

**Pengenalan Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan,
Pembuatan Media dan Metode Sterilisasi
Lili Sugiyarto
Jurdik Biologi FMIPA UNY
lili_sugiyarto@uny.ac.id**

Kultur jaringan adalah salah satu metode yang digunakan dalam pengembangan Bioteknologi Tumbuhan. Metode ini merupakan prosedur pemeliharaan dan pertumbuhan jaringan tanaman (sel, kalus, protoplas) serta organ (batang, akar, embrio) pada kultur aseptis (*in vitro*). Metode kultur jaringan diantaranya digunakan untuk memperbanyak tanaman, modifikasi genotip (*plant breeding*), produksi metabolit sekunder, pemeliharaan plasma nutfah, penyelamatan embrio (*embryo rescue*) (Hartmann dkk., 1997). Menurut Pierik (1977), ada beberapa kelebihan metode kultur jaringan dibandingkan metode yang lain yaitu 1). Metode memperbanyak lebih cepat dibandingkan metode yang lain; 2). Metode ini digunakan untuk memperbanyak tanaman yang sulit diperbanyak dengan metode konvensional; 3). Tanaman hasil kultur jaringan mempunyai jaringan yang lebih kuat dibandingkan metode yang lain ;4). Dapat digunakan untuk memperoleh tanaman yang bebas penyakit dan tidak terbatas oleh musim dalam pelaksanaannya.

Prinsip dasar kultur jaringan adalah teori totipotensi menurut Schwann dan Schleiden (1838) yang menyatakan bahwa setiap sel mempunyai kemampuan untuk tumbuh menjadi individu baru jika berada pada lingkungan yang sesuai. Kondisi lingkungan untuk kultur jaringan harus terkontrol baik dari segi suhu, kelembaban dan cahaya. Selain kondisi lingkungan yang terkontrol, suplai nutrisi dan penambahan zat pengatur tumbuh juga sangat penting.

Zat pengatur tumbuh sangat penting digunakan untuk mengontrol organogenesis dan morfogenesis dalam pembentukan dan perkembangan tunas dan akar, serta pembentukan kalus. Penggunaan ZPT tergantung pada arah pertumbuhan jaringan tanaman yang diinginkan. Jenis dan konsentrasi ZPT untuk setiap tanaman berbeda tergantung pada genotip

dan kondisi fisiologi jaringan tanaman (Endang G. Lestari, 2011). Metode kultur jaringan merupakan prosedur laboratorium aseptis yang membutuhkan fasilitas yang unik dan keahlian khusus. Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan agar metode kultur jaringan dapat dilaksanakan, diantaranya adalah

1. Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan
2. Alat dan bahan yang diperlukan dalam metode kultur jaringan tumbuhan
3. Metode Sterilisasi

A. Pengenalan Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan

Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan terdiri dari ruangan-ruangan yang dipisahkan berdasarkan fungsinya, yaitu ruang persiapan (*preparation area*), ruang penanaman (*transfer area*), ruang pertumbuhan (*growing area*). Seberapapun luasnya laboratorium, ketiga ruang tersebut harus ada. Ketiga ruang di atas juga harus terpisah dari kebun bibit dan *green house* untuk menghindari masuknya kontaminasi ke dalam ruang kultur. Kebersihan lantai, meja dan kursi harus terus dijaga secara intensif (Hartman dkk, 1997).

1. Ruang Persiapan (*preparation area*)

Ruang persiapan merupakan ruangan yang mempunyai 3 fungsi dasar yaitu untuk membersihkan alat-alat (alat-alat gelas seperti petri, botol, dll), persiapan dan sterilisasi media, dan penyimpanan alat-alat gelas. Sebuah bak untuk mencuci yang dilengkapi dengan kran untuk aliran air mengalir juga diperlukan untuk membersihkan alat-alat berbahan gelas. Selain itu diperlukan meja yang permukaannya dilapisi dengan bahan yang mudah dibersihkan.

Peralatan selanjutnya yang digunakan dalam ruang preparasi adalah lemari es untuk menyimpan larutan stok dan beberapa media, timbangan analitik, autoclave, pH meter, magnetic stirrer, destilator (Hartmann dkk., 1997). Selain alat di atas, ruangan ini juga

dilengkapi dengan alat-alat seperti *Hot plate* dengan *magnetic stirrer*, Oven, pH meter , kompor gas, labu takar, gelas piala, erlenmeyer, pengaduk gelas, spatula, *petridish*, pipet, botol kultur, pisau *scalpel*

2. Ruangi Penanaman (*Transfer area*)

Ruang penanaman merupakan ruang yang digunakan untuk isolasi, inokulasi dan subkultur (penjarangan) pada kondisi steril yang di dalamnya terdapat lemari kaca atau kabinet yang disebut *Laminar Airflow (LAF)*. *Laminar Airflow* ini digunakan untuk pemotongan eksplan, melakukan penanaman dan subkultur. Akan tetapi jika tidak ada LAF yang memadai, tahap isolasi (pemotongan eksplan) dapat dilakukan di antara kertas saring steril. Sangat dianjurkan untuk menggunakan jas laboratorium yang bersih selama tahap persiapan dan mensterilkan tangan dengan alkohol 96% (Pierik, 1987). Alat-alat seperti *scalpel*, gunting dan alat-alat inokulasi lainnya harus disterilkan dengan alkohol 96% dan dilanjutkan dengan pemanasan di atas api bunsen. Lampu ultraviolet (UV) juga digunakan untuk mensterilkan ruang, sebelum LAF digunakan.

Pemotongan eksplan juga dilakukan di dalam LAF yang kemudian dilanjutkan dengan beberapa tahapan sterilisasi sebelum ditanam pada media kultur. Selama inokulasi atau penanaman, botol yang berisi media padat pada prinsipnya pada kondisi horisontal, hal ini dilakukan untuk mengurangi kontaminasi, terutama ketika tidak bekerja dalam LAF.

Subkultur atau tahap penjarangan juga dilakukan dalam LAF, dan merupakan tahapan yang perlu dilakukan pada metode kultur jaringan. Ada beberapa alasan perlu dilakukannya subkultur, diantaranya yaitu nutrisi media yang semakin lama semakin berkurang, munculnya browning atau media agar menjadi kecoklatan karena jaringan tanaman kadang mengeluarkan senyawa toksik, atau eksplan membutuhkan tahap perkembangan lebih lanjut.

3. Ruang pertumbuhan atau Inkubasi (*Growing area*)




Growing area merupakan ruang pertumbuhan atau ruang penyimpanan hasil kultur pada kondisi cahaya dan temperatur yang terkontrol. Ruang pertumbuhan ini terdiri dari rak-rak yang biasanya terbuat dari kaca dan digunakan untuk meletakkan botol-botol kultur setelah proses penanaman pada ruang isolasi di dalam LAF. Rak-rak yang digunakan untuk inkubasi dilengkapi dengan lampu neon di atasnya sebagai sumber cahaya. Sedangkan ruang pertumbuhan dalam kultur jaringan dilengkapi dengan *Air conditioner* (AC) untuk mengontrol suhu ruang.







B. Alat dan Bahan dalam Metode Kultur Jaringan Tumbuhan

1. Alat-alat yang diperlukan dalam metode kultur jaringan tumbuhan

Gelas ukur, erlenmeyer, *petridish*, *hotplate*, timbangan analitik, botol-botol gelas, oven, *magnetic stirrer*, destilator, *autoclave*, lemari es, *laminar airflow*, pinset, *scalpel*, spatula, rak inkubasi, bunsen, aluminium foil, karet, plastik gulung, batang pengaduk kaca. Gambar atau foto beberapa alat tersebut dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Gambar dan fungsi beberapa alat dalam metode kultur jaringan

No	Nama alat	Gambar/Foto	Fungsi
1.	<i>A Laminar Air-flow Cabinet</i> (LAF)		Kabinet yang digunakan untuk isolasi, inokulasi dan subkultur. <i>Laminar air-flow cabinet</i> ini harus steril dan bebas dari debu yang dilengkapi dengan UV, lampu neon dan blower. Kabinet ini dapat diganti dengan enkas (kotak tertutup yang terbuat dari kaca atau triplek dengan permukaan licin putih).
2.	Oven		Untuk mengeringkan alat-alat setelah disterilkan.
3.	<i>Autoclave</i>		Untuk mensterilkan alat-alat seperti botol kultur, pinset, <i>scalpel</i> , dan media kultur.

4.	Destilator		Untuk destilasi air sehingga diperoleh <i>aquadest</i>
5.	<i>Hotplate</i>		Bersama dengan stirrer berperan untuk menghomogenkan senyawa-senyawa dalam media kultur dan untuk memanaskan media padat (agar)
6.	Lemari es		Untuk menyimpan stok-stok media kultur agar tidak cepat rusak
7.	Rak inkubasi		Untuk meletakkan botol-botol kultur setelah proses penanaman yang dilengkapi dengan lampu neon sebagai sumber cahaya, diletakkan pada ruang berAC sehingga suhu terkontrol, dan harus dijaga kebersihannya. Rak dapat terbuat dari kaca atau triplek yang permukaannya putih.
8.	<i>Shaker</i>		Alat penggojog botol kultur dan digunakan untuk mengocok eksplan yang ditanam pada media kultur cair.
9.	Botol-botol media		Botol-botol tempat media dan untuk menanam eksplan kultur jaringan. Ukuran botol bervariasi dan disesuaikan dengan kebutuhan kultur jaringan. Pemilihan botol diusahakan yang mulut botolnya kecil, bening dan tahan terhadap tekanan dan suhu tinggi.

(Dokumentasi Paramita, 2013)

2. Bahan-bahan yang diperlukan dalam metode kultur jaringan tumbuhan

Bahan-bahan yang diperlukan dan biasa digunakan dalam metode kultur jaringan adalah media MS (*Murashige and Skoog*), yang terdiri dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, iron, zat pengatur tumbuh (ZPT), myoinositol, sukrosa dan agar. Bahan-bahan seperti makronutrien, mikronutrien, vitamin, zpt, dan iron biasanya dibuat dalam bentuk larutan stok (media yang lebih pekat), sehingga pada saat akan membuat media, cukup mengambil larutan stok yang sudah dibuat. Pembuatan stok bertujuan untuk mempermudah dibandingkan setiap kali membuat media harus menimbang (Edhi Sandra, 2013). Pada pembuatan stok media, pemberian label pada botol larutan stok juga jangan sampai lupa dan harus benar agar mempermudah pada saat akan membuat media kultur. Selain media kultur jaringan, ada beberapa bahan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan, diantaranya adalah detergen, alkohol, *clorox*, *aquadest* steril, dan spiritus yang dapat digunakan untuk sterilisasi permukaan LAF atau untuk cairan dalam bunsen.

Media MS merupakan media kultur jaringan yang banyak digunakan untuk mengkulturkan berbagai jenis tanaman, karena media ini mengandung unsur hara makro dan mikro yang lebih lengkap dibandingkan penemu-penemu sebelumnya. Setelah penemuan media MS, banyak berkembang modifikasi-modifikasi media untuk tujuan tertentu, contoh media Nitsch & Nitsch (1969) untuk kultur anther dan media SH (Schenk & Hidebrant) untuk kultur kalus monokotil dan dikotil (Edhi Sandra, 2013). Media VW (*Vacin & Went*) dan media organik yang digunakan untuk perbanyakan anggrek, serta media WPM (*Woody Plant Media*) untuk tanaman berkayu, atau tanaman perdu atau pohon berkayu.

C. Metode Sterilisasi

Sterilisasi merupakan tehnik membersihkan dan membebaskan suatu benda dari segala kehidupan mikroorganisme (protozoa, fungi, bakteri, dan virus). Sterilisasi adalah

tahap kunci keberhasilan dalam metode kultur jaringan. Sterilisasi ini meliputi sterilisasi ruangan, sterilisasi alat tanam, sterilisasi media tanam, dan sterilisasi eksplan.

1. Sterilisasi Ruang

Salah satu ruang yang harus dijaga kesterilannya adalah ruang transfer yang digunakan untuk inokulasi, isolasi dan subkultur. Ruangan ini biasanya tidak terlalu besar agar proses sterilisasinya tidak lama dan mudah. Sterilisasi ruangan dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 90%, dan sterilisasi lantai dengan kain pel yang dibasahi dengan alkohol 90% atau phenol. Sterilisasi ini mutlak dilakukan menjelang ruang inokulasi akan digunakan. Lampu ultraviolet dapat digunakan untuk sterilisasi ruang, dan biasanya selalu dinyalakan apabila ruang inokulasi tidak digunakan, serta dimatikan saat masuk dalam ruang ini (Edhi Sandra, 2013).

2. Sterilisasi Alat inokulasi (LAF cabinet)

Sterilisasi laminar dilakukan dengan spirtus atau alkohol 70%. Permukaan laminar sebelum mulai bekerja dibersihkan dengan tisu yang sudah dicelupkan alkohol 70%. Laminar yang dilengkapi dengan lampu UV, sebelum digunakan juga dinyalakan selama 1-2 jam untuk mematikan kontaminan yang ada di permukaan laminar. Hal serupa juga dilakukan setelah selesai melakukan penanaman atau inokulasi. Laminar harus tetap dijaga kebersihannya.

3. Sterilisasi Alat dan Media

Alat-alat logam dan gelas yang akan digunakan dalam kultur jaringan dapat disterilkan dengan *autoclave*. Alat-alat gelas dan logam disterilkan dengan *autoclave* pada temperatur 121°C dan tekanan 1 atm, selama 30 menit, sedangkan sterilisasi bahan atau media kultur selama 15 menit. Alat- alat seperti pinset dan scalpel selain disterilkan dengan *autoclave* dapat dilakukan dengan pembakaran di atas api bunsen. Botol-botol yang akan

disterilisasi sebelumnya ditutup dengan aluminium foil atau plastik dan diikat dengan karet. Aquadest disterilkan seperti sterilisasi alat selama 30 menit.

4. Sterilisasi Eksplan

Eksplan adalah bagian tanaman yang akan dikulturkan. Bahan eksplan dapat berupa organ, jaringan, maupun sel. Eksplan dari organ lebih mudah dikulturkan, misalnya : daun, batang, akar. Metode sterilisasi setiap eksplan berbeda, tergantung pada jenis tanamannya, bagian tanaman yang digunakan, morfologi permukaannya, umur tanamannya, kondisi tanamannya (sakit atau sehat pada saat pengambilan), musim saat pengambilan, dan lingkungan tumbuhnya. Pada prinsipnya, sterilisasi eksplan adalah mensterilkan dari kontaminasi mikroorganisme, tanpa mematikan eksplannya (Edhi Sandra, 2013).

Pada metode kultur jaringan untuk perbanyakan anggrek, eksplan yang digunakan adalah biji anggrek yang berasal dari buah anggrek yang sudah tua dan belum pecah. Kondisi buah yang masih muda atau buah tua yang sudah pecah akan berbeda tehnik sterilisasinya. Buah anggrek yang sudah tua dan belum pecah, sterilisasinya dengan cara membakar buah di atas api bunsen, sedangkan sterilisasi buah anggrek yang tua dan sudah pecah dilakukan dengan klorox. Setelah disterilisasi, buah disayat secara aseptik dan diambil bijinya untuk ditanam di media kultur (Edhi Sandra, 2013).

Daftar Pustaka

- Edhi Sandra .2013. Cara Mudah Memahami dan Menguasai Kultur Jaringan. IPB Press.
- Endang G. Lestari. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakan Tanaman melalui Kultur Jaringan. Jurnal Biogen 7 (1):63-68
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies Jr., and R.L. Geneve. 1997. Plant Propagation: Principle And Practices. Sixth Ed.
- Pierik, R.M.L. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.The Netherlands.

