

LAPORAN PRAKTIKUM
KULTUR JARINGAN (AGT-323)



Oleh :

ANDRIA

E1J009033

Minat Ilmu Agronomi

PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS BENGKULU

2012

Daftar Isi

Cover Sampul.....	1
Daftar Isi.....	2
Pendahuluan.....	3
Acara I (<i>Umum Teknik Kultur Asistensi Dan Pengenalan Jaringan</i>).....	5
Acara II (<i>Pengenalan Laboratorium Kultur Jaringan Dan Peralatan Pendukung</i>)..	6
Acara III (<i>Sterilisasi Ruang, Alat, Dan Media Kultur In Vitro</i>).....	10
Acara IV (<i>Pembuatan Larutan Stok</i>).....	13
Acara V (<i>Pembuatan Media Kultur</i>).....	23
Acara IX (<i>Sub Kultur Pada Tanaman Kerisan</i>).....	29
Daftar Pustaka.....	36
Lampiran.....	x

Pendahuluan

Kultur jaringan dalam bahasa asing disebut sebagai tissue culture. *Kultur* adalah budidaya dan *jaringan* adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. jadi, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya. Kultur jaringan akan lebih besar presentase keberhasilannya bila menggunakan jaringan meristem. Jaringan *meristem* adalah jaringan muda, yaitu jaringan yang terdiri dari sel-sel yang selalu membelah, dinding tipis, plasmanya penuh dan vakuolanya kecil-kecil. Kebanyakan orang menggunakan jaringan ini untuk tissue culture. Sebab, jaringan meristem keadaannya selalu membelah, sehingga diperkirakan mempunyai zat hormon yang mengatur pembelahan.

Kultur jaringan merupakan salah satu cara perbanyakan tanaman secara vegetatif. Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah perbanyakan tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril.

Metode kultur jaringan dikembangkan untuk membantu memperbanyak tanaman, khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangbiakkan secara generatif. Bibit yang dihasilkan dari kultur jaringan mempunyai beberapa keunggulan, antara lain: mempunyai sifat yang identik dengan induknya, dapat diperbanyak dalam jumlah yang besar sehingga tidak terlalu membutuhkan tempat yang luas, mampu menghasilkan bibit dengan jumlah besar dalam waktu yang singkat, kesehatan dan mutu bibit lebih terjamin, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibandingkan dengan perbanyakan konvensional.

Tahapan yang dilakukan dalam perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan adalah : 1) Pembuatan media 2) Inisiasi 3) Sterilisasi 4) Multiplikasi 5) Pengakaran 6) Aklimatisasi

Media merupakan faktor penentu dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan

diperbanyak. Media yang digunakan biasanya terdiri dari garam mineral, vitamin, dan hormon. Selain itu, diperlukan juga bahan tambahan seperti agar, gula, dan lain-lain. Zat pengatur tumbuh (hormon) yang ditambahkan juga bervariasi, baik jenisnya maupun jumlahnya, tergantung dengan tujuan dari kultur jaringan yang dilakukan.

Inisiasi adalah pengambilan eksplan dari bagian tanaman yang akan dikulturkan. Bagian tanaman yang sering digunakan untuk kegiatan kultur jaringan adalah tunas.

Sterilisasi adalah bahwa segala kegiatan dalam kultur jaringan harus dilakukan di tempat yang steril, yaitu di *laminar flow* dan menggunakan alat-alat yang juga steril. Sterilisasi juga dilakukan terhadap peralatan, yaitu menggunakan etanol yang disemprotkan secara merata pada peralatan yang digunakan. Teknisi yang melakukan kultur jaringan juga harus steril.

Multiplikasi adalah kegiatan memperbanyak calon tanaman dengan menanam eksplan pada media. Kegiatan ini dilakukan di *laminar flow* untuk menghindari adanya kontaminasi yang menyebabkan gagalnya pertumbuhan eksplan. Tabung reaksi yang telah ditanami eksplan diletakkan pada rak-rak dan ditempatkan di tempat yang steril dengan suhu kamar.

Pengakaran adalah fase dimana eksplan akan menunjukkan adanya pertumbuhan akar yang menandai bahwa proses kultur jaringan yang dilakukan mulai berjalan dengan baik. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat pertumbuhan dan perkembangan akar serta untuk melihat adanya kontaminasi oleh bakteri ataupun jamur. Eksplan yang terkontaminasi akan menunjukkan gejala seperti berwarna putih atau biru (disebabkan jamur) atau busuk (disebabkan bakteri).

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

Acara I (*Umum Teknik Kultur Asistensi Dan Pengenalan Jaringan*)

1.1 Tinjauan Pustaka

Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan maupun organ , serta menumbuhkannya dalam keadaan aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali (Sany, 2007).

Konsep awal dari kultur jaringan adalah diketahuinya kemampuan totipotensi dari sel tumbuhan. Totipotensi sel (Total Genetic Potential), artinya setiap sel memiliki potensi genetik seperti zigot yaitu mampu memperbanyak diri dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap.

Lingkungan aseptik sebagai salah satu syarat utama suksesnya kegiatan kultur jaringan perlu diterapkan dengan sungguh-sungguh. Untuk itu perlu adanya usaha sterilisasi peralatan yang akan digunakan dalam proses kultur.

Tidak hanya terbatas pada peralatan, namun ruangan yang akan digunakan pun harus dalam kondisi aseptik. Tujuan utama dari sterilisasi ruangan maupun peralatan kultur pada dasarnya untuk menghindari kontaminasi oleh mikro organisme yang ada di peralatan maupun di udara bebas sekitar ruangan. Perlakuan tersebut mutlak dilakukan terutama pada ruang penabur atau tempat yang digunakan untuk penanaman eksplan.

1.2 Adapun Acara yang akan dipraktikkan sebelum Ujian Tengah Semester adalah, sebagai berikut :

Acara I (*Umum Teknik Kultur Asistensi Dan Pengenalan Jaringan*)

Acara II (*Pengenalan Laboratorium Kultur Jaringan Dan Peralatan Pendukung*)

Acara III (*Sterilisasi Ruang, Alat, Dan Media Kultur In Vitro*)

Acara IV (*Pembuatan Larutan Stok*)

Acara V (*Pembuatan Media Kultur*)

Acara IX (*Sub Kultur Pada Tanaman Kerisan*)

Acara II (Pengenalan Laboratorium Kultur Jaringan Dan Peralatan Pendukung)

2.1 Tinjauan Pustaka

Laboratorium sering diartikan sebagai suatu ruang atau tempat dilakukannya Percobaan atau penelitian. Ruang dimaksud dapat berupa gedung yang dibatasi oleh dinding dan atap atau alam terbuka misalnya kebun botani.

Pada pembelajaran sains termasuk kultur jaringan di dalamnya keberadaan laboratorium, menjadi sangat penting. Pada konteks proses belajar mengajar sains di sekolah-sekolah atau pun di Universitas sering kali istilah laboratorium diartikan dalam pengertian sempit yaitu ruangan yang di dalamnya terdapat sejumlah alat dan bahan praktikum.

Disamping bentuk, ukuran laboratorium perlu mendapat perhatian, karena fungsi laboratorium di sekolah-sekolah tidak hanya digunakan untuk percobaan yang bersifat individual. Umumnya laboratorium digunakan untuk berbagai kegiatan percobaan dalam konteks proses belajar mengajar. Jumlah Mahasiswa yang melebihi kapasitas ruangan laboratorium dalam satu kali percobaan akan mengganggu kenyamanan dan jalannya percobaan atau aktivitas lainnya. Sebuah laboratorium dengan ukuran lantai seluas 100 m² dapat digunakan oleh sekitar 40 orang siswa, dengan rasio setiap siswa menggunakan tempat seluas 2,5 m² dari keseluruhan luas laboratorium. Laboratorium untuk keperluan praktikum mahasiswa membutuhkan ukuran lebih luas lagi, misalnya 3 – 4 m² untuk setiap mahasiswa.

2.2 Tujuan praktikum

1. Untuk mengetahui dan mengenal desain laboratorium bioteknologi tanaman secara langsung dan terinci
2. Untuk mengenalkan alat-alat yang digunakan dalam kegiatan kultur jaringan
3. Untuk memberitahukan keterampilan dalam menggunakan alat-alat tersedia di laboratorium bioteknologi

2.3 Metode Pelaksanaan Praktikum

- A. Bahan dan Alat: Laminar air flow cabinet, Autoclave, Hotplate and magnetic stirrer, Digital Analytic Balance, Oven, Dissecting kits, Pipet takar berbagai ukuran, Gelas ukur berbagai takaran, Bola pipet.

B. Cara kerja:

1. Amati dan buat gambar sketsa masing-masing ruangan.
2. Buat gambar alat yang terdapat pada masing-masing ruangan.
3. Buat ringkasan cara kerja oven, autoclave dan timbangan analitik.

2.4 Hasil dan Pembahasan

Alat-alat Laboratorium

No	Nama Alat	Fungsi
1	Botol Kultur	Sebagai tempat untuk menkulturkan atau menanam eksplan
2	Cawan Petridish	sebagai media perkembangan mikroorganisme
3	Laminar Air Flow	untuk menanam eksplan ke dalam botol dalam kondisi steril atau melakukan sub kultur yang dilengkapi dengan <i>blower</i> dan lampu UV
4	Autoclave	untuk mensterilkan media, baik media agar atau pun media cair. Juga dapat digunakan untuk sterilisasi tanah atau kompos yang akan digunakan untuk media tanaman.
5	Hotplate	untuk homogen dan juga untuk pemanas. Hot plate juga merupakan alat untuk mencampur dan memasak media kultur. Hot plate digunakan untuk memasak segala macam bahan nutrisi dengan melibatkan pengaduk dan pemanas.
6	Oven	Digunakan untuk sterilisasi botol kultur, gunting, pinset, pisau, dan lain sebagainya yang digunakan dalam kultur jaringan
7	Pinset	Untuk mengambil eksplan
8	Gelas Ukur	Untuk menuangkan atau mempersiapkan bahan kimia dan aquades dalam pembuatan media.

Ruang Persiapan Media

Di dalam ruang persiapan media harus tersedia tempat untuk penyimpanan bahan-bahan kimia, gelas kultur dan penutupnya, dan peralatan gelas yang diperlukan untuk pembuatan media. Meja yang kokoh atau "bench" untuk penyimpanan "hot plate magnetic stirrer", pH meter, timbangan, dan dispenser harus tersedia. Peralatan lain yang biasanya ada di ruang persiapan dan pembuatan media antara lain alat vaccum, distiling unit, bunsen, mikrowave, kompor gas, oven dan autoclave untuk sterilisasi media, peralatan gelas dan peralatan lain. Didalam pembuatan media kultur, bahan-bahan kimia yang digunakan harus

yang bertaraf analitik dan penimbangannya harus baik dan benar. Agar lebih akurat, dalam pembuatan media harus dilakukan tahap demi tahap dan bahan-bahan yang digunakan harus di "checklist". Air yang digunakan dalam pembuatan media harus berkualitas tinggi yang mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi. Air ledeng atau sumur tidak digunakan untuk pembuatan media karena mengandung kation-kation (amonium, kalsium, besi, magnesium natrium, dll.), anion-anion (bikarbonat, klorida, flourida, fosfat, dll.), mikroorganisme (algae, jamur, bakteri), gas-gas (oksigen, CO₂, nitrogen) dan bahan-bahan lain (minyak, bahan organik dll.). Air yang digunakan dalam kultur jaringan harus mempunyai standar type II (minimum) yaitu bebas pirogen, gas, dan bahan organik dan mempunyai konduktivitas elektrik kurang dari 1.0 $\mu\text{mho/cm}$. gambar Metoda yang paling umum untuk pemurnian air standar type II adalah dengan deionisasi yang diikuti dengan satu atau dua destilasi gelas. Deionisasi menghilangkan dari bahan yang bersifat ionik dan proses destilasi menghilangkan molekul-molekul organik, mikroorganisme dan pirogen. Metode-metode lain yang dapat digunakan untuk mendapatkan air murni type II adalah

- (1) penyaringan dengan cara absorpsi, dengan menggunakan karbon aktif untuk menghilangkan kontaminan organik dan bebas klorine;
- (2) penyaringan dengan membran, yang menghilangkan bahan-bahan partikulat dan kontaminasi oleh bakteri; dan
- (3) reverse osmosis, yang menghilangkan sekitar 99% bakteri, bahan organik dan bahan partikulat.

Ruang Stok

Dalam ruang ini tersedia 1 unit refrigerator (kulkas) dan freezer untuk penyimpanan larutan stok dan bahan kimia yang akan digunakan dalam pembuatan media.

Ruang Transfer

Teknik kultur jaringan dapat berlangsung dengan sukses apabila dilakukan dibawah kondisi laboratorium yang sangat bersih. Oleh karena itu pemindahan atau transfer biakan dikerjakan dalam ruang transfer steril atau laminar air flow. Laminar air flow yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah tipe horizontal dan dirancang dengan mempunyai ruangan yang bebas dari partikel debu yang halus dan dilengkapi dengan sinar ultra violet (UV) serta unit penyaring udara. Penyaring udara harus mempunyai filter udara dengan efisiensi tinggi atau "high-efficiency particulate air (HEPA filter). HEPA filter harus mempunyai pori sekitar 0.3 μm dengan efisiensi kerja berkisar 99.97 – 99.99%. Semua

permukaan ruang kerja dalam laminar harus dirancang dan mempunyai konstruksi sedemikian rupa sehingga debu dan mikroorganisme tidak dapat berakumulasi dan permukaan tempat kerja dapat mudah dibersihkan dan diinfeksi.

Ruang Kultur

Semua jenis kultur harus disimpan dalam tempat yang terkontrol baik temperatur, sirkulasi udara, kelembaban maupun kualitas dan lamanya cahaya. Faktor-faktor lingkungan tersebut akan mempengaruhi proses pertumbuhan dan diferensiasi biakan baik secara langsung maupun tidak langsung. Kultur protoplas, suspensi sel dan kultur anther adalah yang paling sensitif terhadap kondisi lingkungan. Suhu ruang kultur untuk pertumbuhan umumnya berkisar antara 15o – 30oC, dengan fluktuasi kurang dari $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$; akan tetapi kisaran suhu yang lebih besar mungkin diperlukan untuk tujuan percobaan. Ruang kultur harus mempunyai pencahayaan hingga 10.000 lux. Suhu dan cahaya harus dapat diprogram selama 24 jam. Ventilasi udara harus baik dengan kelembaban berkisar 20-98%.

2.5 Kesimpulan

1. Laboratorium Kultur jaringan UNIB terdiri dari ruang persiapan, ruang stok, ruang transfer dan ruang penyimpanan
2. Alat-alat kultur jaringan banyak tersedia di ruangan persiapan.

Acara III (*Sterilisasi Ruang, Alat, Dan Media Kultur In Vitro*)

3.1 Tinjauan Pustaka

Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti sekelompok sel atau jaringan yang ditumbuhkan dengan kondisi aseptik, sehingga bagian tanaman tersebut dapat memperbanyak diri tumbuh menjadi tanaman lengkap kembali.

Pelaksanaan teknik ini memerlukan berbagai prasyarat untuk mendukung kehidupan jaringan yang dibiakkan. Hal yang paling esensial adalah wadah dan media tumbuh yang steril. Media adalah tempat bagi jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mendukung kehidupan jaringan. Media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan jaringan untuk hidup dan memperbanyak dirinya.

Sebagai syarat mutlak suksesnya kultur jaringan tanaman, biasanya sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Bahkan autoklaf juga dapat digunakan untuk sterilisasi media tumbuh kultur jaringan. Tipe autoklaf yang dapat digunakan untuk sterilisasi sangatlah beragam macamnya, mulai dari yang sederhana sampai digital (terprogram) (Gunawan, 1988).

Autoklaf yang sederhana menggunakan sumber uap dari pemanasan air yang ditambahkan ke dalam autoklaf. Pemanasan air dapat menggunakan kompor atau api Bunsen. Dengan autoklaf sederhana ini, tekanan dan temperatur diatur dengan jumlah panas dari api. Kelemahan dari autoklaf ini adalah bahwa perlu adanya penjagaan dan pengaturan panas secara manual dan terkontrol, selama masa sterilisasi dilakukan. Tetapi autoklaf ini mempunyai keuntungan, yaitu: lebih sederhana sederhana, harga relatif murah, tidak tergantung dari aliran listrik yang sering merupakan problema untuk negara-negara yang sedang berkembang, serta lebih cepat dari autoklaf listrik yang seukuran dan setaraf.

Autoklaf yang lebih komplit menggunakan sumber energi dari listrik. Alatnya dilengkapi dengan timer dan thermostat. Bila pengatur otomatis ini berjalan dengan baik. Maka autoklaf dapat dijalankan sambil mengerjakan pekerjaan lain. Kelemahannya adalah bila salah satu pengatur tidak bekerja, maka pekerjaan persiapan media menjadi sia-sia dan kemungkinan menyebabkan kerusakan total pada autoklaf. Sebagai sumber uap, juga berasal dari air yang ditambahkan ke dalam autoklaf dan dididihkan.

Biasanya untuk laboratorium komersial, menurut Gunawan (1988), diperlukan autoklaf dengan kapasitas besar dan sumber uap biasanya dari boiler yang terpisah. Autoklaf ini sangat cepat dan dapat diprogram waktu sterilisasi serta waktu pendinginan. Setelah sterilisasi bahan atau alat selesai, temperatur dan tekanan autoklaf diturunkan secara perlahan-lahan

dalam waktu 15-20 menit. Pada autoklaf yang programmable (memiliki program yang dapat diatur), panas ini diatur secara otomatis. Tetapi pada autoklaf yang sederhana hal ini harus diatur secara manual.

3.2 Tujuan

Mahasiswa diharapkan mampu:

- * Menyiapkan ruang dan alat-alat dalam budidaya kultur jaringan dengan benar.
- * Melakukan sterilisasi ruang dan alat dalam budidaya/ kultur jaringan dengan benar.

3.3 Metode Pelaksanaan Praktikum

Sterilisasi Lingkungan Kerja

Kebersihan lingkungan kerja secara keseluruhan dilakukan dengan cara membersihkan semua debu dan kotoran yang ada, selanjutnya dilakukan kegiatan fumigasi dengan menggunakan disinfektan ataupun senyawa formalin yang dilakukan secara periodik. Disamping itu, lingkungan kerja terutama pada ruang ruang transfer harus selalu dalam kondisi yang steril dari kontaminan. Pada ruang transfer biasanya dilengkapi dengan laminar air flow cabinet (LAC). Proses transfer atau penanaman eksplan dilakukan secara aseptik didalam LAC, karena dilengkapi dengan: 1. Filter HEPA (High Efficiency Particulate Air). 2. Ultraviolet lamp (UV Lamp). 3. Blower

Sterilisasi Air Dan Media Tanam

1. Botol yang telah diisi dengan air dan botol kultur yang telah berisi media kultur ditutup rapat dengan menggunakan aluminium distrelisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121 oC selama 15 menit pada tekanan 15 psi (*pound per square inchi*).
2. Selama proses sterilisasi berlangsung, autoclave ditutup rapat sehingga tekanan didalam autoclave naik.
3. Setelah proses disterilisasi selesai, suhu dan tekanan autoclave kembali keposisi 0, keluarkan botol kultur dari dalam autoclave.
4. Inkubasi didalam ruang kultur selama kurang lebih 1 minggu.

Sterilisasi Botol Kultur Yang Terkontaminasi:

1. Botol kultur yang bterkontaminasi dikeluarkan dari ruang kultur.

2. Sterilisasi langsung dengan menggunakan autoclave pada suhu 121 oC selama 30 menit pada tekanan 15 psi.
3. Selama proses sterilisasi berlangsung, autoclave ditutup rapat sehingga tekanan didalam autoclave naik.
4. Setelah proses sterilisasi selesai, suhu dan tekanan autoclave kembali keposisi 0, keluarkan botol kultur dari dalam autoclave.
5. Buang semua sisa media yang terkontaminasi pada tempat yang sudah disiapkan.
6. Rendam dalam larutan sodium hypochlorite (dapat menggunakan bayclin) dengan konsentrasi 50% selama minimal 1 jam.
7. Cuci dengan deterjen.
8. Bilas dengan air bersih yang mengalir.
9. Tempatkan didalam oven pada suhu 70-80 oC. Atau simpan kembali ditempat yang bersih.

Sterilisasi Glass Ware Dan Dissecting Kit

1. Cuci bersih glass ware dan dissecting kit yang akan disterilisasikan.
2. Bungkus glass ware dan dissecting kit dengan menggunakan alluminium foil atau kertas yang bersih.
3. Autoclave pada suhu 121 oC pada tekanan 15 psi selama 30 menit.
4. Setelah proses sterilisasi selesai, suhu dan tekanan autoclave kembali keposisi 0, alat-alat dari autoclave.
5. Simpan dalam oven atau dalam Laminar Air Flow Cabinet dengan posisi lampu UV tetap menyala.

3.4 Hasil Dan Pembahasan

3.4.1 Hasil Pengamatan

Beberapa peralatan yang disterilisasi menggunakan autoklaf diantaranya adalah:

1. Petridish: digunakan sebagai tempat peletakan potongan eksplan di LAF sebelum dilakukan penanaman.
2. Botol Kultur: digunakan sebagai botol tempat ditanamnya eksplan.
3. Erlenmeyer: digunakan untuk menyimpan larutan stok.
4. Scalpel: digunakan untuk memotong eksplan.

5. Pinset: digunakan untuk menjapit eksplan

6. Aluminium Foil: digunakan untuk menutup botol kultur maupun untuk melindungi larutan stok dari cahaya matahari secara langsung.

3.4.2 Pembahasan

Alat-alat yang digunakan harus dalam keadaan steril. Karena kondisi yang seteril akan menentukan berhasil tidaknya suatu kegiatan kultur jaringan. Karena jika kondisinya tidak steril, maka akan mudah terkena kontaminasi sehingga kemampuan ttipotensi sel akan terhambat. Alat-alat logam dan gelas yang digunakan pada saat penanaman dapat disterilkan dalam autoklaf. Alat tanam seperti: pinset dan gunting dapat juga disterilkan dengan pembakaran atau dengan pemanasan dalam bacticinerator ataupun pembakar bunsen.

Menurut Anonim (2009), khusus untuk skalpel, gagangnya dapat disterilkan dengan pemanasan, namun mata pisaunya (blade) dapat menjadi tumpul bila dipanaskan dalam temperature tinggi. Oleh karena itu untuk mata pisaunya dianjurkan cara sterilisasi dengan pencelupan dalam alkohol atau larutan kaporit.

Pada prinsipnya, sterilisasi autoclave menggunakan panas dan tekanan dari uap air. Temperature sterilasi biasanya 121°C , tekanan yang biasa digunakan antara 15-17,5 psi (pound per square inci) atau 1 atm. Lamanya sterilisasi tergantung dari volume dan jenis. Alat-alat dan air disterilkan selama 1 jam, tetapi media antara 20-40 menit tergantung dari volume bahan yang disterilkan.

Sterilisasi media yang terlalu lama dapat menyebabkan :

1. Penguraian gula.
2. Degradasi vitamin dan asam-asam amino.
3. Inaktifasi sitokinin zeatin riboside.
4. Perubahan pH yang berakibatkan depolimerisasi agar.

Autoklaf gas atau listrik portable pada umumnya mempergunakan sumber uap dari pemanasan air yang ditambahkan ke dalam autoklaf, sedangkan autoklaf besar pada laboratorium komersil pada umumnya menggunakan uap dari boiler sentral.

Bagian-bagian autoklaf :

1. Panci luar.
2. Panci dalam tempat meletakkan botol dengan alur tempat saluran uap.
3. Tutup beserta penunjuk tekanan dan saluran uap.
4. Katup pengeluaran uap.
5. Pengunci atau klem.

Sterilisasi Peralatan Kultur

1. Botol bersih diberi beberapa tetes aquadest dan tutup dengan kertas atau aluminium foil (jangan terlalu kencang bila menggunakan aluminium foil). Untuk botol-botol yang mempunyai tutup yang autoclaveable, jangan tutup terlalu kencang, karena selama pemanasan terjadi pemuaian.

2. Alat-alat yang perlu disterilkan sebelum penanaman adalah: pinset, gunting, gagang skalpel, kertas saring, petri-dish, botol-botol kosong, jarum dan pipet.
3. Alat-alat dan kertas saring dibungkus rapi dengan kertas tebal atau ditaruh dalam baki stainless steel dan bakinya dibungkus dengan kain tebal sebelum dimasukkan dalam autoklaf. Alumunium foil tidak direkomendasikan sebagai pembungkus, karena uap tidak dapat masuk ke dalam bungkus. Alat-alat sektio seperti pinset, gunting, gagang skalpel, dan jarum, dibungkus dengan kertas kopi atau kertas merang. Hindarkan penggunaan Al-foil karena uap sukar masuk kedalam bungkus sehingga sterilisasi kurang efektif.
4. Petri-dish akan disterilkan, juga dibungkus dengan kertas kopi atau kertas merang.
5. Temperatur yang digunakan untuk sterilisasi botol kultur kosong dan alat-alat yang akan digunakan untuk menanam eksplan, adalah 121°C pada tekanan 15 psi (pound per square inch) atau 1 atm selama 30-60 menit. Penghitungan waktu sterilisasi dimulai setelah tekanan dan temperatur yang diinginkan tercapai.

Selain menggunakan autoklaf, menurut Anonim (2009), sterilisasi dapat juga dilakukan dengan menggunakan oven. yaitu dengan cara botol-botol/tabung reaksi/erlenmeyer yang dipergunakan sebagai wadah, biasanya disterilkan dalam oven. Botol-botol yang sudah dicuci bersih, dimasukkan ke dalam oven dan dipanaskan selama 4 jam pada temperatur 160°C . Setelah disterilkan dapat langsung digunakan. Bila botol akan disimpan dalam kurun waktu yang cukup lama, maka sewaktu sterilisasi, mulut botol harus ditutup dengan alumunium foil.

3.5 Kesimpulan

- Berdasarkan data hasil pengamatan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa sterilisasi peralatan kultur dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 15-17,5 psi. selama 30 menit. Beberapa peralatan yang di sterilisasi menggunakan autoklaf antara lain botol kultur, petridish, Erlenmeyer, aluminium foil, skalpel, dan pinset.

Acara IV (*Pembuatan Larutan Stok*)

4.1 Tinjauan Pustaka

Larutan stok merupakan larutan yang berisi satu atau lebih komponen media yang konsentrasinya lebih tinggi daripada konsentrasi komponen tersebut dalam formulasi media yang akan dibuat. Larutan stok biasanya dibuat dengan konsentrasi 10, 100 atau 1000 kali lebih pekat. Jika larutan stok dibuat, pembuatan media dapat dilakukan dengan cara mengambil sejumlah larutan stok sehingga konsentrasinya menjadi sesuai dengan yang terdapat pada formulasi media yang dikehendaki (Yusnita, 2003).

Dalam pembuatan larutan stok, yang perlu diperhatikan adalah penyatuan beberapa komponen media sekaligus dalam suatu larutan stok dan harus mempertimbangkan kecocokan dan kestabilan dari sifat kimianya. Dalam larutan stok yang berisi beberapa komponen media jangan sampai ada endapan. Hal ini erat kaitannya dengan ketersediaan hara dalam media eksplan atau tanaman yang dikulturkan. Setelah larutan stok dibuat, pengambilannya untuk media dapat dilakukan dengan cara memipet atau menakarnya dengan gelas ukur (Yusnita, 2003).

Pembuatan larutan stok dimaksudkan untuk memberi kemudahan pekerjaan dalam pembuatan media selanjutnya antara lain;

1. Menghemat pekerjaan menimbang bahan media setiap kali ingin membuat media
2. Mengatasi kesulitan penimbangan dalam jumlah yang sangat kecil
3. Mengurangi kerusakan bahan kimia akibat terlalu sering dibuka dan ditutup

(Marlin dkk, 2007).

Pembuatan larutan stok berdasarkan pengelompokan dalam : Stok makro, stok mikro, stok Fe, stok vitamin dan stok hormone terutama bila larutan stok tidak disimpan terlalu lama (segera digunakan habis). Stok hormone dapat disimpan antara 2-4 minggu, sedangkan stok hara dapat disimpan 4-8 minggu. Dengan adanya larutan stok, pembuatan media selanjutnya hanya dengan teknik pengenceran dan pencampuran saja.

Hal yang perlu diperhatikan dalam pembuatan larutan stok adalah penyimpanan (daya simpan) larutan. Larutan yang sudah mengalami pengendapan, tidak dapat digunakan lagi. Pengendapan larutan stok umumnya terjadi bila kepekatan dapat dihindari dengan membuat larutan yang tidak terlalu pekat atau tidak menggunakan larutan campuran, yaitu dengan membuat satu larutan stok hanya untuk satu jenis bahan (terutama untuk unsur hara

makro). Kondisi simpan juga diperhatikan, karena ada beberapa bahan yang tidak tahan dalam suhu tinggi atau cahaya.

Pembuatan media dikelompokkan berdasarkan jenis bahan kimia yang digunakan, sehingga jika bahan kimia tersebut dicampur tidak terjadi interaksi yang menghasilkan senyawa baru. Biasanya pengelompokan dilakukan berdasarkan stok hara makro, stok hara mikro, vitamin dan stok hormone, terutama jika larutan stok tidak disimpan terlalu lam. Stok hara baik mikro maupu makro dapat disimpan dalam waktu yang relative lam yaitu 4-8 minggu, sedangkan stok hormone biasanya disimpan dalam jangka waktu 2-4 minggu (Marlin dkk, 2007).

Larutan stok dalam bentuk cair disimpan di dalam lemari es. Pembuatan larutan stok harus dilakukan dengan cermat, sebab larutan stok yang terlalu pekat akan mengalami penendapan di dalam lemari es. Jika terjadi pengendapan, maka sebelum larutan stok digunakan terlebih dahulu harus dipanaskan (Hendaryono dan Wijayani, 2007). Larutan stok kadang-kadang ditumbuhi mikroorganisme. Larutan stok yang terkontaminasi mikroorganisme ini, juga tidak dapat digunakan lagi. Oleh karena itu kondisi simpan harus dijaga kebersihan dan tempat (wadah) larutan harus diusahakan cara-cara pembuatan larutan stok untuk media Murashige dan Skoog (1962).

4.2 Tujuan Praktikum

* Untuk mengetahui cara pembuatan larutan stok

4.3 Metode Pelaksanaan

A. Bahan dan Alat

Bahan dan Alat: senyawa –senyawa kimia penyusun media MS, dan Akuades, digital analytic balance, gelas piala, Erlenmeyer, gelas ukur (10 ml, 100 ml, 1000 ml), labu ukur (500 ml, 1000 ml), pipet, Bola hisap, hotplate dan magnetic stirrer, tissue, Aluminium foil.

B. Cara Kerja:

1. Menimbang bahan-bahan kimia yang dibutuhkan dalam pembuatan media MS sesuai dengan kebutuhan media dan kepekatan yang ingin dibuat.
2. Penimbangan bahan kimia dilakukan secara hati-hati dan dilakukan dengan menggunakan *digital analytic balance*.

3. Larutkan bahan kimia tersebut dengan menggunakan akuades sesuai kepekatan dan volume larutan stok yang diinginkan.
4. Untuk melarutkan bahan kimia dapat dilakukan pengadukan dan pemanasan dengan menggunakan hotplate and magnetic stirrer.
5. Setelah bahan kimia terlarut sempurna (tanpa ada Kristal atau endapan), tepatkan volume akhir dengan menambahkan akuades sehingga volume menjadi tetap.
6. Masukkan dalam wadah botol, tutup dengan rapat.
7. Buatlah label pada botol yang memuat keterangan tentang: nama larutan, kepekatan larutan, tanggal pembuatan, serta nama pembuat stok larutan.

Simpanlah di lemari pendingin.

4.4 Hasil dan Pembahasan

4.1 Hasil Pengamatan

No	Stok	Penyusun	Kons. Per liter	Berat persenyawaan (mg)	Kepekatan larutan stok	Kebutuhan (g)	Vol. Pipet Stok (ml/L)
1	A	NH ₄ NO ₃	1650	83500	50	2,0625	5,0
2	B	KNO ₃	1900	95000	50	23,75	5,0
3	C	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	44000	100	11,00	2,5
4	D	MgSO ₄ KH ₂ PO ₄	370 170	37000 17000	100	9,25 4,25	2,5
5	E	FeSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ EDTA	28 37,3	5570 7450	200	1,4 1,8	1,25
6	F	MnSO ₄ . H ₂ O MgSO ₄ .7 H ₂ O H ₃ BO ₃ KI Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O	22,3 8,6 6,2 0,83 0,25 0,025 0,025	11150 4300 3100 415 125 12,5 12,5	500	2,7875 1,075 0,0775 0,10375 0,03125 0,0031	0,5

		CuSO ₄ ·5H ₂ O				25	
						0,0031	
						25	

4.2 Pembahasan

Pada praktikum kali ini yaitu pembuatan larutan stok. Diawali dengan penimbangan media komponen penyusun larutan stok dengan menggunakan timbangan analitik. Setelah dilakukan penimbangan sesuai dengan kebutuhan yaitu berdasarkan kepekatan atau konsentrasi yang diinginkan, maka dilakukan proses pelarutan dengan menggunakan aquades murni yang tidak mengandung ion. Untuk larutan stok yang terdiri lebih dari satu persenyawaan maka proses pelarutan dilakukan pada tempat yang berbeda hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya reaksi kimia antara masing-masing persenyawaan misalnya reaksi penggaraman yang dapat menyebabkan degradasi atau penurunan dari larutan stok itu sendiri.

Larutan stok A mengandung NH₄NO₃ sebanyak 1650 mg. Untuk membuat larutan stok A dengan kepekatan 50x, kita memerlukan 82500 mg (1650 mg x 50). Larutan Stok A, kepekatan 50x, pada 1000 ml air. Kita dapat menggunakan menggunakan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ untuk menghitung jumlah larutan stok yang kita ambil atau dipipet.

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\
 V_1 \cdot 82500 &= 1000 \cdot 1650 \\
 V_1 &= 20 \text{ ml/L}
 \end{aligned}$$

Karena kami di dalam praktikum ini hanya membuat larutan stok A hanya 250 ml dengan kepekatan 50 saja, maka kami hanya memerlukan NH₄NO₃ sebanyak 2,0625 g ($\frac{82,5g}{4}$), maka volume larutan stok yang akan dipipet adalah $\frac{250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 20 \text{ ml} = 5 \text{ ml}$. Pembuatan larutan stok A, yaitu dengan menimbang NH₄NO₃ sebanyak 2,0625 g, kemudian memasukkannya ke dalam botol kultur dan menambahkan akuades sekitar 100 ml, kemudian sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* melarutkannya menggunakan *hot plate*. Setelah larutan stok terlarut sempurna, larutan persenyawaan tersebut dituangkan pada labu ukur dan ditepatkan volumenya dengan menggunakan aquades sampai batas 250 ml. Setelah volumenya sudah ditepatkan maka larutan stok tersebut dipindahkan ke erlenmyer 250 ml ditutup rapat kemudian diberi label A. Larutan harus terlarut sempurna agar pada waktu diletakan dilemari es tidak terjadi endapan. Biasanya larutan yang sudah mengalami pengendapan, tidak dapat

digunakan lagi. Pengendapan larutan stok umumnya terjadi bila kepekatan dapat dihindari dengan membuat larutan yang tidak terlalu pekat atau tidak menggunakan larutan campuran, yaitu dengan membuat satu larutan stok hanya untuk satu jenis bahan (terutama untuk unsur hara makro). Kondisi simpan juga diperhatikan, karena ada beberapa bahan yang tidak tahan dalam suhu tinggi atau cahaya.

Larutan stok B mengandung KNO_3 sebanyak 1900 mg. Untuk membuat larutan stok B dengan kepekatan 50x, kita memerlukan 95000 mg ($1900 \text{ mg} \times 50$). Larutan stok B, kepekatan 50x, pada 1000 ml air. Kita dapat menggunakan menggunakan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ untuk menghitung jumlah larutan stok yang kita ambil atau dipipet.

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 95000 &= 1000 \cdot 1900 \\ V_1 &= 20 \text{ ml/L} \end{aligned}$$

karena kami di dalam praktikum ini hanya membuat larutan stok B hanya 250 ml dengan kepekatan 50, maka kami hanya memerlukan KNO_3 sebanyak 23,75 g ($23,75 \frac{\text{g}}{4}$), maka volume larutan stok yang akan dipipet adalah $\frac{250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 20 \text{ ml} = 5 \text{ ml}$. Pembuatan larutan stok B, yaitu dengan menimbang KNO_3 sebanyak 23,75 g, kemudian memasukkannya ke dalam botol kultur dan menambahkan akuades sekitar 100 ml, kemudian sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* melarutkannya menggunakan *hot plate*. Setelah larutan stok terlarut sempurna, larutan persenyawaan tersebut dituangkan pada labu ukur dan ditepatkan volumenya dengan menggunakan aquades sampai batas 250 ml. Setelah volumenya sudah ditepatkan maka larutan stok tersebut dipindahkan ke erlenmyer 250 ml ditutup rapat kemudian diberi label B.

Larutan stok C mengandung $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 440 mg. Untuk membuat larutan stok C dengan kepekatan 100x, kita memerlukan 44000 mg ($440 \text{ mg} \times 100$). Larutan stok C, kepekatan 100x, pada 1000 ml air. Kita dapat menggunakan menggunakan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ untuk menghitung jumlah larutan stok yang kita ambil atau dipipet.

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 44000 &= 1000 \cdot 440 \\ V_1 &= 10 \text{ ml/L} \end{aligned}$$

karena kami di dalam praktikum ini hanya membuat larutan stok C hanya 250 ml dengan kepekatan 50, maka kami hanya memerlukan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 11 g ($\frac{44g}{4}$), maka volume larutan stok yang akan dipipet adalah $\frac{250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 10 \text{ ml} = 2,5 \text{ ml}$. Pembuatan larutan stok C, yaitu dengan menimbang $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 11 g, kemudian memasukkannya ke dalam botol kultur dan menambahkan akuades sekitar 100 ml, kemudian sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* melarutkannya menggunakan *hot plate*. Setelah larutan stok terlarut sempurna, larutan persenyawaan tersebut dituangkan pada labu ukur dan ditepatkan volumenya dengan menggunakan aquades sampai batas 250 ml. Setelah volumenya sudah ditepatkan maka larutan stok tersebut dipindahkan ke erlenmyer 250 ml ditutup rapat kemudian diberi label C.

Larutan stok D mengandung dua unsure yaitu MgSO_4 dan KH_2PO_4 sebanyak 370 dan 170 mg. Untuk membuat larutan stok D dengan kepekatan 100x, kita memerlukan MgSO_4 dan KH_2PO_4 sebanyak 37000 dan 17000 mg (masing-masing dikali dengan 50). Larutan Stok D, kepekatan 100x, pada 1000 ml air. Kita dapat menggunakan menggunakan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ untuk menghitung jumlah larutan stok yang kita ambil atau dipipet.

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 54000 &= 1000 \cdot 540 \\ V_1 &= 10 \text{ ml/L} \end{aligned}$$

karena kami di dalam praktikum ini hanya membuat larutan stok D hanya 250 ml dengan kepekatan 100, maka kami hanya memerlukan MgSO_4 dan KH_2PO_4 sebanyak 13,5 g ($\frac{54g}{4}$), maka volume larutan stok yang akan dipipet adalah $\frac{250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 10 \text{ ml} = 2,5 \text{ ml}$.

Pembuatan larutan stok D, yaitu dengan menimbang MgSO_4 dan KH_2PO_4 masing-masing sebanyak 9.25g dan 4.25g, kemudian memasukkannya ke dalam botol kultur dan menambahkan akuades sekitar 100 ml. Larutan dimasukkan ke dalam botol yang terpisah, kemudian sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* melarutkannya menggunakan *hot plate*. Setelah larutan stok terlarut sempurna, larutan persenyawaan tersebut digabung pada labu ukur secara berurut yaitu MgSO_4 kemudian KH_2PO_4 supaya tidak terjadi penggumpalan atau pengendapan, dan ditepatkan volumenya dengan menggunakan aquades sampai batas 250 ml. Setelah volumenya sudah ditepatkan maka larutan stok tersebut dipindahkan ke erlenmyer 250 ml ditutup rapat kemudian diberi label D.

Larutan stok E mengandung $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{.EDTA}$ sebanyak 28 mg dan 37,3 mg. Untuk membuat larutan stok E dengan kepekatan 200x, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{.EDTA}$ sebanyak 13060 mg ($5600 \text{ mg} + 7460 \text{ mg} \times 200$). Larutan Stok E, kepekatan 200x , pada 1000 ml air. Kita dapat menggunakan menggunakan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ untuk menghitung jumlah larutan stok yang kita ambil atau dipipet.

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 13060 &= 1000 \cdot 65,3 \\ V_1 &= 5 \text{ ml/L} \end{aligned}$$

karena kami di dalam praktikum ini hanya membuat larutan stok E hanya 250 ml dengan kepekatan 200, maka kami hanya memerlukan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{.EDTA}$ sebanyak 3,2 g ($13,060 \text{ g} / 4$), maka volume larutan stok yang akan dipipet adalah $\frac{250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 5 \text{ ml} = 1,25 \text{ ml}$.

Pembuatan larutan stok E, yaitu dengan menimbang $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{.EDTA}$ masing-masing sebanyak 1,4 dan 1,8 g, kemudian memasukkannya ke dalam botol kultur secara terpisah dan menambahkan akuades masing-masing sekitar 100 ml, kemudian sambil diaduk meggunakan *magnetic stirrer* melarutkannya menggunakan *hot plate*. Setelah larutan stok terlarut sempurna, larutan persenyawaan tersebut digabung pada labu ukur secara berurut yaitu $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kemudian $\text{Na}_2\text{.EDTA}$ supaya tidak terjadi penggumpalan atau pengendapan, dan ditepatkan volumenya dengan menggunakan aquades sampai batas 250 ml. Setelah volumenya sudah ditepatkan maka larutan stok tersebut dipindahkan ke erlenmyer 250 ml ditutup rapat kemudian diberi label E.

Larutan stok F mengandung $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ masing-masing sebanyak 22,3; 8,6; 6,2; 0,83; 0,25; 0,025; 0,025 mg. Untuk membuat larutan stok F dengan kepekatan 500x, memerlukan media sebanyak 19115 mg (masing-masing kebutuhan media dikali dengan 500, setelah itu ditambahkan). Larutan Stok F, kepekatan 500x , pada 1000 ml air. Kita dapat menggunakan menggunakan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ untuk menghitung jumlah larutan stok yang kita ambil atau dipipet.

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 19115 &= 1000 \cdot 38,23 \\ V_1 &= 2 \text{ ml/L} \end{aligned}$$

karena kami di dalam praktikum ini hanya membuat larutan stok E hanya 250 ml dengan kepekatan 500, maka kami hanya memerlukan stok media F sebanyak $4,77875 \text{ g } \left(19,115 \frac{\text{g}}{4}\right)$,

maka volume larutan stok yang akan dipipet adalah $\frac{250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml} = 0,5 \text{ ml}$.

Pembuatan larutan stok E, yaitu masing-masing media dimasukkan ke dalam botol kultur secara terpisah dan menambahkan akuades masing-masing 30 ml, kemudian sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* melarutkannya menggunakan *hot plate*. Setelah larutan stok terlarut sempurna, larutan persenyawaan tersebut digabung pada labu ukur secara berurut yaitu $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ supaya tidak terjadi penggumpalan atau pengendapan, dan ditepatkan volumenya dengan menggunakan aquades sampai batas 250 ml. Setelah volumenya sudah ditepatkan maka larutan stok tersebut dipindahkan ke erlenmyer 250 ml ditutup rapat kemudian diberi lebel F.

4.5 Penutup

Kesimpulan

- Dengan adanya larutan stok dapat memberi keuntungan antara lain yaitu menghemat waktu pekerjaan, menimbang bahan media setiap kali ingin membuat media, mengatasi kesulitan menimbang dalam konsentrasi kecil.
- Dari hasil praktikum dapat disimpulkan bahwa dalam proses pembuatan larutan stok yang terdiri dari stok A-F melalui beberapa tahapan antara lain: penimbangan persenyawaan, pelarutan senyawa kimia dengan menggunakan aquades, penetapan volume akhir, pelabelan dan penyimpanan pada lemari es.
- Untuk pengenceran dapat menggunakan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$ untuk menghitung jumlah larutan stok yang kita ambil atau dipipet.

Acara V (*Pembuatan Media Kultur*)

5.1 Tinjauan Pustaka

Media tanam harus berisi semua zat yang diperlukan untuk menjamin kebutuhan eksplan. Bahan-bahan yang diramu berisi campuran garam mineral sumber unsur makro dan unsur mikro, gula, protein, vitamin, dan hormon tumbuhan. Berhasilnya kultur jaringan banyak ditentukan selain kondisi aseptik juga oleh media tanam. Campuran media yang satu, dapat cocok untuk jenis tanaman tertentu, tetapi dapat kurang cocok untuk jenis tanaman yang lain.

Dalam kultur jaringan, unsur-unsur diberikan tidak dalam bentuk unsure murni, tetapi berupa senyawa berbentuk garam. Sebelum dicampurkan kedalam media tumbuh, garam-garam mineral itu haruslah lebih dahulu dilarutkan dalam konsentrasi tertentu, sehingga dalam media tumbuh nantinya jumlah tiap gram benar sesuai dengan ketentuan sebagai pelarut dipakai akuades (Rahardja, 1995)

Untuk memenuhi factor pertumbuhan tanaman, media kultur jaringan yang baik mengandunga (Anonymous, 2009):

1. Hara anorganik. Ada 12 hara mineral yang penting untuk pertumbuhan tanaman dan beberapa hara yang dilaporkan mempengaruhi pertumbuhan in vitro. Untuk pertumbuhan normal dalam kultur jaringan, unsur – unsur penting ini harus dimasukkan dalam media kultur. Perbandingan 5 media pada Tabel 12.1 memperlihatkan bahwa unsur esensial ini dimasukkan pada masing – masing media tapi konsentrasinya berbeda karena diberikan dalam bentuk yang berbeda.
2. Hara organik. Tanaman yang tumbuh dalam kondisi normal bersifat autotrof dan dapat mensintesa semua kebutuhan bahan organiknya. Meskipun tanaman in vitro dapat mensintesa senyawa ini, diperkirakan mereka tidak menghasilkan vitamin dalam jumlah yang cukup untuk pertumbuhan yang sehat dan satu atau lebih vitamin mesti ditambahkan ke media. Thiamin merupakan vitamin yang penting, selain itu asam nikotin, piridoksin dan inositol biasanya ditambahkan. Selain bahan organik tersebut, bahan kompleks seringkali ditambahkan, termasuk ekstrak ragi, casein hydrolysate, air kelapa, jus jeruk, jaringan pisang, dan lain – lain. Penambahan bahan kompleks ini menghasilkan media yang tak terdefinisi.

Dengan penelitian yang cukup, semestinya bahan kompleks ini dapat diganti dengan zat tertentu, mungkin tambahan suatu vitamin atau asam amino.

3. Sumber karbon. Tanaman dalam kultur jaringan tumbuh secara heterotrof dan karena mereka tidak cukup mensintesa kebutuhan karbonnya, maka sukrosa harus ditambahkan ke dalam media. Sumber karbon ini menyediakan energy bagi pertumbuhan tanaman dan juga sebagai bahan pembangun untuk memproduksi molekul yang lebih besar yang diperlukan untuk tumbuh. Biasanya sukrosa pada konsentrasi 1 – 5% digunakan sebagai sumber karbon tapi sumber karbon lain seperti glukosa, maltosa, galaktosa dan laktosa juga digunakan. Ketika sukrosa diautoklaf, terjadi hidrolisis untuk menghasilkan glukosa dan fruktosa yang dapat digunakan lebih efisien oleh tanaman dalam kultur.
4. Agar. Umumnya jaringan dikulturkan pada media padat yang dibuat seperti gel dengan menggunakan agar atau pengganti agar seperti Gelrite atau Phytigel. Konsentrasi agar yang digunakan berkisar antara 0.7 – 1.0%. Pada konsentrasi tinggi agar menjadi sangat keras, sedikit sekali air yang tersedia, sehingga difusi hara ke tanaman sangat buruk. Agar dengan kualitas tinggi seperti Difco BiTek mahal harganya tapi lebih murni, tidak mengandung bahan lain yang mungkin mengganggu pertumbuhan. Pengganti lain seperti gelatin kadang – kadang digunakan pada lab komersial. Gel sintetis diketahui dapat menyebabkan hyperhidration (vitrifikasi) yang merupakan problem fisiologis yang terjadi pada kultur. Untuk mengatasi masalah ini, produk baru bernama Agargel telah diproduksi oleh Sigma. Produk ini merupakan campuran agar dan gel sintetis dan menawarkan kelebihan kedua produk sekaligus mengurangi problem vitrifikasi. Produk ini dapat dibuat di lab dengan mencampurkan 1 g Gelrite (Phytigel) dengan 4 g agar sebagai agen pengental untuk 1 L media.
5. pH. media biasanya diatur pada kisaran 5.6 – 5.8 tapi tanaman yang berbeda mungkin memerlukan pH yang berbeda untuk pertumbuhan optimum. Jika pH lebih tinggi dari 6.0, media mungkin menjadi terlalu keras dan jika pH kurang dari 5.2, agar tidak dapat memadat.
6. Zat Pengatur Tumbuh. Pada media umumnya ditambahkan zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh akan dibahas tersendiri pada minggu 13.

7. Air. distilata biasanya digunakan dalam kultur jaringan, dan banyak lab menggunakan aquabides (air destilata ganda). Beberapa lab, dengan alasan ekonomi, menggunakan air hujan, tapi ini menyebabkan sulit mengontrol kandungan bahan organik dan non-organik pada media.
8. Pemilihan Media. Jika tidak ada informasi awal, biasanya mulai dengan media MS (Murashige dan Skoog 1962). Media ini mengandung konsentrasi garam dan nitrat yang lebih tinggi dibandingkan media lain, dan telah sukses digunakan pada berbagai tanaman dikotil. Untuk inisiasi kalus, 2,4-D ditambahkan ke media dengan konsentrasi 1 – 5 mgL⁻¹. Untuk multiplikasi tunas, sitokinin seperti BAP ditambahkan dan juga diberi auksin, seperti NAA pada konsentrasi yang rendah. Untuk inisiasi akar, IBA pada konsentrasi 1 – 2 mgL⁻¹ ditambahkan. Faktor yang paling sulit ditentukan dalam kultur jaringan adalah zat pengatur tumbuh dan biasanya perlu melakukan penelitian kecil untuk menentukan konsentrasi terbaik yang akan digunakan. Ada 2 pendekatan: Pendekatan pertama adalah dengan menggunakan media dasar MS dan meneliti kisaran dua zat pengatur tumbuh yang berbeda pada media tersebut.

5.2 Tujuan Praktikum

1. Mengetahui dan mempraktikkan cara membuat medium MS (Murashige & Skoog)
2. Melakukan sterilisasi medium

5.3 Metode Praktikum

A. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada acara pembuatan media ini adalah magnetic stirrer, timbangan analitik, tabung Erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, pipet makro, pipet mikro dan pipet tetes, pengaduk, pemanas kompor, pH meter, botol kultur, autoklaf, aluminium foil, plastic seal. Sedangkan bahan yang digunakan antara lain media MS dengan kandungan unsure makro, unsure mikro, besi, vitamin, ZPT berupa Kinetin dan IAA, bahan pematik berupa agar “Swallow”, Sukrosa, KOH atau NaOH 1M, dan HCL 1M.

Pembuatan Media Kultur

- a. Aquades Sebanyak 500 ml dipersiapkan didalam Erlenmeyer ukuran 1000 ml.
larutan stok A, B, C, D, E, dan F dimasukan kedalam Erlenmeyer sesuai dengan yang dibutuhkan. Untuk pembuatan 1L medium, maka stok A diambil sebanyak 100 ml, stok B diambil 5 ml, stok C diambil 5 ml, stok D diambil 50 ml, stok E untuk auksin dan sitokinin masing-masing 1 ml. semua bahan tersebut dicampur hingga merata.
- b. 30 gr sukrosa ditambahkan ke dalam gelas ukur dan biarkan sampai homogen.
- c. Aquades ditambahkan ke dalam gelas ukur sampai volumenya mencapai 1000 ml.
- d. pH media diukur dengan pH meter yaitu dengan memasukkan sensor ke dalam larutan media. Jika kurang dari 5,6-5,8 ditambahkan larutan NaOH dan jika lebih ditambahkan larutan HCL.
- e. Masing-masing Larutan media dimasak dengan kompor dan ditambahkan 350 gr agar-agar.
- f. Media dimasukkan ke dalam botol kultur Kira-kira tingginya 2-3 cm, kemudian botol kultur ditutup lagi.

Sterilisasi Media

- a. botol yang sudah berisi medium, dimasukan kedalam autoklaf untuk disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 15-17,5 psi selama 20 menit.
- b. Setelah selesai sterilisasi, botol disimpan diruangan yang sejuk.

5.4 Hasil Pengamatan Dan Pembahasan

Hasil Pengamatan

Media Murashige & Skoog padat.

Pembahasan

Pembuatan media harus berdasarkan perhitungan konsentrasi yang tepat. Karena akan mempengaruhi keberhasilan tumbuh eksplan. Media yang digunakan merupakan media Ms (Murashige dan Skoog). Pada proses pembuatannya, unsure makro diencerkan sebanyak 5 kali, unsure mikro 100 kali, stok Fe 200 kali, vitamin 10 kali, ZPT 100 kali. Ditambahkan pula sukrosa yang bertujuan untuk memberikan bahan baku metabolisme eksplan karena eksplan belum mampu menghasilkan asimilat seperti tumbuhan pada umumnya. Selanjutnya ditambahkan pematik berupa agar “swallow” untuk memadatkan media.

Larutan stok Fe dibuat dengan dilarutkan menggunakan alcohol absolute atau alcohol 90-96 %. Karena bahan yang digunakan untuk membuat larutan stok Fe sukar larut. Atau untuk memudahkan dapat pula dibakar atau dipanaskan.

Pembuatan larutan stok pada dasarnya ditujukan untuk menyediakan bahan-bahan yang diperlukan pada pembuatan media dengan konsentrasi yang tepat. Karena media-media yang digunakan pada kultur jaringan diperlukan unsure-unsur dengan konsentrasi yang sangat kecil. Karena tidak dimungkinkan menimbang unsure dengan konsentrasi yang sangat kecil, maka dibuat lah larutan stok dengan menggunakan konsep kalibrasi, sehingga pada pembuatan media, unsure-unsur tersebut dapat digunakan sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan (Sriyanti, 2002).

Selain media MS yang digunakan, terdapat pula beberapa jenis media lain, diantaranya (Raharja, 1995):

- | | |
|--|-----------------------|
| 1. Heler | 7. VAcin dan Went |
| 2. White | 8. Miller |
| 3. Nitsch & Nitsch | 9. Linsmaier & Skoog |
| 4. Hildebrandt, Riker dan Duggar | 10. Gamborg |
| 5. Gautheret | 11. Murashige & Skoog |
| 6. Knudson | |
| 12. White, diperkaya dengan fosfat dan diperkuat dengan senyawa organik sumber N serta asam amino. | |

Media nomor 1 sampai dengan nomor 5 adalah media dasar yang hanya berisi unsure makro dan unsure mikro. Untuk keperluan kultur jaringan, media tersebut masih perlu ditambahkan bahan pelengkap berupa asam amino, vitamin, gula dan hormone tumbuhan. pH

disesuaikan sehingga nilainya berkisar sekitar 5,6. Bahan-bahan lain yang dapat ditambahkan sebagai pelengkap misalnya ekstrak tauge, ekstrak ujung kacang jagung dan air kelapa muda (Raharja, 1995).

Seperti halnya peralatan kultur, media yang digunakan juga perlu dilakukan sterilisasi untuk menciptakan kondisi lingkungan yang aseptik bagi eksplan. Menurut Anonim (2009) ada beberapa cara sterilisasi media diantaranya adalah:

A. Sterilisasi Media Menggunakan Autoklaf Portable, dapat dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

(Pemanasan menggunakan api)

1. Isi panci luar dengan air, kalau dapat dengan aquadest untuk menghindari pengendapan Ca yang biasa terdapat pada air ledeng, sebanyak 1 liter untuk autoklaf kecil, dan 1.5 liter untuk autoklaf besar
2. Botol-botol media yang akan disterilkan, dimasukkan ke dalam panel-dalam. Susun botol-botol tersebut hingga mencapai permukaan panel.
3. Atur posisi panci dengan memperhatikan alur tempat saluran uap yang terdapat pada tutup dan lingkaran permukaan panci-luar
4. Tutup dengan erat. (kencangkan pengunci tanpa menggunakan alat)
5. Biarkan katup pengeluaran uap dalam keadaan terbuka.
6. Letakkan autoklaf di atas kompor gas atau pembakar Bunsen.
7. Panaskan sampai air dalam autoklaf mendidih dan uap mulai keluar dari katup pengeluaran uap.
8. Biarkan uap keluar selama 5 menit (minimum), untuk mengeluarkan udara mengeluarkan udara yang terperangkap dalam autoclave.
9. Tutup katup pengeluaran uap.
10. Amati kenaikan temperature dan tekanan.

11. Setelah tekanan mencapai 15 psi, api kompor dikecilkan.
12. Jaga keadaan tekanan 15 psi ini dengan mengatur besar kecilnya api kompor secara manual. Selama sterilisasi, jangan meninggalkan autoklaf dan mengerjakan hal lain diruang lain, karena tekanan dapat meningkat sampai melewati batas. Keadaan ini berbahaya dan dapat menyebabkan kerusakan alat.
13. Setelah waktu sterilisasi tercapai, matikan api kompor.
14. Uap dikeluarkan sedikit-sedikit dengan mengatur katup pengeluaran uap (buka sedikit-sedikit). Jangan sekali-kali membuka katup dan membiarkan uap keluar sekaligus. Keadaan ini menyebabkan media atau air bubble up.
15. Setelah tekanan turun sampai 0, buka pengunci dan keluarkan panci yang berisi media.

B. Sterilisasi Aquadest dan Media Menggunakan Autoklaf Listrik (Digital Atau Non Digital)

Dalam sterilisasi aquadest, lebih efektif bila digunakan wadah yang mempunyai volume antara 300 – 500 ml. Isi wadah tersebut sampai 80% volume, dan tutup dengan kertas, serta kencangkan dengan karet gelang.

Media disterilkan dalam autoklaf. Untuk aquadest sebaiknya dimasukkan dalam wadah kecil misalnya erlemeyer 250 ml dengan isi maksimum 100 ml, agar sterilisasi lebih efektif. Waktu sterilisasi sama dengan waktu untuk sterilisasi alat-alat waktu 30 menit pada tekanan 15 psi. atau 1 atm.

Untuk media kultur yang tidak mengandung bahan-bahan yang Heat-labile, sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada temperature 121°C, tekanan antara 15 psi atau 1 atm dengan waktu antara 20-25 menit tergantung dari volume wadah dan volume media. Untuk 15-50 ml media dalam tabung reaksi atau botol kecil berukuran 50-100 ml, sterilisasi dilakukan pada tekanan 15 psi dengan waktu 20 menit. Untuk 20 botol volume 1 liter membutuhkan waktu yang lebih lama yaitu 34 menit, 10 botol volume 2 liter memerlukan waktu 37 menit, 5 botol 4 liter waktu yang digunakan 52 menit. Dengan waktu yang lebih lama.

Dalam sterilisasi aquadest dan media, setelah waktu sterilisasi yang diinginkan sudah tercapai, autoklaf tidak boleh diturunkan tekanannya secara mendadak. Bila tekanan diturunkan mendadak, cairan didalamnya mendidih dan meluap (bubbled up). Untuk bahan-bahan yang heat-labile dalam bentuk larutan, sterilisasi dilakukan dengan menyaring larutan melalui filter yang mempunyai ukuran pori 0.20-0.22 μm . Diameter filter yang bermacam-macam tergantung dari volume larutan yang ingin disterilkan. Untuk volume larutan 10 ml, dipergunakan filter yang dipasang di ujung jarum suntik. Bahan yang heat labile antara lain : GA3, Thiamin-HCL, Ca-panthothenate, Antibiotik: carbenocilin (Anonymous, 2009).

5.5 Penutup

Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Pembuatan medium MS dilakukan dengan mencampurkan stok yang telah dibuat. Untuk pembuatan 1L medium, maka stok unsure makro diambil sebanyak 100 ml, stok unsure mikro diambil 5 ml, stok Fe diambil 5 ml, stok vitamin diambil 50 ml, stok ZPT untuk auksin dan sitokinin masing-masing 1 ml.
2. Sterilisasi medium dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 15-17,5 psi selama 20 menit.

Acara IX (*Sub Kultur Pada Tanaman Krisan*)

9.1 Tinjauan Pustaka

Subkultur merupakan salah satu tahap dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. Pada dasarnya subkultur kita memotong, membelah dan menanam kembali eksplan yang telah tumbuh sehingga jumlah tanaman akan bertambah banyak. Pada dasarnya subkultur merupakan tahap kegiatan yang relatif mudah dibandingkan dengan kegiatan lain dalam kultur jaringan.

Subkultur dilakukan karena beberapa alasan berikut:

1. Tanaman sudah memenuhi atau sudah setinggi botol
2. Tanaman sudah berada lama didalam botol sehingga pertumbuhannya berkurang
3. Tanaman mulai kekurangan hara
4. Media dalam botol sudah mengering

Kegiatan subkultur dilakukan sesuai dengan jenis tanaman yang dikulturkan. Setiap tanaman memiliki karakteristik dan kecepatan tumbuh yang berbeda-beda. Sehingga cara dan waktu subkultur juga berbeda-beda. Tanaman yang harus segera atau relatif cepat disubkultur adalah jenis pisang-pisangan, alokasia, dan caladium. Tanaman yang relatif lama adalah aglaonema. (Pelatihan, 2009)

Untuk tanaman yang diperbanyak dengan multifikasi tunas, maka subkultur dapat dilakukan dengan memisahkan anakan tanaman dari koloninya atau melakukan penjarangan. Contoh tanamannya adalah anggrek, pisang, dan tanaman lain yang satu tipe pertumbuhan. Untuk tanaman yang tipe pertumbuhannya dengan pemanjangan batang maka subkultur bisa dilakukan dengan memotong tanaman per ruas tanaman yang ada. Namun jika ada planlet yang masih terlalu kecil dan beresiko tinggi untuk dipotong, maka subkulturnya cukup dilakukan dengan dipisahkan dari induknya dan ditanam kembali secara terpisah. Contoh tanamannya adalah jati, krisan, dan tanaman lain yang memiliki karakteristik pertumbuhan yang sama. kita dapat menghitung kecepatan produksi tanaman dengan mengetahui kecepatan tanaman melakukan multifikasi hingga siap disubkultur.

Krisan merupakan tanaman bunga hias berupa perdu dengan sebutan lain seruni atau bunga emas (*golden flower*) berasal dari dataran Cina. Krisan kuning dari dataran cina

dikenal dengan *Chrysanthemum indicum* (kuning). *C.morifolium* (ungu dan pink) dan *C.daisy* (bulat, ponpon). (www.docstoc.com)

Tanaman krisan dapat diperbanyak dengan cara vegetative, yaitu dengan anakan, setek pucuk dan kultur jaringan.

1. Bibit asal anakan, diperoleh dari tanaman kecil krisan yang dibudidayakan.

1. Bibit stek pucuk didapat dengan menentukan tanaman yang sehat dan cukup umur, pilih tunas pucuk yang tumbuh sehat, diameter pangkal 3-5mm, panjang 5cm, mempunyai tiga helai daun dewasa berwarna hijau terang, potong pucuk tersebut, langsung semai atau disimpan dalam ruangan dingin bersuhu udara 4°C, dengan kelembaban 30% agar tetap tahan segar selama 3-4minggu. Cara penyimpanan stek adalah dibungkus dengan beberapa lapis kertas tisu, kemudian dimasukkan kedalam kantong plastik rata-rata 50 stek.
2. Bibit dengan kultur jaringan didapat dengan cara : menentukan mata tunas atau eksplan dan ambil dengan pisau silet, sterilisasi mata tunas dengan sublimat 0,04% (HgCl) selama 10menit, kemudian bilas dengan air suling steril. Melakukan perbanyakan tanaman dalam media padat MS. Hasil penelitian lanjutan perbanyakan tanaman krisan secara kultur jaringan :

1. Medium MS padat ditambah 150 ml air kelapa/liter ditambah 0,5 mg NAA/liter ditambah 1,5 mg kinetin/liter, paling baik untuk pertumbuhan tunas dan akar eksplan. Pertunasan terjadi pada umur 29 hari, sedangkan perakaran 26 hari.
2. Medium MS padat ditambah 150 ml air kelapa/liter ditambah 0,5 mg NAA/liter ditambah 0,5 BAP/liter, kalus bertunas waktu 26 hari, tetapi medium tidak merangsang pemunculan akar.
3. Medium MS padat ditambah 0,5 mg NAA/liter ditambah 0,5-0.2 mg kinetin/liter ditambah 0,5 mg NAA/liter ditambah 0,5-2,0 BAP/liter pada eksplan varietas Sandra untuk membentuk akar pada umur 21-31 hari. Penyiapan bibit pada skala komersial dilakukan dengan dua tahap yaitu:

1) Stok tanaman induk : Fungsinya untuk memproduksi bagian vegetatif sebanyak mungkin sebagai bahan tanaman Ditanam di areal khusus terpisah dari areal budidaya. Jumlah stok tanaman induk disesuaikan dengan kebutuhan bibit yang telah direncanakan. Tiap tanaman

induk menghasilkan 10 stek per bulan, dan selama 4-6 bulan dipelihara memproduksi sekitar 40-60 stek pucuk. Pemeliharaan kondisi lingkungan sehari panjang dengan penambahan cahaya 4 jam/hari mulai 23.30 – 03.00 lampu pencahayaan dapat dipilih Growlux SL 18 Philip.

2) Perbanyak vegetatif tanaman induk :

- Ø Pemangkasan pucuk, dilakukan pada umur 2 minggu setelah bibit ditanam, dengan cara memangkas atau membuang pucuk yang sedang tumbuh sepanjang 0,5-1 cm.
- Ø Penumbuhan cabang primer. Perlakuan pinching dapat merangsang pertumbuhan tunas ketiak sebanyak 2-4 tunas. Tunas ketiak daun dibiarkan tumbuh sepanjang 15-20 cm atau disebut cabang primer.
- Ø Penumbuhan cabang sekunder. Pada tiap ujung primer dilakukan pemangkasan pucuk sepanjang 0,5-1 cm, pelihara tiap cabang sekunder hingga tumbuh sepanjang 10-15 cm. (www.docstoc.com)

9.2 Tujuan Praktikum

Untuk melatih mahasiswa agar dapat melakukan penanaman pada kultur jaringan, khususnya subkultur

9.3 Metode Pelaksanaan Praktikum

9.3.1 Alat dan bahan

Alat:

- Dissecting set
- Lampu bunsen
- Kertas steril
- Tisu
- Petridish
- Botol semprot

Bahan :

- Media MS₀
- Planlet bunga krisan yang siap disubkultur
- Alkohol 96%
- Alkohol 70%
- Media MS₀+ BAP 1 ppm

9.3.2 Prosedur Kerja

1. Menyiapkan semua alat dan bahan yang diperlukan
2. Melakukan subkultur terhadap tanaman krisan dengan cara :
 - ✓ Menyemprot tangan menggunakan alkohol 70% sebelum bekerja.
 - ✓ Mengambil kertas steril dan diletakkan pada papan kaca sebagai alas pada saat melakukan pemotongan eksplan.
 - ✓ Mensterilkan semua alat diseksi yang akan digunakan dengan cara mencelupkannya kedalam alkohol lalu membakarnya dengan lampu Bunsen.
 - ✓ Mengambil planlet tanaman krisan dari botol kultur awal sesuai kebutuhan dengan cara memotong batangnya secara hati-hati.
 - ✓ Memotong bagian nodus krisan sepanjang $\pm 1,5\text{cm}$ atau satu ruas jika jarak antar ruas cukup panjang dan dua ruas jika jarak antar ruas pendek
 - ✓ Menyimpan hasil potongan planlet kedalam petridish agar tidak layu sementara kita menyiapkan media tanam baru yaitu media MS_0
 - ✓ Menanam hasil stek krisan pada media tanam baru dengan jarak yang proporsional dan rapi agar tanaman tidak berebutan unsur hara.
 - ✓ Memberikan label pada botol kultur yang baru ditanamami yang berisi keterangan mengenai nama tanaman, tanggal penanaman, dan nama penanam.
 - ✓ Menyimpan hasil subkultur pada ruang pertumbuhan.

9.4 Hasil Dan Pembahasan

9.4.1 Hasil

Hasil yang didapatkan dari praktikum subkultur ini adalah:

Didapatkan kultur krisan sebanyak 1 botol tanaman

9.4.2 Pembahasan

Dari hasil yang kita dapat di atas, kita dapat mengetahui kondisi hasil subkultur setelah satu minggu di simpan di ruang pertumbuhan. Untuk tanaman krisan, kondisi awal

ketika sebelum disubkultur tanaman krisan berada dalam botol kultur bersama tanaman krisan lainnya yang sudah mengalami pertambahan panjang. Tanaman tersebut memiliki panjang hampir bahkan sudah mencapai tutup dari botol kultur tersebut. Untuk kenampakan dari dari krisan tersebut juga tidak menarik yaitu berwarna hijau pucat, kurus dan agak layu. Hal ini sangat wajar terjadi karena tanaman tersebut mulai berebut unsur hara dengan tanaman krisan lainnya yang tumbuh pada media dan botol yang sama.

Setelah dilakukan subkultur, terjadi perubahan kenampakan pada tanaman krisan tersebut. Yaitu warna tanaman hijau segar dan tanaman tumbuh tegar dan segar. Hal ini dikarenakan tanaman tersebut telah mendapatkan penyegaran ketika subkultur. Penyegaran tersebut dapat berasal dari media baru maupun udara baru yang masuk ketika melakukan subkultur. Ada hal yang harus diperhatikan ketika melakukan subkultur tanaman krisan. Yaitu ketika tanaman krisan dikeluarkan untuk dipotong dan ditanam kembali pada media baru, tanaman tersebut jangan dibiarkan berada di LAC terlalu lama secara terbuka. Karena tanaman ini sangat sensitif terhadap panas dan cahaya. Apabila tanaman tersebut dibiarkan di LAC terlalu lama secara terbuka dapat menyebabkan tanaman tersebut layu. Untuk itu dalam melakukan subkultur harus dilakukan secara tepat dan cepat. Selain menghindari hal tadi kecepatan dan ketepatan dalam melakukan subkultur juga dapat mengurangi tingkat kontaminasi yang bisa terjadi.

9.5 Penutup

Simpulan

Dari hasil dan pembahasan di atas dapat disimpulkan beberapa hal dalam melakukan subkultur, diantaranya:

- Subkultur harus dilakukan karena memperhatikan beberapa faktor untuk kelangsungan hidup eksplan tersebut.
- Lakukan subkultur sebaik mungkin untuk menghindari melukai eksplan ketika dipindahkan ke dalam media baru.
- Tanaman tersebut tidak mengalami kontaminasi baik pada media maupun tanamannya.
- Kecepatan dan ketepatan ketika melakukan subkultur berpengaruh terhadap hasil yang didapatkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2009. *Sterilisasi Media dan Alat*. <http://e-learning.unram.ac.id/KulJar/BAB%20IV%20STERILISASI/IV2%20Sterilisasi%20Alat.htm>. Diakses tanggal Diakses 20 April 2012
- Anonimous. 2009. *Media Kultur Jaringan*. <http://www.fp.unud.ac.id/biotek/kultur-jaringan-tanaman/12-media-kultur-jaringan.html>. diakses tanggal Diakses 20 April 2012.
- Budiarta, Atat. (2004). *Dasar – Dasar Kultur Jaringan*. Cianjur: Pusat Pengembangan dan Penataran Guru Pertanian
- _____. 2010. [online] dokumen “*Budidaya Tanaman Krisan*” tersedia di <http://www.docstoc.com/docs/19913335/Budidaya-Tanaman-Krisan>, diunduh pada Selasa, Diakses 18 April 2012, pukul 19.00WIB
- _____. 2009. *Pembentukan Kultur Aseptik*. <http://www.fp.unud.ac.id/biotek/kultur-jaringan-tanaman/5-pembentukan-kultur-aseptik.html>. diakses tanggal Diakses 22 April 2012
- _____. 2009. *Fasilitas Dan Teknik Untuk Kultur Jaringan Tanaman*. <http://www.fp.unud.ac.id/biotek/kultur-jaringan-tanaman/10-fasilitas-dan-teknik-untuk-kultur-jaringan-tanaman.html>. diakses tanggal Diakses 20 April 2012.
- _____. 2012. *Pengenalan alat dan sterilisasi kultur* <http://tugastpb.blogspot.com/minggu> Diakses 22 April 2012
- _____. 2012. *Pengenalan alat dan sterilisasi kultur* <http://tugastpb.blogspot.com/minggu> Diakses 22 April 2012
- Gunawan, L.W. 1988. *Teknik Kultur Jaringan*. Bogor: Laboratorium Kultur Jaringan, PAU Bioteknologi, IPB.
- Rahardja, P. C. 1995. *Kultur Jaringan : Teknik Perbanyakan Tanaman Secara Modern*. Penerbit Swadaya, Jakarta.
- Sriyanti, Daisy P. dan Ari Wijayani. 2002. *Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif-Modern*. Kanisius, Yogyakarta.
- Tim Dosen TPB. 2012. *BKPM Dasar-Dasar Kultur Jaringan*. Jember: Politeknik Negeri Jember.
- Yusnita. 2010. *Perbanyakan Invitro Tanaman Angrek*. Penerbit : Universitas Lampung. Bandar Lampung. Lampung