

MODUL PRAKTIKUM

KULTUR JARINGAN



Disusun Oleh

Febriana Dwi Wahyuni, M.Si.

Universitas
Esa Unggul

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
JAKARTA
2019**

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmatNya sehingga penyusunan pedoman praktikum Kultur Jaringan ini dapat terselesaikan dengan baik. Pedoman praktikum ini disusun bagi mahasiswa program studi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul yang mengikuti mata kuliah Kultur Jaringan agar dapat melaksanakan praktikum dengan sebaik-baiknya.

Pedoman praktikum ini dapat disusun dengan bantuan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih kami sampaikan ke berbagai pihak yang telah memberikan kontribusi, baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan Pedoman Praktikum ini

Penulis berharap semoga Pedoman praktikum ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan dapat membantu khususnya bagi para mahasiswa yang menempuh mata kuliah Kultur Jaringan ini. Penulis menyadari bahwa Pedoman Praktikum ini masih jauh dari sempurna sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca yang sifatnya membangun demi terus meningkatkan kualitas dan kesempurnaan Pedoman Praktikum ini.

Jakarta, September 2020

Penulis



Universitas
Esa Unggul

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Praktikan datang di laboratorium 10 menit sebelum kegiatan praktikum dimulai (tidak boleh terlambat)
2. Praktikan menggunakan jas laboratorium dan alas kaki selama berada di dalam laboratorium
3. Praktikan meletakkan tas di tempat yang telah disediakan
4. Praktikan wajib mengikuti semua tata tertib laboratorium
5. Praktikan mengikuti instruksi yang diberikan oleh asisten dan tidak membuat kegaduhan selama berada di laboratorium
6. Praktikan sudah membaca pedoman praktikum sebelum kegiatan praktikum berlangsung demi terciptanya kelancaran dalam kegiatan praktikum
7. Praktikan harus membersihkan meja setelah kegiatan praktikum selesai
8. Praktikan wajib membuat laporan praktikum
9. Praktikan wajib mengikuti seluruh kegiatan praktikum (kehadiran 100%)



Universitas
Esa Unggul

DAFTAR ISI

Kata Pengantar	i
Tata Tertib Praktikum	ii
Daftar Isi	iii
1. Pengenalan Laboratorium Kultur Jaringan	1
2. Pembuatan Media Kultur Jaringan	3
3. Persiapan Eksplan	5
4. Subkultur	7
5. Aklimatisasi	9
6. Kultur Anther	12



TOPIK I

PENGENALAN LABORATORIUM KULTUR JARINGAN

Pendahuluan

Kultur jaringan tanaman merupakan budidaya sel, jaringan, dan organ secara aseptik. Teknik kultur jaringan (*in vitro*) mensyaratkan kondisi yang steril baik ruang, peralatan, bahan maupun seluruh rangkaian kerjanya. Hal tersebut disebabkan pertumbuhan eksplan di dalam kultur harus selalu dalam kondisi aseptik. Agar proses kultur jaringan berhasil, tahapan pelaksanaan teknik kultur *in vitro* harus dilaksanakan di dalam laboratorium dan harus ditunjang oleh fasilitas serta perlengkapan laboratorium yang memadai.

Laboratorium yang baik untuk pekerjaan teknik kultur jaringan harus memenuhi kriteria aman, bersih, memiliki organisasi dan penataan ruang yang sesuai. Tata ruang laboratorium yang ideal hendaknya terdiri atas ruangan-ruangan yang terpisah untuk masing-masing kegiatan, seperti persiapan media, prosedur aseptik, inkubasi kultur, dan pekerjaan laboratorium yang sifatnya umum.

Keberhasilan kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh peralatan yang digunakan. Beberapa alat yang harus ada dalam kultur jaringan yaitu *laminar air flow*, oven, autoklaf, hotplate, timbangan, rak, botol kultur, erlenmeyer, magnetik striter, pH meter, blade, skalpel, pinset, lampu bunsen, cawan petri, gelas ukur, gelas beacker, pipet tetes, spatula, destilator, shaker, dan lemari es. Masing masing alat memiliki fungsi yang berbeda. Selain peralatan dibutuhkan juga berbagai jenis bahan seperti bermacam media Murashige-Skoog (MS), media Vacint Went, HCl. NaOH, agar, sukrosa, zat pengatur tumbuh (kinetin, BAP, NAA, 2,4-D, IAA).

Kompetensi yang Diharapkan

Setelah mempelajari tentang topik ini, diharapkan mahasiswa mampu menjelaskan dan mengoperasikan alat-alat yang ada di laboratorium kultur jaringan.

Alat dan Bahan

Semua alat-alat yang ada di laboratorium kultur jaringan

Cara Kerja

- Mahasiswa menyiapkan alat tulis
- Mahasiswa mendengarkan penjelasan dari laboran
- Mahasiswa mencatat alat-alat yang ada di laboratorium kultur jaringan dan menuliskannya di hasil pengamatan

Hasil Pengamatan

No	Nama Alat	Gambar	Kegunaan
1			
2			
3			
4			

Universitas
Esa Unggul

TOPIK II

PEMBUATAN MEDIA KULTUR JARINGAN

Pendahuluan

Media merupakan faktor utama dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Keberhasilan perbanyakan dan perkembangbiakan tanaman dengan metode kultur jaringan sangat tergantung pada jenis media. Untuk membuat media, diperlukan penimbangan dan penakaran bahan secara tepat. Komponen utama penyusun media kultur jaringan adalah unsur hara makro dan mikro ditambah dengan gula sebagai pengganti unsur karbon yang didapat dari hasil proses fotosintesis. Selain itu, di dalam media juga diperlukan vitamin, asam amino, dan bahan-bahan organik. Pada tahapan subkultur dan multiplikasi, ada penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) atau hormone pada media untuk mempercepat terjadinya organogenesis. Kebutuhan zat hara untuk pertumbuhan optimal suatu eksplan secara *in vitro* berbeda-beda untuk setiap spesies. Metode kultur jaringan bukan hanya digunakan untuk tujuan perbanyakan tanaman, namun dapat pula digunakan untuk pelestarian plasma nutfah.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu membuat media untuk kultur jaringan tanaman dengan benar

Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Setelah melakukan kegiatan praktikum ini, diharapkan mahasiswa mampu membuat komposisi media untuk kultur jaringan dengan baik

Alat dan bahan

Alat

- Botol kultur
- Labu takar
- Plastik penutup
- Karet gelang
- Autoclave
- Alat pengukur pH

Bahan

- Media MS
- Gula
- Aquadest
- Agar

Cara Kerja

A. Pembuatan Media Dasar MS

- Timbang medium MS untuk volume 500 mL
- Timbang agar 3,5 gram
- Tambahkan glukosa/gula pasir 15 gram
- Tambahkan aquadest sampai volume mendekati 500 mL dan atur pH 5,6-6.
- Panaskan campuran media sampai larut
- Tuangkan medium ke dalam botol-botol kultur
- Sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121⁰C tekanan 1 atm selama 30 menit
- Simpan medium kultur.
- Amati setiap hari selama 1 minggu.

B. Pembuatan Media Alternatif: Hyponex/Gandasil D atau vitabloom D

- Siapkan air dalam gelas piala sebanyak 500 ml
- Timbang hiponex 2 gram/liter
- Timbang gula pasir 20 gram/liter
- Timbang agar 7-8 gram/liter
- Masukkan hiponex, gula, agar ke dalam gelas piala berisi air 500 ml satu persatu diaduk hingga rata. Tambahkan air hingga mencapai 1 liter.
- Masak media hingga mendidih
- Tuangkan media secara merata ke dalam botol-botol kultur jaringan
 - Untuk botol kecil sebanyak 10 ml
 - Untuk botol selai sebanyak 20 ml
- Botol-botol yang sudah terisi media ditutup dengan menggunakan plastik dan karet
Media siap disterilisasi di dalam autoklaf

C. Pembuatan Media menggunakan media organik: kentang/ubi untuk kultur anggrek

- Siapkan air dalam gelas piala sebanyak 500 ml
- Siapkan air kelapa muda sebanyak 150 ml/liter
- Timbang 500 gram kentang, kupas, cuci, potong
- Rebus kentang ke dalam 1,5 liter air hingga menyusut 300 ml

- Saring air rebusan kentang
- Timbang gula pasir 20 gram/liter
- Timbang agar 7-8 gram/liter
- Timbang arang aktif 0,5 gram/liter
- Masukkan air rebusan kentang, gula, agar, arang aktif, air kelapa ke dalam gelas piala berisi air 500 ml satu persatu diaduk hingga rata. Tambahkan air hingga mencapai 1 liter.
- Masak media hingga mendidih
- Tuangkan media secara merata ke dalam botol-botol kultur jaringan
- Botol-botol yang sudah terisi media ditutup dengan menggunakan plastik dan karet
- Media siap disterilisasi di dalam autoklaf

Hasil Pengamatan

No	Kelompok	Jumlah awal media (botol)	Minggu I		Minggu II		Keterangan
			Kontam	Steril	Kontam	Steril	
1							
2							
3							
4							
5							

TOPIK III PERSIAPAN EKSPLAN

Pendahuluan

Eksplan adalah bagian dari tanaman yang digunakan sebagai sumber untuk kultur jaringan. Semua bagian tanaman bisa digunakan sebagai eksplan, tetapi ada bagian atau organ tertentu dari tanaman yang mempunyai nilai lebih apabila digunakan sebagai ekplan, yaitu bagian tunas karena mempunyai sifat meristematis yang tinggi. Pemilihan eksplan harus tepat karena akan menentukan tingkat keberhasilan kultur yang dilakukan. Kriteria pemilihan ekplan yang harus diperhatikan diantaranya yaitu bagian tanaman yang digunakan sebagai ekplan, umur fisiologis tanaman induk, dan ukuran ekplan. Untuk mendapatkan tanaman yang bebas dari kontaminasi, terlebih dahulu ekplan harus disterilisasi. Sterilisasi eksplan ini meliputi 2 macam, yaitu sterilisasi di luar laminar dan sterilisasi di dalam laminar.

Kompetensi Dasar

Mahasiswa mampu mempersiapkan ekplan

Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Setelah melakukan praktikum tentang persiapan eksplan, diharapkan mahasiswa mampu melakukan persiapan eksplan kultur dengan baik dan benar sehingga tidak ada kontaminasi.

Alat dan Bahan:

Alat

- Beaker glass
- Botol kultur
- Gunting tanaman
- Pinset
- Bunsen
- Cawan petri

Bahan

- Detergen
- Fungisida
- Bakterisida
- Akuades
- Antibiotik
- HgCl₂
- Bayclin 5%, 10%, 15%
- Media kultur
- Bethadine

Cara Kerja

Sterilisasi di luar laminar

- Cuci tunas dengan detergen selama 10 menit
- Bersihkan sampai busa habis
- Rendam dengan fungisida selama 15 menit
- Bilas dengan aquadest steril selama 3 menit
- Rendam dengan bakterisida 1% selama 15 menit
- Bilas dengan akuades steril selama 3 menit
- Rendam dengan antibiotik selama 1-7 jam (shaking)
- Dibilas dengan air steril selama 3 menit

Sterilisasi di dalam Laminar

- Rendam dalam HgCl_2 0,01% selama 7 menit
- Bilas dengan air steril selama 3 menit
- Rendam dengan Bayclin 15% selama 7 menit
- Rendam dengan Bayclin 10% selama 7 menit
- Rendam dengan Bayclin 5% selama 7 menit
- Bilas air steril sebanyak 3x masing-masing selama 3 menit
- Eksplan siap ditanam

Hasil Pengamatan

<p>Universitas Esa Unggul</p>
--

TOPIK IV SUBKULTUR

Pendahuluan

Subkultur merupakan salah satu tahapan dalam perbanyak tanaman melalui kultur jaringan. Pada tahapan subkultur dilakukan penggantian media tanam dengan media yang baru sehingga kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan dapat terpenuhi. Prinsip dasar subkultur adalah memotong, membelah dan menanam kembali eksplan yang telah tumbuh sehingga jumlah tanaman akan bertambah banyak. Subkultur dilakukan jika eksplan pada medium kultur mengalami browning sebagai indikasi dari kematian sel. Selain itu, alasan dilakukannya subkultur yaitu berkurangnya kandungan nutrisi dalam media yang ditandai dengan mengeringnya media. Ada tiga tujuan dilakukannya subkultur, yaitu penjarangan, penyelamatan, dan peremajaan. Teknik subkultur tanaman pada media padat lebih mudah dilakukan yaitu hanya dengan meletakkan plantlet yang sudah terbentuk di atas cawan petri, kemudian membagi menjadi bagian-bagian kecil dengan menggunakan skalpel dan pinset. Setelah plantlet dipotong menjadi bagian-bagian yang kecil, maka plantlet dimasukkan kembali ke dalam botol kultur baru yang berisi media dengan komposisi bahan kimia sama seperti media lama.

Kompetensi Mahasiswa

Mahasiswa mampu mempraktekkan proses subkultur dengan berbagai tujuan.

Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Setelah melakukan praktikum tentang subkultur, diharapkan mahasiswa mampu melakukan subkultur dengan baik dan benar sehingga tujuan dari subkultur bisa tercapai.

Alat dan Bahan

Alat

- Laminar Air Flow (LAF)
- Bunsen
- Botol kultur
- Petridish

Bahan

- Beaker glass
- Pinset
- Skalpel
- Alkohol 70 %
- Media
- Kultur tanaman

Cara Kerja

Penjarangan

- Penjarangan dilakukan jika eksplan di dalam botol telah penuh.
- Eksplan dikeluarkan dari dalam botol, letakkan pada cawan petri
- Pisah-pisahkan eksplan menggunakan pinset dan scalpel
- Buang akar-akar browning, potong ujung daunnya jika eksplan terlalu tinggi agar pertumbuhannya seragam
- Eksplan ditanam pada media baru

Penyelamatan

- Penyelamatan dilakukan jika terdapat jamur (ciri-cirinya: berbentuk serabut atau kapas berwarna) dan bakteri (ciri-cirinya: lendir berwarna putih) pada media maupun pada eksplan
- Eksplan yang terkontaminasi dikeluarkan, potong eksplan yang tidak terkontaminasi kemudian sterilisasi klorox 5% selama 7 menit
- Kemudian eksplan ditanam pada media baru

Peremajaan

- Peremajaan dilakukan jika eksplan dalam botol kultur terdapat daun menguning atau mengalami browning, dapat juga dilakukan jika media mengering.
- Eksplan dikeluarkan lalu ditanam kembali ke dalam media kultur yang baru (pindah media)

Hasil Pengamatan

<p>Universitas Esa Unggul</p>
--

TOPIK V

AKLIMATISASI

Pendahuluan

Aklimatisasi adalah proses penyesuaian atau adaptasi plantlet dari kondisi mikro di dalam botol ke kondisi lingkungan luar. Plantlet yang dapat diaklimatisasi adalah plantlet yang telah lengkap organnya seperti akar, daun, dan batang sehingga ketika berada di luar lingkungan, plantlet dapat melanjutkan pertumbuhannya dengan baik. Tahapan aklimatisasi ini merupakan tahapan yang sangat kritis karena banyak kegagalan terjadi pada tahapan ini. Tujuan dari aklimatisasi adalah untuk mengkondisikan tanaman agar tidak terjadi stress pada waktu ditanam di lapangan.

Aklimatisasi biasanya dilakukan dengan memindahkan plantlet ke dalam polybag yang berisi media dan disungkup dengan plastik bening. Sungkup digunakan untuk melindungi bibit dari udara luar dan serangan hama penyakit karena bibit hasil kultur jaringan masih sangat rentan terhadap serangan hama penyakit dan udara luar. Setelah bibit mampu beradaptasi dengan lingkungan barunya maka secara bertahap sungkup dibuka dan pemeliharaan bibit dilakukan dengan cara yang sama dengan pemeliharaan bibit generatif.

Kompetensi Mahasiswa

Mahasiswa mampu mempraktekkan proses aklimatisasi yang benar

Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Setelah melakukan praktikum tentang aklimatisasi, diharapkan mahasiswa bisa melakukan proses aklimatisasi dengan benar sehingga peluang keberhasilan tanaman hidup pasca aklimatisasi menjadi lebih besar

Alat dan Bahan

Alat

- Beaker Glass
- Batang pengaduk
- Botol plastik

Bahan

- Tanaman hasil kultur jaringan
- Sekam bakar
- Fungisida
- Bakterisida
- Cocopeat

Cara Kerja

- Buat larutan fungisida (1g/L) + bakterisida (1g/L)
- Buat media aklimatisasi yang terdiri dari sekam bakar:cocopeat (1:1)
- Letakkan media aklimatisasi ke dalam botol plastik yang telah diberi lubang dibawahnya
- Buka botol yang berisi tanaman
- Ambil tanaman, letakkan di air mengalir/kran (agar medium terlepas)
- Hasil bilasan kemudian dimasukkan ke dalam larutan fungisida dan bakterisida
- Diamkan selama 15-30 menit
- Tanaman siap ditanam di media aklimatisasi

Hasil Pengamatan



TOPIK VI KULTUR ANTHER

Pendahuluan

Kultur jaringan bermula dari adanya pembuktian sifat totipotensi sel, yaitu bahwa setiap sel tanaman yang hidup dilengkapi dengan informasi genetik dan perangkat fisiologis yang lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh, jika berada dalam kondisi yang sesuai. Penemuan zat pengatur tumbuh (ZPT) dan upaya pengembangan formulasi media sangat berperan penting dalam menentukan keberhasilan teknik kultur jaringan. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah perbanyakan tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman dengan menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat yang steril.

Berdasarkan bagian tanaman atau eksplan yang dikulturkan, dibedakan menjadi beberapa tipe kultur, salah satunya yaitu kultur anther. Kultur anther merupakan teknik baru yang telah dikembangkan pada beberapa tanaman untuk mendapatkan galur murni melalui produksi tanaman haploid ganda. Manfaat tanaman haploid dalam pemuliaan tanaman adalah apabila digandakan kromosomnya dengan kolkhisin atau melalui fusi protoplas akan diperoleh tanaman 100% homozigot. Media yang digunakan dalam percobaan kultur anther adalah media MS. Media merupakan salah satu faktor penentu dalam keberhasilan kultur jaringan, karena di dalam media terkandung berbagai nutrisi dan zat pengatur tumbuh yang dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang dikulturkan.

Kompetensi yang Diharapkan

Setelah mempelajari tentang topik ini, diharapkan mahasiswa mampu melakukan kultur anther dengan tepat

Alat dan Bahan

Alat

- botol kultur
- autoklaf
- petridish
- Laminar Air Flow
- erlenmeyer

Bahan

- | | | |
|-----------|---------------------|--|
| - gelas | - Bunga anggrek | - alumunium foil |
| ukur | - alcohol 96%) | - tween 20 |
| - scalpel | - aquadest steril | - detergen |
| - pinset | - betadine | - Air kelapa sebagai Zat Pengatur Tumbuh(ZPT) alami. |
| - gunting | - larutan fungisida | |

Cara Kerja

Sterilisasi Eksplan

- Eksplan dicuci dengan detergen selama 30 menit sambil terus digojok
- Eksplan dibilas dengan air mengalir.
- Eksplan yang sudah bersih direndam dalam larutan tween 20 sebanyak 2-3 tetes, kemudian digojok selama 30 menit
- Eksplan dibilas dengan aquadest steril minimal sebanyak 3 kali.
- Eksplan direndam dalam larutan chlorox 20% + tween 20 selama 10 menit sambil digojok
- Eksplan dibilas dengan aquadest steril minimal sebanyak 3 kali.
- Eksplan direndam dalam larutan iodine 5% selama 10 menit sambil digojok
- Eksplan dibilas dengan aquadest steril minimal sebanyak 3 kali.

Penanaman Eksplan

- Kuncup bunga yang sudah steril dipindahkan ke dalam petridish.
- Kepala saridari kuncup bunga dikeluarkan dengan menggunakan scalpel dan pinset.
- Anther ditanam pada media MS
- kultur tersebut diinkubasi dalam keadaan terang dengan suhu yang terkontrol.

Hasil Pengamatan



DAFTAR PUSTAKA

- Dwiyani, Rindang. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman*. Pelawa Sari. Bali
- Sandra, Edhi. 2013. *Kultur Jaringan Skala Rumah Tangga*. IPB Press. Bogor.
- Silalahi, Marina. 2015. *Kultur Jaringan*. Universitas Kristen Indonesia. Jakarta.
- Winarto, B. dan F. Rachmawati. 2007. Teknik Kultur Anther pada Pemuliaan Anthurium. *Jurnal Hortikultura*. Vol 17 (2): 127-137.

