Victoria Henuhili, M.Si.**

**Paramita Cahyaningrum K., M.Sc.**

**Penulisan Petunjuk Praktikum ini didanai dengan Dana PNB  
FMIPA UNY Tahun 2012**

## **Kata Pengantar**

Petunjuk praktikum Kultur Jaringan Tumbuhan (SBG 147) ini disusun untuk membantu mahasiswa dalam melaksanakan praktikum Kultur Jaringan Tumbuhan. Di dalam buku ini diberikan panduan langkah-langkah praktis perbanyakan tanaman secara *in-vitro* sejak dari penyiapan ruang laboratorium yang akan digunakan untuk praktikum, persiapan peralatan dan medium serta melaksanakan praktek kultur jaringan.

Materi praktikum ini merupakan materi dasar yang bertujuan memperkenalkan cara kerja yang aseptis dan ketrampilan perbanyakan tanaman dengan sistem kultur jaringan. Mahasiswa yang ingin mengembangkan diri dan memperdalam ilmu pengetahuan di bidang kultur jaringan tumbuhan dapat menjadikan praktikum ini merupakan pengalaman yang berharga untuk melangkah ke metode budidaya tanaman *in-vitro* lainnya yang lebih rumit.

Praktek kultur jaringan ini memerlukan ketelatenanan dan kesabaran dalam pelaksanaan. Cara kerja yang serampangan dan tidak memperhatikan prinsip sterilitas akan menyebabkan kegagalan dalam memperoleh hasil praktikum yang bagus. Mahasiswa diharapkan membaca dengan seksama dan melakukan sesuai petunjuk cara kerja atau yang diarahkan oleh pemandu acara praktikum.

Buku petunjuk praktikum ini masih jauh dari sempurna. Saran dan kritik yang membangun demi penyempurnaan buku ini masih sangat diharapkan. Semoga buku ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang membaca.

Yogyakarta, Agustus 2012

Penyusun

## **TATA TERTIB PRAKTIKUM KULTUR JARINGAN TUMBUHAN**

Praktikum ini merupakan bagian dari matakuliah Kultur Jaringan Tumbuhan (SBG 147) yang harus diikuti oleh mahasiswa yang mengambil matakuliah Kultur Jaringan Tumbuhan (SBG 246)

Beberapa hal yang perlu diperhatikan sebelum mengikuti praktikum Kultur Jaringan Tumbuhan:

1. Mahasiswa peserta praktikum harus mengikuti semua topik yang diselenggarakan
2. Mahasiswa yang tidak dapat datang mengikuti acara praktikum, harus inhal, dan mempersiapkan sendiri bahan dan alat yang dibutuhkan untuk topik yang bersangkutan
3. Mahasiswa akan dibagi dalam kelompok, tiap kelompok meminjam alat-alat yang dibutuhkan dan mempersiapkan segala sesuatu sesuai dengan topik praktikum diselenggarakan hari itu
4. Setiap kelompok bertanggungjawab atas alat-alat yang dipinjam. Kerusakan atau hal-hal yang menyebabkan tidak berfungsinya alat-alat yang dipinjam selama praktikum berjalan menjadi tanggung-jawab anggota kelompok
5. Setelah selesai praktikum, semua alat yang dipinjam harus dikembalikan dalam keadaan bersih
6. Pada akhir praktikum akan diselenggarakan ujian praktikum
7. Laporan praktikum diserahkan paling lambat pada waktu responsi
8. Nilai Akhir Praktikum meliputi :
  - Keseriusan dan Aktivitas selama praktikum
  - Laporan Hasil Praktikum
  - Ujian Praktikum (Responsi)

## DAFTAR ISI

1. Preparasi Media Kultur Jaringan	1
2. Kultur Kalus	9
3. Kultur Embrio dan Kotiledon	13
4. Induksi Embriogenesis Somatik	16
5. Kultur Jaringan Tanaman Anggrek (Perbanyak Vegetatif)	19
6. Penyemaian Biji Anggrek	22
7. Overplanting Bibit Anggrek	27
Daftar Pustaka	30

**A. Topik 1. : Preparasi Media Kultur Jaringan Tanaman**

**B. Tujuan** : Mengetahui cara pembuatan medium kultur jaringan tanaman

**C. Prinsip** :

Pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* sangat ditentukan oleh empat faktor utama yaitu sifat genetik eksplan yang akan ditanam, nutrisi, faktor fisik seperti cahaya, suhu dan pH, serta senyawa organik seperti vitamin dan zat pengatur tumbuhan (ZPT). Meskipun sifat genetik tanaman sangat menentukan hasil yang akan diperoleh, faktor-faktor lain sangat menentukan bagaimana sifat genetik tersebut akan terekspresikan. Nutrisi merupakan faktor yang penting dalam keberhasilan kultur jaringan tanaman karena tanaman memerlukan bantuan nutrisi saat belum autotrof di dalam kondisi *in vitro*. Faktor-faktor fisik seperti suhu, cahaya, pH dan konsentrasi O<sub>2</sub> akan berpengaruh terhadap proses-proses seperti penyerapan air, evaporasi, dan fotosintesis. Senyawa organik ZPT diperlukan dalam jumlah sedikit untuk membantu dalam pembelahan sel serta diferensiasi sel-sel menjadi organ tertentu.

Pemberian nutrisi dalam jumlah dan perbandingan yang sesuai pada media *in vitro* sangat diperlukan untuk menghasilkan planlet sesuai yang diinginkan. Medium kultur jaringan yang terdiri dari unsur-unsur hara esensial makro maupun mikro, gula dan zat-zat organik, seperti vitamin dan hormon. Susunan zat-zat tersebut di dalam medium kultur jaringan bervariasi tergantung dari tujuan penggunaan media tersebut dalam kultur jaringan dan bahan yang akan dipakai. Salah satu medium yang banyak dipakai, terutama untuk tanaman-tanaman herba adalah medium dasar *Murashige* dan *Skoog* (medium MS). Media MS mengandung konsentrasi garam mineral yang tinggi dan senyawa N dalam bentuk NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dan NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Konsentrasi sukrose dan agar yang ditambahkan di dalam media juga akan bervariasi tergantung kebutuhan eksplan. Untuk satu liter media MS biasanya digunakan 30 gram sukrose dan 8 gram agar. Konsentrasi agar dapat bervariasi tergantung media yang diinginkan berupa media padat (solid), semi-solid atau cair.

Penambahan zat pengatur tumbuh yang seringkali digunakan dalam kultur jaringan tumbuhan adalah dari golongan auksin dan sitokinin. Auksin biasanya digunakan untuk induksi kalus (kadang bersama dengan sitokinin) dan induksi akar. Senyawa seperti 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sangat efektif dalam memicu pertumbuhan kalus. Auksin yang juga digunakan dalam kultur jaringan adalah naphthaleneacetic acid (NAA), indoleacetic acid (IAA), dan indolebutyric acid (IBA).

Dalam pembuatan media yang mengandung auksin, biasanya akan bersifat asam saat pengukuran pH sehingga perlu disesuaikan dengan penambahan basa untuk mencapai pH sekitar 5.7. sitokinin juga sering ditambahkan dalam media kultur jaringan. Sitokinin yang sering digunakan adalah kinetin, benzyl adenine (BA) dan zeatin. Sitokinin biasanya dibutuhkan untuk memicu pertumbuhan tunas, tetapi penggunaannya bersama dengan auksin juga mampu menginduksi kalus.

***D. Bahan dan alat :***

1. Timbangan analitik (BI-62 / JICA)
2. Timbangan Ohaus
3. Erlenmeyer 200 cc, 500 cc, 1000 cc
4. Gelas ukur 100 cc
5. Pengaduk
6. Pengaduk magnetik (BI-63 / JICA)
7. Pipet
8. Injektor
9. Kompor gas
10. Autoclav (BI-65 / JICA)
11. Alumunium foil
12. pH meter (BI-3 / JICA)
13. Kertas label
14. Zat-zat kimia dan hormon yang dibutuhkan untuk pembuatan media MS

**Tabel 1. Medium Murashige & Skoog**

<b>NO</b>	<b>UNSUR</b>	<b>UNTUK 1 L MEDIUM (mg / l)</b>
<b>1.</b>	<b>MAKRO</b> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub> CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	 1650 1900 440 370 170
<b>2.</b>	<b>UNSUR BESI</b> Na <sub>2</sub> .EDTA FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	 1492 1112
<b>3.</b>	<b>UNSUR MIKRO</b> MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> KI NaMoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	 2230 860 620 83 25 2,5 2,5
<b>4.</b>	<b>VITAMIN</b> Glycine Nicotinic acid Pyridoxine-HCl Thiamine-HCl	 100 25 25 5
	MYOINOSITOL SUKROSE AGAR pH	 100 mg 30 g 8 g 5,7 – 5,8

## ***E. Cara Kerja***

### **I. Preparasi Media Murashige & Skoog (Media MS)**

Sebelum membuat media MS, terlebih dahulu disiapkan larutan stok

- a. mikronutrient
- b. vitamin
- c. iron
- d. hormon.
- e. makro

#### ***1. Larutan Stok Mikronutrient 500 ml (100 kali konsentrasi)***

Timbang bahan-bahan kimia yang tersebut di bawah ini dengan timbangan analitik.

MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2230 mg
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	860 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg
KI	83 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	25 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,5 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,5 mg

- a. Masukkan bahan-bahan kimia yang telah ditimbang satu per satu ke dalam Erlenmeyer 500 ml yang telah berisi akuadest steril 300 ml. Setiap kali memasukkan bahan kimia harus segera diaduk/dilartukan. Setelah larut, bahan kimia berikutnya dimasukkan.  
Cara memasukkan seperti ini untuk menghindari terjadinya endapan.  
Pengadukan dapat dilakukan dengan menggunakan pengaduk magnetik
- b. Setelah semua bahan kimia masuk, dan larut, tambahkan akuadest sampai volume larutan menjadi 500 ml
- d. Tutup gelas Erlenmeyer yang berisi larutan mikronutrient
- e. Beri label : MIKRO, MS 100 x, 5 ml / l  
Artinya untuk membuat 1 liter medium MS, diperlukan 5 ml larutan mikronutrient stok



**2. Larutan Stok Vitamin 200 ml (50 kali konsentrasi)**

- a. Timbang bahan-bahan yang tersebut di bawah ini dengan timbangan analitik
- |                |          |
|----------------|----------|
| Glycine        | 100,0 mg |
| Nicotinic acid | 25,0 mg  |
| Pyridoxine-HCl | 25,0 mg  |
| Thiamin-HCl    | 5,0 mg   |
- b. Masukkan bahan-bahan 2.a. satu per satu ke dalam Erlenmeyer 200 ml, yang telah berisi akuadest steril 150 ml. Setiap kali memasukkan bahan, dilarutkan dengan menggunakan pengaduk, baru kemudian dimasukkan bahan berikutnya.
- c. Setelah semua bahan masuk, tambahkan akuadest sampai volume seluruhnya 200 ml.
- d. Tutup rapat Erlenmeyer yang berisi larutan vitamin stok
- e. Beri label : VITAMIN, MS 50 x, 4 ml / l  
Artinya : untuk membuat 1 liter medium MS, diperlukan 4 ml stok
- f. Simpan dalam lemari es

**3. Larutan Stok Iron (besi) 200 ml (40 kali konsentrasi)**

- a. Timbang 1492 mg Na<sub>2</sub>EDTA dan 1112 mg Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O
- b. Larutkan masing-masing bahan tersebut di atas pada Erlenmeyer 200 ml yang terpisah, yang masing-masing berisi 75 ml.
- c. Jika bahan-bahan tersebut sukar larut, tambahkan beberapa tetes HCl, lalu panaskan
- d. Setelah larut, campur kedua macam larutan bahan tersebut ke dalam satu Erlenmeyer
- e. Biarkan dingin pada suhu kamar
- f. Tambahkan akuadest sampai volume menjadi 200 ml
- g. Tutup rapat
- h. Beri label : IRON, MS 40 x, 5 ml / l  
Artinya : untuk membuat 1 liter medium MS, diperlukan 5 ml stok

**4. Larutan Stok Hormon (IAA, NAA, 2,4-D dan IBA) : 100 ml (1000 ppm)**

- a. Timbang masing-masing hormon sebanyak 100 mg
- b. Tuangkan masing-masing hormon ke dalam gelas Erlenmeyer 100 ml yang berisi akuadest kira-kira 70 ml
- c. Sambil di aduk-aduk teteskan sedikit larutan KOH 1 N dengan hati-hati sampai larut (tampak jernih)
- d. Pindahkan ke dalam gelas ukur 100 ml, tambahkan akuadest sampai 100 ml
- e. Pindahkan ke dalam gelas Erlenmeyer 100 ml
- f. Tutup rapat
- g. Beri label: IAA (1 mg / l), NAA (1 mg / l), 2,4-D (1 mg / l), IBA (1 mg / l)  
Artinya : 1 ml stok sama dengan 1 mg hormon
- h. Simpan di dalam lemari es

**5. Larutan Stok Makronutrien 200 ml (20 kali konsentrasi)**

- a. Timbang bahan-bahan kimia yang tersebut di bawah ini dengan timbangan analitik.

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	33000 mg
$\text{KNO}_3$	38000 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8800 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7400 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3400 mg

- b. Larutkan bahan-bahan tersebut satu per satu ke dalam erlenmeyer 250 ml yang telah diisi dengan 150 ml akuadest.
- c. Gojog erlenmeyer setiap kali penambahan bahan kimia, sampai larut.
- d. Setelah semua bahan kimia masuk dan terlarut, tambahkan akuades sampai volume larutan menjadi 200 ml.
- e. Untuk membuat 1 liter medium MS diperlukan 10 ml larutan stok makro.
- f. Beri label : MS MAKRO, 20 X, 10 ml / lt  
Artinya : untuk membuat 1 liter medium MS, diperlukan 10 ml stok
- g. Simpan dalam lemari es

## 6. *Membuat Media Murashige & Skoog (Media MS)*

- a. Siapkan erlenmeyer 1000 ml yang telah diisi dengan 500 ml akuadest,
- b. Tambahkan 10 ml larutan stok makronutrient, aduk merata menggunakan magnetic stirrer
- c. Kemudian tambahkan satu per satu, larutan stok hara mikro, vitamin, iron (besi), vitamin, dan myo-inositol.
- d. Masukkan ZPT jika dibutuhkan. Volume yang digunakan disesuaikan dengan kebutuhan dan stok ZPT yang telah dibuat
- e. Masukkan sucrose atau dapat diganti dengan gula pasir sebanyak 30 gram per liter media MS
- f. Ukur pH larutan dan sesuaikan pH nya sehingga berada pada pH 5.7-5.8. Jika terlalu basa ditambah dengan HCl dan jika terlalu asam maka ditambah larutan NaOH.
- g. ukur lagi larutan tersebut sehingga mencapai 1 liter dan dikembalikan ke dalam beaker atau Erlenmeyer
- h. Tambahkan agar 8 gram untuk 1 liter media (media solid) dan aduk serta panasi media hingga mendidih menggunakan magnetic stirrer.
- i. Tuang ke dalam *botol kultur* secukupnya. Kemudian tutup dengan alumunium foil /plastic dan beri label (MS)
- j. Sterilisasi dalam autoclaf dengan temperatur 121°C selama 15 menit

## II. **Preparasi Medium Agar Kosong**

- a. Timbang agar sebanyak 4 gram, masukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi aquadest 500 ml
- b. Panaskan pada kompor sampai agar-agar larut dan larutan mendidih
- c. Masukkan dalam botol jam yang tinggi secukupnya, beri label pada masing-masing botol
- d. Sterilisasi dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit

## III. Perhitungan Untuk Pengambilan Zat Pengatur Tumbuh

- a. Jika label pada botol ZPT adalah 1000ppm tetapi diinginkan hanya 5 ppm dalam 250 ml media MS
- b. Perhitungan menggunakan rumus :  $C_1V_1 = C_2V_2$ ,

dimana

$C_1 = \text{konsentrasi stok ZPT} = 1000 \text{ ppm}$

$V_1 = \text{Volume perlu diambil} = ?$

$C_2 = \text{Konsentrasi ZPT yang diinginkan} = 5 \text{ ppm}$

$V_2 = \text{Volume media yang akan dibuat}$

Maka

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$1000 \times V_1 = 5 \times 250$$

$$V_1 = 1250 / 1000 = 1.25 \text{ ml}$$

- c. Sehingga diambil 1.25 ml dari stok ZPT dengan konsentrasi 1000ppm untuk membuat media MS 250 ml dengan konsentrasi 5ppm ZPT

#### ***F. Pengamatan***

Amati apakah media yang dibuat dan telah disterilkan, telah mengeras (untuk media padat) dan ada yang terkontaminasi oleh mikroorganisme ? Media yang terkontaminasi tidak dapat dipakai dalam kultur jaringan.

#### ***G. Diskusi***

Media yang telah disterilkan dengan menggunakan autoclaf seringkali masih mengalami kontaminasi, sehingga tidak dapat dipakai dalam kultur jaringan. Penambahan agar untuk membuat media menjadi padat, seringkali tidak memberikan hasil yang memuaskan yang menyebabkan media tetap encer. Diskusikan faktor-faktor yang mungkin dapat menyebabkan kegagalan tersebut.

Mengapa bahan-bahan kimia yang dimasukkan ke dalam akuadest tidak boleh dimasukkan sekaligus ?. Mengapa tiap kali bahan dimasukkan harus diaduk sampai benar-benar larut ?.

#### ***H. Laporan***

Buat Laporan Praktikum Acara ini dengan susunan sebagai berikut :

1. Topik
2. Tujuan
3. Cara kerja

4. Hasil Pengamatan (pH masing-masing media yang teramati, terkontaminasi atau tidak, apakah semua bahan yang dimasukkan dapat larut ? Kalau tidak, tulis bahan mana yang tidak dapat larut dengan cara pengadukkan. )
5. Pembahasan dan Diskusi
6. Kesimpulan
7. Saran

**A. Topik 2 : Kultur Kalus**

**B. Tujuan** : Mengetahui cara menghasilkan kalus dari bagian tanaman (eksplan) yang ditumbuhkan pada media kultur jaringan

**C. Prinsip:**

Menurut teori sel yang dikemukakan oleh Schleiden dan Swann, sel mempunyai kemampuan otonom dan totipotensi. Sel hidup apabila diletakkan pada suatu lingkungan yang sesuai, akan bertumbuh dan berkembang menjadi tanaman yang sempurna.

Kultur jaringan merupakan pengembangan dari teori sel, yaitu dengan menumbuhkan sel atau kumpulan sel (jaringan) pada media dengan nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan sel atau jaringan tanaman yang ditanam pada media tersebut. Jaringan yang ditumbuhkan pada media yang padat akan membentuk kalus, yaitu massa atau sel-sel yang tidak beraturan. Kalus yang terbentuk dipotong menjadi bagian yang lebih kecil, yang kemudian dipindahkan pada media yang masih baru, dengan susunan hara yang tepat supaya kalus dapat tumbuh menjadi tunas dan tanaman yang sempurna.

Dalam menginduksi kalus, sebaiknya dilakukan dengan banyak ulangan karena laju pertumbuhan dan struktur kalus dapat bervariasi pada suatu spesies meskipun pada ulangan yang berada pada media yang sama. Media yang digunakan juga dapat berupa media solid atau media cair. Kalus yang friable (remah) lebih mudah untuk memperbanyak diri daripada kalus yang terlalu padat.

Banyak eksplan yang dapat digunakan untuk induksi kalus. Eksplan tersebut dapat berasal dari akar, batang, daun, bunga, maupun polen. Asal eksplan akan menentukan pertumbuhan kalus karena memerlukan proses pembelahan sel yang tidak akan terdiferensiasi menjadi organ. Hormone tumbuhan atau zat pengatur tumbuh yang ditambahkan di dalam media untuk menginduksi kalus sangat bervariasi tergantung genotype eksplan yang digunakan serta hormone yang sudah ada di dalam tanaman induk (endogenous hormone). Kalus dapat diinduksi dengan penambahan hanya auksin, hanya sitokinin, atau campuran auksin dan sitokinin dalam perbandingan tertentu.

Selain tekstur kalus yang dapat berbeda (padat atau remah), sifat lain seperti warna dan kemampuan untuk menyebar di dalam media cair juga menentukan keberhasilan kultur kalus. Untuk produksi kalus dalam jumlah banyak biasanya

digunakan media cair karena beberapa alasan. Kalus pada media padat hanya bersentuhan dengan permukaan media yang lebih sedikit daripada jika berada dalam media cair. Jika dalam media cair, maka kalus dapat menyerap lebih banyak nutrisi dan pertukaran gas juga lebih lancar dengan media cair.

Kultur kalus mempunyai banyak tujuan, diantaranya untuk memperbanyak tanaman, induksi keragaman, produksi metabolit sekunder, dan produksi tanaman haploid. Sebagai contoh kultur anther padi yang dapat menghasilkan tanaman haploid melalui induksi kalus dengan penambahan 2,4-D kemudian regenerasi tanaman dari kalus dengan media MS yang ditambah dengan NAA. Pada eksplan daun kopi, kalus tumbuh lebih baik pada media MS yang ditambah dengan 2,4-D dan kinetin. Zat pengatur tumbuh yang diperlukan untuk induksi kalus terlihat sangat bervariasi tergantung asal eksplan yang akan ditanam.

#### ***D. Alat & Bahan*** :

1. Clean Bench with UV Lamp (BI-124 / JICA)
2. Petridish steril
3. Pinset panjang dan pinset pendek steril
4. Scalpel steril
5. Erlenmeyer kosong steril
6. Gelas ukur
7. Lampu spirtus
8. Alkohol 70%
9. Larutan Formalin 10%
10. Larutan sublimat 40 mg / 100 ml aquadest
11. Larutan kloroks 10% ditambah Tween 20 sebanyak 2 tetes
12. Larutan PVP (Polyvinil Pyrrolidone) 50 mg / 100 ml akuadest ditambah Ascorbic Acid (vitamin C) 50 mg
13. Akuadest steril
14. Media MS + 1 ppm 2,4-D dan MS + 1,5 ppm 2,4-D
15. Eksplan : Umbi wortel, daun tembakau, tangkai dan daun kenanga

**E. Pengamatan :**

Amati kondisi media kultur setelah ditanam dengan eksplan apakah terkontaminasi mikroorganisme atau tidak. Bagaimana pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditanam.

**F. Cara Kerja :**

1. Bahan-bahan dicuci terlebih dahulu dengan detergen, kemudian bilas dengan air bersih
2. Alat yang diperlukan dimasukkan ke dalam *Clean Bench* (*di Laminair Airflow atau entkas*), setelah disteril dengan cara membasahi bagian luarnya dengan kain yang telah direndam dengan alkohol 70%
3. Steril sarung tangan yang akan dipakai dengan alkohol 70%
4. Penanaman eksplan pada media :

Semua kegiatan penanaman eksplan ini dilaksanakan pada *Clean Bench*

**a. Wortel**

- Wortel dicelup dalam spirtus, kemudian dibakar pada lampu spirtus. Biarkan api pada umbi padam dengan sendirinya. Lakukan pembakaran ini 2 – 3 kali.
- Wortel diletakkan pada petridish
- Buang bagian pangkal dan ujung wortel  $\pm 2$  cm
- Potong wortel setebal  $\pm 1$  cm dan dibagi empat, dimana tiap potongan terdapat bagian : kambium, phloem dan xilem
- Masukkan potongan eksplan dng pinset steril ke dlm botol media
- Tutup kembali erlenmeyer yg berisi eksplan dengan alumunium foil dan beri label
- Simpan ke dalam ruang inkubasi
- Lakukan penanaman dengan **5 ulangan untuk tiap macam media**

**b. Daun tembakau**

- Masukkan eksplan ke dalam larutan clorox 10% yang diberi Tween-20 sebanyak 2 tetes
- Gojok eksplan dalam larutan tersebut selama  $\pm 10$  menit



- Buang larutan clorox yang dipakai untuk membersihkan daun tembakau
- Cuci eksplan dengan akuadest steril. Pencucian diulang 3 kali
- Masukkan eksplan ke dalam larutan clorox 5 % yang diberi Tween-20 sebanyak 2 tetes
- Gojok eksplan dalam larutan tersebut selama  $\pm$  5 menit
- Cuci eksplan dengan akuadest steril. Pencucian diulang 3 kali
- Letakkan eksplan pada petridish
- Potong eksplan kecil-kecil ( $\pm$  1 cm), kemudian tanam pada media
- Tutup botol erlenmeyer yang berisi eksplan dengan alumunium foil dan beri label
- Simpan dalam ruang inkubasi
- Lakukan penanaman dengan **5 ulangan untuk tiap macam media**

### ***G. Diskusi***

Dari hasil pengamatan yang anda lakukan, diskusikan hal-hal berikut :

1. Kemungkinan terjadinya kontaminasi mikroorganisme pada kultur
2. Ada tidaknya pembengkakan / pengembangan kambium
3. Ada tidaknya pembentukan kalus

**A. Topik 3.** : **Kultur Embrio dan Kotiledon**

**B. Tujuan** : Mengetahui cara menumbuhkan embrio dan endosperm pada medium yang mengandung unsur hara

**C. Prinsip** :

Benih terdiri dari embrio dan endosperm. Embrio dapat tumbuh dan berkembang antara lain karena adanya nutrisi yang disediakan oleh endosperm. Benih yang endospermnya sedikit atau rusak oleh karena serangga atau mikroorganisme patogen, menyebabkan embrio tidak dapat tumbuh dan akhirnya mati.

Kultur embrio sangat bermanfaat khususnya bagi pemulia tanaman yang berusaha menyilangkan tanaman antar spesies atau genus yang dapat menyebabkan keguguran embrio akibat ketidakcocokan kromosom. Dengan teknik embryo rescue, embrio yang belum matang dan belum mati atau jatuh dari pohon induk dapat diselamatkan dengan menanam embrio tersebut pada media *in vitro* (kultur jaringan).

Hasil percobaan dari Laibach (1925-1928), telah dapat ditumbuhkan embrio biji tanaman *Linum* pada kertas filter atau kapas yang mengandung sukrose atau glukosa. Embrio dapat tumbuh apabila nutrisi yang dapat mendukung pertumbuhannya. Embrio yang belum dewasa memerlukan media dengan nutrisi dan zat tambahan yang lebih lengkap untuk pertumbuhannya dibandingkan embrio yang dewasa, yang berasal dari biji yang masak.

Sterilisasi pada kultur embrio dimulai dengan sterilisasi biji. Biji yang keras dapat direndam dalam air terlebih dahulu untuk memudahkan mengambil embrio di dalamnya. Setelah biji disterilisasi, embrio dapat diambil untuk ditanam pada media kultur. Embrio yang masih sangat muda perlu dikeluarkan dengan hati-hati supaya tidak terpotong.

Media yang digunakan untuk kultur embrio akan bervariasi tergantung umur embrio dan tujuan akhir dari kultur yang dilakukan. Bahkan dalam satu botol media dapat dibuat mengandung 2 macam media untuk mendukung pertumbuhan embrio melalui beberapa tahapan secara normal (Monnier, 1976 *cit* Yeung *et al.*, 1981).

Kultur kotiledon juga dapat dilakukan sebagai alternatif eksplan untuk induksi kalus. Media yang dibuthkan tentu tidak serumit media untuk embrio tetapi membutuhkan ZPT seperti 2,4-D untuk meninginduksi pembelahan sel yang belum terdiferensiasi.

**D. Alat & Bahan :**

1. *Clean Bench* (BI-124 / JICA)
2. Petridish steril
3. Skalpel steril
4. Pinset pendek steril
5. Sarung tangan karet
6. Biji kacang kedelai / kacang tanah / kacang panjang
7. Media MS + 2ppm BAP dan  $\frac{1}{2}$  MS

**E. Pengamatan :**

Amati pertumbuhan embrio dan kotiledon, setiap hari. Pada hari ke berapa terlihat ada pertumbuhan dari embrio menjadi plantlet, atau endosperm menjadi kalus.

**F. Cara Kerja :**

1. Sterilisasi meja *Clean Bench* dengan alkohol 70%
2. Alat dan bahan yang akan dipergunakan dimasukkan ke dalam *Clean Bench* disteril dengan cara membasahi bagian luarnya dengan kain yang telah dibasahi dengan alkohol 70%
3. Steril sarung tangan yang akan dipakai dengan alkohol 70 %
4. Biji disterilisasi dengan 10% Clorox selama 10 menit dan 5% Clorox selama 5 menit dengan pencucian menggunakan aquadest sebanyak 3 kali.
5. Keluarkan biji kedelai dari dalam botol, kemudian letakkan pada petridish
6. Pilih benih yang yang siap digunakan, kupas kulit bijinya, kemudian pisahkan embrio dari endospermnya
7. Tanam embrio pada media  $\frac{1}{2}$  MS dan kotiledon pada media MS 2 ppm BAP
8. Tutup botol media dan beri label
9. Simpan dalam ruang inkubasi

### ***G. Diskusi***

Diskusikan hasil praktikum anda :

1. Bagaimana pertumbuhan dari embrio dan kotiledon. Diantara kedua eksplan tersebut, mana yang langsung membentuk planlet dan mana yang membentuk kalus. Mengapa demikian ?
2. Bagaimanakah pertumbuhannya, atau samasekali tidak ada pertumbuhan ? Mengapa demikian ?
3. Apakah terkontaminasi mikroorganisme ? Mengapa demikian ?

**A. Topik 4. : Induksi Embriogenesis Somatik**

**B. Tujuan** : Memperoleh tanaman secara vegetatif yang mempunyai sifat sama dengan induknya

**C. Prinsip** :

Ketika embrio tanaman terbentuk dari sel-sel atau jaringan somatik maka disebut dengan embryogenesis somatik. Proses ini berbeda dengan produksi embrio secara alami dari pembuahan sel telur atau dengan embryogenesis zigotik. Di dalam berbagai literatur, embrio somati sering disebut dengan : struktur seperti embrio, embrio adventif, embrio vegetatif atau embrioid.

Pada tahun 1958, Reinert dan Steward mampu menghasilkan embrio somatik dari kalus dan kultur suspensi wortel (*Daucus carota*). Perkembangan embrio somatik dalam kondisi *in vitro* mempunyai banyak kesamaan dengan perkembangan embrio secara alami di dalam endosperm. Dalam penelitian *in vitro* tersebut, air kelapa digunakan sebagai pengganti cairan endosperm yang diperlukan bagi perkembangan embrio. Akan tetapi endosperm tersebut dapat diganti dengan bahan sintesis seperti zat pengatur tumbuh (ZPT) dari golongan auksin pada tahap awal induksi atau kombinasi dengan ZPT golongan lain seperti sitokinin.

Metode induksi embryogenesis somatic dapat dibedakan menjadi secara langsung (*direct*) atau tidak langsung (*indirect*). Secara langsung embrio somatic dapat muncul dari sel atau jaringan somatic tanpa munculnya kalus terlebih dahulu. Sel-sel tersebut adalah *pre-embryonic determined cells (PEDC)*. Eksplan yang digunakan adalah jaringan yang mengandung sel-sel PEDC seperti jaringan nucellus pada spesies Citrus karena secara alami mempunyai potensi untuk menghasilkan poliembrioni. Secara tidak langsung, embrio somatic diinduksi dengan terlebih dahulu menginduksi kalus. Sel-sel dimana embrio akan muncul disebut *induced embryogenically determined cells (IEDC)* karena harus diinduksi untuk menghasilkan embrio. Dengan metode tidak langsung, sel-sel yang sudah terdiferensiasi harus mengalami de-diferensiasi terlebih dahulu untuk membentuk sel-sel yang embriogenik.

**D. Alat & Bahan :**

1. Media kosong (hanya agar) dan MS + 2ppm BAP
2. Biji kedelai, kacang hijau atau kacang panjang
3. Alkohol 70%
4. Larutan formalin
5. Skalpel steril
6. Pinset panjang dan pinset pendek steril
7. Petridish steril

**E. Pengamatan :**

Amati pertumbuhan eksplan setiap hari. Apakah langsung dapat terbentuk tunas atau melalui kalus terlebih dahulu.

**F. Cara Kerja**

**1. Persiapan untuk *seedling* kedelai/kacang hijau (perkecambahan)**

- a. Pemilihan benih dilakukan dengan merendam benih kedelai/kacang hijau dalam air, kemudian benih yang tenggelam diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Tutup erlenmeyer dengan aluminium foil
- b. Sterilisasi meja *Clean Bench* dengan alkohol 70%
- c. Alat dan bahan yang akan dipakai dimasukkan ke dalam *Clean Bench*, setelah disterilkan dengan cara membasahi bagian luarnya dengan kain atau kapas yang telah direndam dengan alkohol 70%
- d. Sterilkan sarung tangan yang akan dipakai dengan alkohol 70%
- e. Sterilisasi eksplan dalam erlenmeyer dengan alkohol 70%, dengan menggojoknya selama 1 menit.
  - Larutan sterilan (alkohol) dibuang, kemudian eksplan dicuci dengan aquadest steril selama 1 menit.
  - Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali.
- f. Sterilisasi juga dapat dilakukan dengan larutan Clorox 10% dan Clorox 5% kemudian dibilas 3 kali menggunakan aquadest steril
- g. Tanam benih ke dalam botol yang berisi medium agar kosong (tanpa unsur hara), kemudian tutup dengan aluminium foil dan simpan dalam ruang inkubasi

## 2. Penanaman pada media induksi

- a. Sterilisasi meja *Clean Bench* dengan alkohol 70%
- b. Alat dan bahan yang akan dimasukkan ke dalam *Clean Bench* disterilkan terlebih dahulu dengan menyemprot dengan alkohol 70%
- c. Sterilkan sarung tangan yang akan dipakai dengan alkohol 70%
- d. Keluarkan *seedling* kedelai/kacang hijau dari dalam botol dan letakkan pada petridish
- e. Potong-potong bagian hipokotil dan epikotil dengan ukuran  $\pm 1$  cm, masing-masing sebanyak 20 potong dan nodia beserta kedua kotiledon
- f. Masukkan bagian-bagian tanaman tersebut masing-masing 10 potong pada media MS + 2ppm BAP
- g. Tutup botol kembali dan beri label
- h. Simpan dalam ruang inkubasi dan diamati perkembangannya. Dokumentasi dilakukan dengan foto dan deskripsi perkembangan

### G. Diskusi

Amati pertumbuhan dan perkembangan yang terjadi pada eksplan yang ditanam pada media yang berbeda. Manakah yang lebih baik ? Mengapa demikian ?

**A. Topik 5 : Kultur Jaringan Tanaman Anggrek (Perbanyak Vegetatif)**

**B. Tujuan :** Mengetahui cara memperbanyak tanaman anggrek melalui kultur jaringan

**C. Prinsip :**

Anggrek dapat diperbanyak secara vegetatif dan generatif. Perbanyak secara vegetatif akan menghasilkan bibit yang sama persis dengan induknya sedangkan jika secara generatif maka hasilnya akan terlihat keragaman pada keturunannya. Perbanyak vegetatif atau klonal yang dilakukan *in vivo* biasanya memerlukan waktu yang sangat lama untuk menghasilkan tanaman dewasa. Pada tahun 1960, Morel mengembangkan perbanyak anggrek melalui kultur meristem secara *in vitro*. Dalam satu tahun dapat dihasilkan ribuan bibit dari satu meristem sebagai eksplan. Metode tersebut dinamakan *meri-cloning* (perbanyak vegetatif dengan kultur meristem).

Kultur meristem anggrek akan menghasilkan struktur yang menyerupai protokorm (yang dihasilkan dari perkecambahan biji anggrek) maka muncul istilah *protokorm-like bodies* (plb) untuk membedakannya dengan protokorm dari perbanyak generatif. Tahapan dalam kultur meristem dapat dibagi menjadi tiga fase yaitu : (1) transformasi meristem menjadi *protokorm-like body*, (2) perbanyak protokorm dengan memotongnya menjadi beberapa bagian, dan (3) perkembangan protokorm tersebut menjadi tunas yang sudah berakar. Secara rinci, metode yang digunakan akan tergantung pada spesies anggrek yang akan diperbanyak. Sebagai contoh, *Cattleya* sangat mudah mengalami *browning* sehingga pemotongan meristem dianjurkan untuk dilakukan dalam suatu cairan dan perbanyak dilakukan dalam media cair.

Perbanyak vegetatif anggrek dengan kultur meristem dapat menggunakan media padat atau cair seperti pada *Cattleya*. Dalam media cair, perlu penggojogan untuk memperlancar O<sub>2</sub> dan transport nutrisi untuk eksplan. Media yang digunakan bias beragam tergantung spesies. Media anggrek yang sering digunakan adalah Vacin and Went serta Knudson C. Beberapa spesies memerlukan media yang khusus tetapi juga ada yang dapat ditumbuhkan pada media MS. Isolasi meristem biasanya dilakukan pada media padat, kecuali *Cattleya* yang memerlukan perlakuan khusus di dalam media cair. Perbanyak protokorm dilakukan dalam media cair dan perkembangan protokorm menjadi planlet dilakukan dalam media padat. Pada beberapa spesies, tidak ditambahkan gula di dalam media karena akan menyebabkan



warna eksplan menjadi kekuningan dan meristem akan mati. Penggunaan air kelapa di dalam media adalah untuk stimulasi pembentukan protokorm dari sel-sel epidermis. Zat pengatur tumbuh tidak ditambahkan karena dapat menginduksi mutasi.

Selain kultur meristem, perbanyakan anggrek secara vegetatif juga dapat dilakukan dengan menggunakan eksplan daun muda, tunas dorman, bunga yang masih muda, kalus dari jaringan rhizome, bibit muda dan nodia dari bibit yang mengalami etiolasi. Meskipun perbanyakan secara *in vitro* dilakukan sebagai alternatif metode perbanyakan vegetatif untuk menghasilkan tanaman klonal, akan tetapi keragaman atau variasi dapat muncul dari hasil kultur jaringan anggrek. Keragaman tersebut muncul akibat 3 faktor yaitu :

1. Chimeras (kimer).

Tanaman yang secara alami bersifat kimer sering menghasilkan bibit yang berbeda dengan tanaman induk. Hal ini disebabkan oleh regenerasi protokorm yang berasal hanya dari satu lapisan sel sehingga sifat kimer hilang pada tunas-tunas baru. Hal ini terlihat pada *Cymbidium* dan *Dendrobium*.

2. Virus

Virus dapat mengakibatkan perubahan fenotipe yang mirip dengan mutasi.

3. Mutasi

Mutasi dapat terjadi akibat dari penggunaan ZPT atau sub-kultur berulang. Mutasi akan tampak dengan munculnya bibit yang poliploid sehingga memberikan penampilan yang berbeda dengan tanaman induk. Mutasi dapat terjadi secara sengaja atau tidak. Mutasi yang diinduksi secara sengaja dapat dilakukan dengan penambahan kolkisin pada media atau dengan penggunaan radiasi. Akan tetapi perlu diingat jika terjadi mutasi, perbanyakan ini tidak akan bersifat vegetative atau klonal karena menghasilkan tanaman baru yang berbeda dengan induknya.

#### D. Alat dan Bahan

1. *Clean Bench* (BI-124 / JICA)
2. Shaker (BI – 77 / JICA)
2. Petridish steril
3. Skalpel steril
4. Pinset pendek steril
5. Sarung tangan karet
6. Tunas tanaman *Dendrobium* yang masih muda ( $\pm 4 - 10$  cm)
7. Media Vacin & Went cair dan padat

#### E. Cara Kerja

1. Siapkan **media Vacin & Went (VW) yang dimodifikasi**, sebagai berikut :

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	200 mg
$\text{KNO}_3$	525 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500 mg
Ferri-tartrat	28 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,5 mg
Saccharose	20 gram
Akuadest	850 ml
<b>Air kelapa</b>	<b>150 ml</b>

2. Sterilisasi meja *Clean Bench* dengan alkohol 70%
3. Alat dan bahan yang akan dipergunakan dimasukkan ke dalam *Clean Bench* disteril dengan cara membasahi bagian luarnya dengan kain yang telah dibasahi dengan alkohol 70%
4. Steril sarung tangan yang akan dipakai dengan alkohol 70 %
5. Siapkan eksplan yang akan dipergunakan :
  - Masukkan tunas tanaman ke dalam botol erlenmeyer yang berisi clorox 10% + 1 tetes Tween-20, kemudian digojok selama 10 menit, kemudian letakkan pada petridish steril
  - Hilangkan sarung daun atau sisik-sisik yang menutupi tunas
  - Potong tunas ujung (apikal meristem) dan tunas ketiak masing-masing

sebesar  $\pm 1-5 \text{ m}^3$

- Sterilisasi eksplan untuk yang kedua kalinya dengan clorox 5% + 1 tetes Tween-20 dan digojok 5 menit
  - Cuci eksplan dengan akuadest steril
  - Masukkan eksplan ke dalam erlenmeyer steril yang berisi Medium VW cair
  - Tutup erlenmeyer dengan aluminium foil dan beri label
6. Tempatkan erlenmeyer yang berisi eksplan pada shaker dengan kecepatan 100 – 120 rpm
  7. Setelah plb cukup banyak, pindahkan sebagian pada medium VW padat
  8. Kalau sudah keluar akar, tunas dan daun dan bibit cukup besar, dapat dipindahkan pada kompot

#### **F. Pengamatan**

Amati pertumbuhan plb (*protocorm-like bodies*), bagaimana kecepatan pertumbuhannya. Demikian pula pertumbuhan plb tersebut setelah dipindahkan pada media padat.

#### **G. Diskusi**

Amati pertumbuhan dari eksplan pada medium cair. mengapa bisa terbentuk banyak plb ?

Mengapa plb yang dipindahkan pada medium padat dapat tumbuh menjadi tunas baru yang mempunyai akar dan daun ? Mengapa pada medium cair pertumbuhan tunas tidak dapat terjadi ?

## **Topik 6 : Penyemaian Biji Anggrek**

**B. Tujuan** : Mengetahui cara menyemaikan biji anggrek secara *in vitro*

**C. Prinsip** :

Pada tahun 1909, Bernard secara tidak sengaja menemukan adanya fungi yang penting untuk perkecambahan biji anggrek. Anggrek hidup secara simbiosis dengan fungi sejak perkecambahan. Simbiosis adalah hubungan antara fungi dan akar disebut dengan mikoriza yang berarti fungus-akar. Perkecambahan dan pertumbuhan anggrek yang masih muda sangat tergantung pada hubungan dengan fungi tersebut karena cadangan makanan yang ada pada biji anggrek sangat sedikit. Hadley (1982) menyimpulkan bahwa apa yang diperoleh anggrek dari hasil simbiosis dengan fungi tergantung pada jenis anggrek. Kemungkinan besar biji anggrek memperoleh karbohidrat dan asam amino tertentu. Pada tahun 1920-an, Knudson menunjukkan bahwa perkecambahan biji anggrek dapat dilakukan dengan menanam biji anggrek pada media yang mengandung mineral dan gula sebagai sumber energy (Arditti, 2010). Penelitian yang berhasil dilakukan Knudson menunjukkan bahwa biji anggrek dapat berkecambah secara *in vitro*. Beberapa alasan untuk megecambahkan biji anggrek secara *in vitro* adalah :

1. Biji anggrek sangat kecil dan mengandung cadangan makanan yang sangat sedikit atau bahkan tidak ada. Jika dikecambahkan *in vivo* kemungkinan besar bisa hilang atau cadangan makanan tidak mencukupi
2. Perkecambahan dan perkembangan bibit sangat tergantung pada simbiosis dengan fungi. Jika ditumbuhkan tanpa fungi maka disebut perkecambahan asimbiotik.
3. Jika biji dihasilkan dari persilangan tertentu, maka perkecambahan secara *in vitro* akan meningkatkan persentase keberhasilannya
4. Perkecambahan secara *in vitro* dapat membantu perkecambahan embrio anggrek yang belum berkembang atau belum matang sehingga memperpendek siklus pemuliaannya atau budidayanya
5. Perkecambahan dan perkembangan bibit dapat berlangsung lebih cepat dalam kondisi *in vitro* karena lingkungan yang terkendali dan tidak ada kompetisi dengan fungi atau bakteri yang tidak menguntungkan

Banyak peneliti yang melaporkan bahwa buah anggrek yang dipilih untuk dikecambahkan secara *in vitro* tidak harus yang sudah masak (berwarna kuning kecoklatan) dan sudah membuka atau pecah. Beberapa hal yang perlu diperhatikan saat pemilihan buah anggrek untuk ditanam secara *in vitro* adalah :

1. Lebih mudah untuk sterilisasi buah yang belum pecah
2. Dengan memilih buah yang belum terlalu masak, dapat dilakukan penyelamatan embrio dari hasil persilangan antar spesies atau kultivar yang berkerabat jauh
3. Mengecambahkan biji yang belum terlalu masak dapat memperpendek siklus budidaya
4. Waktu pengambilan buah yang tepat tergantung tiap spesies. Biasanya diambil saat 2/3 masak seperti diungkapkan oleh Lucke (1971) *cit.* Pierik (1987) di tabel 1. Akan tetapi lama perkecambahan tersebut dapat berubah sesuai kultivar maupun lingkungan.

Sterilisasi dilakukan untuk membersihkan buah anggrek dari mikroorganisme yang dapat mengganggu pertumbuhan biji anggrek saat di kondisi *in vitro*. Sterilisasi buah anggrek biasanya dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan buah yang masih tertutup atau buah yang sudah pecah. Jika buah masih tertutup maka sterilisasi lebih mudah dengan menggunakan alkohol dan buah dibakar di atas api Bunsen. Jika buah sudah pecah maka sterilisasi juga harus dilakukan terhadap biji yang sudah keluar. Metode yang kedua akan lebih rumit karena harus dilakukan sterilisasi basah menggunakan larutan bleach (bayclin) yang dicampur dengan tween untuk membersihkan buah dan biji anggrek.

Perkecambahan anggrek membutuhkan kondisi lingkungan dan nutrisi tertentu terutama jika biji anggrek masih muda. Lingkungan yang mendukung seperti suhu dan cahaya tertentu untuk mematahkan dormansi dan memicu perkecambahan. Nutrisi yang dibutuhkan perlu didukung dengan pemberian nutrisi secara lengkap karena biji anggrek tidak mengandung endosperm atau cadangan makanan untuk membantu pertumbuhan dalam tahap awal sebelum mencapai tahap autotrof. Nutrisi yang harus dipenuhi mencakup senyawa anorganik, sumber energy (sucrose atau gula pasir), vitamin (misalnya asam

nikotinat), pH yang tepat dan agar sebagai bahan pematat. Variasi lain adalah penambahan zat pengatur tumbuh yang dapat digunakan setelah bij berkecambah. Senyawa anorganik juga dapat diganti dengan bahan-bahan lain seperti buah pisang, air kelapa, buah tomat atau air rebusan taoge. Jenis media yang digunakan akan tergantung pada jenis anggrek, umur biji, dan tujuan kultur.

#### **D. Alat dan Bahan**

1. *Clean Bench* (BI-124 / JICA)
2. Shaker (BI – 77 / JICA)
2. Petridish steril
3. Skalpel steril
4. Pinset steril
5. Skalpel steril
6. Alkohol 70%
7. Media VW atau Knudson dan media pisang
8. Buah anggrek

#### **E. Cara Kerja**

##### **1. Pembuatan Media :**

##### **Media Knudson**

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1000 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub>	500 mg
Fe SO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	25 mg
MnSO <sub>4</sub>	7,5 mg

##### **Unsur mikro :**

H <sub>3</sub> B <sub>03</sub>	0,056 mg
CuSO <sub>4</sub>	0,040 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,331 mg
Gula	20 gram
Agar	8-12 gram

(Modifikasi media kultur biji anggrek dijelaskan dalam praktikum!!)

## **Media pisang**

### ***Bahan dan alat :***

- a) Satu buah pisang ambon (diambil 150g)
- b) Air kelapa (150 ml)
- c) Gula pasir (20g)
- d) Agar (8g)
- e) pH meter / pH stick
- f) Aquadest
- g) Hotplate + magnetic stirrer / kompor + panci kecil + pengaduk
- h) Botol-botol steril
- i) Autoclave

### ***Cara Pembuatan Media Pisang :***

- a) Pisang sebanyak 150g dihaluskan
- b) Disiapkan aquadest sebanyak 500ml, dimasukkan ke dalam beaker ukuran 1 liter atau panci kecil jika menggunakan kompor.
- c) Ditambahkan pisang yang sudah dihaluskan, air kelapa sebanyak 150ml, dan gula pasir sebanyak 20g
- d) Pemanas dan magnet dinyalakan (jika menggunakan magnetic stirrer) atau kompor dan diaduk perlahan sampai gula larut
- e) Pemanas atau kompor dimatikan dan diukur pH media. pH seharusnya sekitar 5.8. Jika terlalu basa atau asam maka ditambah HCl atau NaOH untuk mendapatkan pH 5.8
- f) Larutan media ditambah aquadest hingga mencapai volume 1 liter
- g) Larutan media dipanaskan sampai mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol-botol yang sudah steril.
- h) Botol-botol yang sudah diisi media ditutup dan disterilisasi di dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121 C.

2. Sterilisasi meja *Clean Bench* dengan alkohol 70%
3. Alat dan bahan yang akan dipergunakan dimasukkan ke dalam *Clean Bench* disteril dengan cara membasahi bagian luarnya dengan kain yang telah dibasahi dengan alkohol 70%
4. Steril sarung tangan yang akan dipakai dengan alkohol 70 %
5. Siapkan buah anggrek yang akan dipergunakan :
  - a. Cuci buah dengan detergen, kemudian bilas dengan air mengalir atau dila dengan alkohol 70% menggunakan kapas
  - b. Masukkan dalam gelas ukur yang berisi alkohol 95%, kemudian dengan pinset bakar buah anggrek dengan api Bunsen, biarkan api padam. Ulangi tahap pembakaran ini tiga kali.  
*(Tahap ini harus hati-hati supaya tidak terjadi kebakaran. Pada waktu pengulangan pembakaran, sebelum yakin api sudah padam buah anggrek jangan dimasukkan ke dalam alkohol)*
  - c. Letakkan buah anggrek pada petridish steril
6. Belah buah anggrek dengan skalpel steril
7. Biji siap disebar pada media, dengan menggunakan skalpel, pinset atau pipet

#### **F. Pengamatan**

Amati kecepatan pertumbuhan protokorm. Apabila dalam praktikum digunakan modifikasi media, perhatikan apakah ada perbedaan kecepatan pertumbuhan pada media yang berbeda.

#### **G. Diskusi**

Amati pertumbuhan protokorm, jelaskan tahap-tahap apa saja yang tampak pada sel-sel protokorm. Unsur apa yang diperlukan untuk pertumbuhan protokorm?



<b>Topik 7</b>	: <b>Overplanting Bibit Anggrek</b>
<b>B. Tujuan</b>	: Penjarangan anggrek dalam botol
<b>C. Prinsip</b>	:
<p><b>Overplanting</b> anggrek adalah pemindahan bibit tanaman anggrek dalam botol ke botol lain dengan media baru yang komposisinya sama dan bibit yang ditanam di dalam botol kultur yang baru lebih sedikit jumlahnya. Maksud dari pemindahan ini adalah untuk menjaga kestabilan pH dan nutrisi tetap tersedia selama pertumbuhan bibit. Overplanting juga sering disebut dengan istilah <b>sub-kultur</b> dalam teknik <i>in vitro</i>. Secara umum tujuan dari sub kultur adalah :</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nutrisi pada media sudah habis atau terserap semua (terjadi fenomena defisiensi sehingga kualitas bibit menurun)</li> <li>2. Media mengering sehingga kadar garam dan sukrosa meningkat</li> <li>3. Pertumbuhan tanaman di dalam botol telah maksimal (mencapai tutup botol) sehingga harus segera dipindah</li> <li>4. Bahan tanam diperlukan untuk memperbanyak selanjutnya</li> <li>5. Terjadi browning yang tampak dengan media menjadi coklat atau hitam sehingga eksplan perlu dipindah ke media baru</li> <li>6. Eksplan perlu dipindah ke media lain untuk perkembangan selanjutnya</li> <li>7. Media menjadi cair akibat penurunan pH oleh tanaman / eksplan</li> </ol> <p>Overplanting anggrek biasanya dilakukan 2-3 kali sampai tunas-tunasnya cukup besar untuk dipindah media di luar lingkungan <i>in vitro</i>. Media overplanting bias berbeda dengan media dimana biji anggrek ditanam pada tahap awal. Untuk satu fase (hidup dalam satu botol), akan bervariasi tergantung jenis anggrek dan kondisi lingkungan sehingga bervariasi dari 6 bulan sampai 2 tahun. Pertumbuhan anggrek dari mulai biji, perkecambahan, perkembangan bibit <i>in vitro</i> dan tahap awal aklimatisasi, akan lebih baik jika berada berdekatan dengan individu lain (<i>community effect</i>). Hal tersebut membantu dalam keperluan iklim mikro selama perkembangan awal anggrek.</p>	

<b>D. Alat &amp; Bahan</b>	:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Entkas</li> <li>2. Petridish steril</li> <li>3. Pinset panjang dan pinset pendek steril</li> <li>4. Sarung tangan</li> <li>5. Alkohol 70%</li> <li>6. Formalin 10%</li> <li>7. Medium anggrek dalam botol</li> <li>8. Bibit anggrek dalam botol, siap dipindah</li> </ol>	
<b>E. Pengamatan</b>	:
<p>Amati pertumbuhan bibit yang baru dipindah ke botol media yang baru tersebut. Apakah terjadi pertumbuhan dengan terlihat adanya peningkatan ukuran bibit. Pengamatan dilakukan tiap hari. Kalau media terkontaminasi oleh jamur atau bakteri, bibit segera dikeluarkan, disteril dengan fungisida sebelum dipindahkan ke botol media yang baru</p>	
<b>F. Cara Kerja</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sterilisasi entkas dengan penyemprotan alkohol 70%</li> <li>2. Alat dan bahan yang diperlukan dimasukkan ke dalam entkas, setelah terlebih dahulu disteril dengan membasahi bagian luarnya dengan kain yang telah direndam alkohol 70%</li> <li>3. Semprot entkas dengan menggunakan campuran alkohol 70% : formalin 10% = 1 : 1, kemudian biarkan entkas selama 10 menit (catatan: formalin hanya dipakai apabila menggunakan entkas!!)</li> <li>4. Sterilkan sarung tangan yang akan dipakai dengan alkohol 70%</li> </ol>	

Overplanting dimulai dengan menyiapkan alat-alat yang diperlukan di dalam entkas

5. Keluarkan bibit dari botol sebanyak  $\pm 35 - 40$  tanaman, letakkan pada petridish steril. Bibit dikeluarkan dengan cara menjepit bagian di antara akar dan daun, kemudian bibit ditarik dengan diusahakan agar akar keluar lebih dahulu
6. Pisahkan bibit yang masih berhimpitan dengan bibit yang lain, juga media lama yang masih melekat pada bibit
7. Tanam bibit ke dalam botol yang berisi medium baru satu per satu, sehingga jumlahnya dalam botol  $\pm 20$  bibit (jumlah bibit yang ditanam tergantung ukuran botol yang dipakai)
8. Tutup botol dengan penutup karet berlubang yang telah disumbat dengan kapas. Beri label
9. Keluarkan botol yang baru ditanam bibit anggrek dan letakkan pada rak yang tersedia

<b><i>G. Diskusi</i></b>	
--------------------------	--

Mengapa bibit anggrek dalam botol perlu dilakukan penjarangan ?

Mengapa media dalam botol yang akan dipakai untuk menanam bibit anggrek yang dipindah harus haru? Mengapa pH media perlu diperhatikan?

Apakah yang terjadi kalau seandainya media tempat tumbuh bibit anggrek dalam botol tersebut terkontaminasi, kemudian bibit anggrek tetap ditumbuhkan di dalam botol tersebut?

## Daftar Pustaka

- Arditti, J. 2010. Plenary Presentation : History of Orchid Propagation. *AsPac J.Mol.Biol.Biotechnol.* Vol 18 (1) Supplement : 171-174.
- Daisy, P. S. H. dan Ari W., 1994, *Teknik Kultur Jaringan*, Penerbit Kanisius
- Gamborg, O.L. dan J.P. Shyluk. 1981. Nutrition, Media, and Characteristics of Plant Cell and Tissue Cultures. In *Plant Tissue Culture – Methods and Applications in Agriculture* (T.A.Thorpe ed.). Academic Press. London. Hal : 21-44
- Hartmann, H T & D E Kester, 1983, *Plant Propagation, principles & practices*, Fourth edition, Prentice-Hall International Inc.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands.
- Sumardi, I. dan A. Indrianto, - , *Teknik Kultur Jaringan*, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Sumardi, I., -, *Kultur Jaringan Tumbuhan*, PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada
- Suryowinoto, M., *Pemuliaan Tanaman Secara in-vitro*, Petunjuk Praktikum
- Suryowinoto, M. 1989, *Fusi Protoplas*, PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Suryowinoto, S. M. dan M. Suryowinoto, 1977, *Perbanyakan Vegetatif pada Anggrek*, Penerbitan Yayasan Kanisius.