

ISBN 978-602-0856-37-7



PRODUKSI BIBIT KULTUR JARINGAN TANAMAN KRISAN

PANGESTI NUGRAHANI



**PENERBIT: UPN Press
SURABAYA
2015**

ISBN 978-602-0856-37-7

**PRODUKSI BIBIT KULTUR JARINGAN
TANAMAN KRISAN**

**OLEH
PANGESTI NUGRAHANI**

**PENERBIT: UPN Press
SURABAYA
2015**

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah rabbil alamin, penulis panjatkan kehadiran Allah yang Maha Pengasih dan Penyayang, karena dengan petunjuk dan kekuatan dariNya maka tulisan ini dapat diselesaikan.

Tulisan ini merupakan Bahan Ajar untuk menambah khasanah ilmu pengetahuan bagi mahasiswa yang mengambil mata Kuliah Dasar-dasar Bioteknologi Tanaman. Di dalam buku ini selain disampaikan mengenai usaha penerapan kultur jaringan untuk memproduksi bibit tanaman hortikultura khususnya tanaman Krisan. Tulisan di dalam buku ini secara teknis dikembangkan berdasarkan hasil penelitian dan pengalaman di dalam laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian UPN Veteran Jatim, Surabaya.

Buku ini dapat tersusun berkat bantuan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pemerintah RI yang telah memberikan bantuan dana melalui Dana Hibah PUPT DIKTI tahun 2015.

Buku ini masih akan terus diperbaiki dan disempurnakan agar dapat memenuhi harapan para pembaca akan adanya Bahan Ajar yang baik. Meskipun demikian, mudah-mudahan buku ini dapat bermanfaat bagi para mahasiswa dalam mengembangkan ilmu pengetahuan serta pengembangan penelitian.

Surabaya, Agustus 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	KATA PENGANTAR	iii
	DAFTAR ISI	iv
I	PENDAHULUAN	1
II	KEUNTUNGAN PEMANFAATAN KULTUR JARINGAN ...	6
III	PERLENGKAPAN LABORATORIUM KULTUR JARINGAN	11
IV	TATA LAKSANA LABORATORIUM	19
V	STERILISASI	25
VI	MEDIA TANAM	35
VII	BAHAN TANAM	45
VIII	PENANAMAN	53
IX	AKLIMATISASI	58
X	PENANAMAN TANAMAN INDUK DI LAPANGAN	63
XI	JENIS KRISAN DI INDONESIA	67
	DAFTAR PUSTAKA	73

I. PENDAHULUAN

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:

- Penyiapan fasilitas laboratorium
- Penyiapan alat dan bahan
- Pembuatan media
- Inisiasi
- Sterilisasi
- Multiplikasi
- Pengakaran
- Aklimatisasi

Dalam pengembangan usaha kultur jaringan, fasilitas laboratorium mutlak diperlukan. Laboratorium dapat disediakan mulai dari laboratorium yang sederhana sesuai dengan kriteria yang ditentukan, yaitu dapat digunakan sebagai tempat kegiatan yang bersifat aseptik (bebas mikroba / steril), terdapat sumber air dan mempunyai ruangan-ruangan yang diperlukan.

Sama dengan pengembangan bidang pertanian yang lainnya, kegiatan kultur jaringan memerlukan alat dan bahan. Alat-alat kultur jaringan yang minimal harus disediakan adalah *laminar air flow cabinet*, *autoclave*, *dissecting set*, dan *glass ware* (alat-alat gelas). Bahan-bahan yang diperlukan adalah bahan kimia untuk nutrisi tanaman, hormone hormone pertumbuhan dan bahan-bahan untuk kegiatan sterilisasi.

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. Media yang sudah jadi ditempatkan pada tabung reaksi atau botol-botol kaca. Media yang digunakan juga harus disterilkan dengan cara memanaskannya dengan autoklaf. Inisiasi adalah pengambilan eksplan dari bagian tanaman yang akan dikulturkan. Bagian tanaman yang sering digunakan untuk kegiatan kultur jaringan adalah tunas.

Semua kegiatan dalam kultur jaringan harus dilakukan di tempat yang steril, yaitu di *laminar air flow* dan menggunakan alat-alat yang juga steril. Sterilisasi juga dilakukan terhadap peralatan, yaitu menggunakan alkohol 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 dan penyinaran secukupnya.

Pengakaran adalah fase di mana 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, abu-abu, hitam atau biru (disebabkan jamur) atau busuk (disebabkan bakteri).

Aklimatisasi adalah kegiatan memindahkan eksplan keluar dari ruangan aseptik. 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.

Saat ini sudah terdapat beberapa tanaman kehutanan yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan, antara lain adalah: jati, sengon, akasia, dll. Bibit

hasil kultur jaringan yang ditanam di beberapa areal menunjukkan pertumbuhan yang baik, bahkan jati hasil kultur jaringan yang sering disebut dengan jati emas dapat dipanen dalam jangka waktu yang relatif lebih pendek dibandingkan dengan tanaman jati yang berasal dari benih generatif, terlepas dari kualitas kayunya yang belum teruji di Indonesia.

Penerapan kultur jaringan pada tanaman hortikultura telah lebih berkembang. Bibit produksi kultur jaringan telah banyak yang menjadi sumber stok utama. Bibit tanaman hias Anggrek dan Krisan merupakan tanaman hortikultura yang paling banyak dikembangkan melalui teknik kultur jaringan. Untuk itu pengetahuan dan peningkatan teknologi melalui berbagai penelitian masih terus dikembangkan.

II. KEUNTUNGAN PEMANFAATAN KULTUR JARINGAN

Kultur jaringan adalah serangkaian kegiatan yang dilakukan untuk membuat bagian tanaman (akar, tunas, jaringan tumbuh tanaman) tumbuh menjadi tanaman utuh (sempurna) dikondisi *in vitro* (di dalam gelas). Keuntungan dari kultur jaringan lebih hemat tempat, hemat waktu, dan tanaman yang diperbanyak dengan kultur jaringan mempunyai sifat sama atau seragam dengan induknya.

Secara rinci keuntungan pengembangan bibit dengan metode kultur jaringan tanaman adalah :

- Pengadaan bibit tidak tergantung musim
- Bibit dapat diproduksi dalam jumlah banyak dengan waktu yang relatif lebih cepat (dari satu mata tunas dalam 1 tahun dapat dihasilkan hingga 10.000 planlet/bibit)
- Bibit yang dihasilkan seragam
- Bibit yang dihasilkan bebas penyakit (menggunakan organ tertentu)
- Biaya pengangkutan bibit relatif lebih murah dan mudah
- Dalam proses pembibitan bebas dari gangguan hama, penyakit, dan deraan lingkungan lainnya.

Perkembangan kultur jaringan di Indonesia terasa sangat lambat, bahkan hampir dikatakan jalan di tempat jika dibandingkan dengan negara-negara lainnya, tidaklah heran jika impor bibit anggrek dalam bentuk 'flask' sempat membanjiri nursery-nursery anggrek di negara kita. Selain kesenjangan teknologi di lini akademisi, lembaga penelitian, publik dan pecinta anggrek, salah satu penyebab teknologi ini menjadi sangat lambat perkembangannya adalah karena adanya persepsi bahwa diperlukan investasi yang 'sangat mahal' untuk membangun sebuah lab kultur jaringan, dan hanya cocok atau 'feasible' untuk perusahaan.

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang luar biasa, salah satunya adalah anggrek, diperkirakan sekitar 5000 jenis anggrek spesies tersebar di hutan wilayah Indonesia. Potensi ini sangat berharga bagi pengembang dan pecinta anggrek di Indonesia, khususnya potensi genetik untuk menghasilkan anggrek silangan yang memiliki nilai komersial tinggi. Potensi tersebut akan menjadi tidak berarti manakala penebangan hutan dan eksploitasi besar-besaran terjadi hutan kita, belum lagi pencurian terangterangan ataupun "terselubung" dengan dalih kerjasama dan sumbangan penelitian baik oleh masyarakat kita maupun orang asing. Sementara itu hanya sebagian kecil pihak yang mampu melakukan pengembangan dan pemanfaatan anggrek spesies,

khususnya yang berkaitan dengan teknologi kultur jaringan. Tidak dipungkiri bahwa metode terbaik hingga saat ini dalam pelestarian dan perbanyakan anggrek adalah dengan kultur jaringan, karena melalui kultur jaringan banyak hal yang bisa dilakukan dibandingkan dengan metode konvensional.

Beberapa gambaran dan potensi yang bisa dimunculkan dalam kultur jaringan diantaranya adalah :

- Kultur meristem, dapat menghasilkan anggrek yang bebas virus, sehingga sangat tepat digunakan pada tanaman anggrek spesies langka yang telah terinfeksi oleh hama penyakit, termasuk virus.
- Kultur anther, bisa menghasilkan anggrek dengan genetik haploid ($1n$), sehingga bentuknya lebih kecil jika dibandingkan dengan anggrek diploid ($2n$). Dengan demikian sangat dimungkinkan untuk menghasilkan tanaman anggrek mini, selain itu dengan kultur anther berpeluang memunculkan sifat resesif unggul yang pada kondisi normal tidak akan muncul karena tertutup oleh yang dominan
- Teknik poliploid dimungkinkan untuk mendapatkan tanaman anggrek 'giant' atau besar. Teknik ini salah satunya dengan memberikan induksi bahan kimia yang bersifat menghambat (cholchicine)
- Kloning, teknik ini memungkinkan untuk dihasilkan anggrek dengan jumlah banyak dan seragam,

khususnya untuk jenis anggrek bunga potong. Sebagian penganggrek telah mampu melakukan teknik ini.

- Mutasi, secara alami mutasi sangat sulit terjadi. Tanaman yang mengalami mutasi permanen biasanya memiliki nilai ekonomis yang sangat tinggi
- Bank plasma, baik untuk spesies langka Indonesia maupun dari luar negeri untuk menjaga keaslian genetik yang sangat penting dalam proses pemuliaan anggrek.
- Benih sintesis, propagul kultur jaringan tanaman dengan enkapsulasi. Bahkan saat ini sudah dapat ditumbuhkan benih sintesis pada media yang tidak steril.

Telah banyak tanaman diperbanyak melalui teknik mikropropagasi atau untuk lebih spesifik lagi melalui teknik *in vitro* setiap tahun di seluruh dunia. Teknik ini dipandang sebagai teknik yang dapat dibisniskan dan dibandingkan dengan perbanyakan tanaman secara konvensional.

Perbanyakan tanaman melalui mikropropagasi memiliki banyak kelebihan. Untuk memperbanyak tanaman tertentu yang sulit atau sangat lambat diperbanyak secara konvensional, perbanyakan tanaman secara mikropropagasi menawarkan peluang besar untuk menghasilkan jumlah bibit tanaman yang banyak dalam waktu relatif singkat sehingga lebih ekonomis.

Dalam bidang pertanian sendiri, penggunaan teknik ini sangat berpengaruh besar dan mengalami banyak kemajuan meliputi hal-hal sbb:

- Produksi tanaman bebas pathogen
- Produksi bahan-bahan farmasi
- Pelestarian plasma nutfah
- Pemuliaan tanaman dan rekayasa genetika
- Perbanyak klonal tanaman dengan cepat.

Manfaat utama dari teknik ini adalah untuk memperbanyak vegetatif tanaman yang permintaannya tinggi tetapi pasokannya rendah, karena laju perkembangannya dianggap lambat. Produsen benih dapat memanfaatkan teknik ini untuk memperbanyak tanaman tertua dari galur murni tertentu dalam jumlah besar, yang nantinya digunakan untuk memproduksi benih hibrida. Namun perlu diingat bahwa tanaman yang diperbanyak melalui teknik ini harus *true-to-type*, artinya sifat-sifat tanaman baru harus sama dengan tanaman induk atau tanaman sumber eksplan.

III. PERLENGKAPAN LABORATORIUM KULTUR JARINGAN

Syarat pokok pelaksanaan kultur jaringan adalah laboratorium dengan segala fasilitasnya. Laboratorium harus menyediakan alat-alat kerja, sarana pendukung terciptanya kondisi yang aseptik terkendali, dan fasilitas fasilitas dasar seperti air, listrik, dan bahan bakar. Laboratorium ini berfungsi untuk mengkondisikan kultur dalam suhu dan pencahayaan terkontrol. Kultur jaringan tanaman juga memerlukan green house untuk akimatisasi planlet dari botol ke lingkungan eksternal dan untuk memperbanyak tanaman.

Secara prinsip, laboratorium kultur jaringan dapat disederhanakan dengan melakukan modifikasi peralatan dan bahan yang digunakan, sehingga sangat dimungkinkan kultur jaringan seperti 'home industri'.

Laboratorium kultur jaringan hendaknya jauh dari sumber polusi, dekat dengan sumber tenaga listrik dan air. Untuk menghemat tenaga listrik, ada baiknya bila laboratorium kultur jaringan ditempatkan di daerah tinggi, agar suhu ruangan tetap rendah.

Ukuran laboratorium tergantung pada jumlah bibit yang akan diproduksi. Untuk ukuran laboratorium sekitar 250 m², bibit yang dapat diproduksi tiap tahun sekitar

400–500.000 planlet/bibit, yang dapat memenuhi pertanaman seluas 500–800 ha.

Dalam suatu laboratorium minimal terdapat 5 ruangan terpisah, yaitu gudang (ruang) untuk penyimpanan bahan, ruang persiapan dan pembuatan media, ruang tanam, ruang inkubasi (untuk pertunasan dan pembentukan plantlet/bibit tanaman) dan rumah kaca.

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 vacuum, distilling unit, bunsen, refrigerator (kulkas) dan freezer untuk penyimpanan larutan stok dan bahan kimia, 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 $\mu\text{mho/cm}$.

Ruang Tanam

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 diidinfeksi.

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 15° C – 30° C, 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%.



Gambar 3.1 Eksplan dalam botol di ruang kultur

Peralatan

Peralatan yang diperlukan dari suatu laboratorium kultur jaringan umumnya adalah sebagai berikut:

1. Hot plate/magnetic stirrer atau kompor
2. Peralatan gelas (gelas ukur, erlenmeyer) atau stainless steel untuk memanaskan dan melarutkan media
3. Alat sterilisasi dengan tekanan uap (autoclave)
4. pH meter
5. Timbangan (analitical dan bench top loading)
6. Gelas ukur gradual
7. Botol kultur dengan penutupnya
8. Dispenser
9. Alat diseksi (spatula, scalpel (pinset), forcep, gunting)
10. Refrigerator
11. Distiling unit atau water deionizer
12. Oven

13. Microwave
14. Mikroskop
15. Pipet ukur
16. Shaker
17. Laminar air flow

Peralatan gelas yang digunakan di lab kultur jaringan umumnya terbuat dari Pyrex. Erlenmeyer dari berbagai ukuran (50, 125, 250, 500, 1000 atau 2000 ml) digunakan untuk wadah kultur dan pembuatan media. Tabung gelas, cawan petri, botol jam atau bekas selai juga sering digunakan sebagai botol kultur. Peralatan gelas tersebut harus tahan panas selama proses sterilisasi dengan oven atau autoclave. Peralatan gelas lain yang biasanya digunakan adalah gelas piala, gelas ukur, pipet dan labu ukur.

Bahan Kimia

Bahan kimia yang dibutuhkan untuk kegiatan kultur jaringan adalah garam hara makro dan mikro, vitamin, zat pengatur tumbuh, asam amino, alkohol, clorox. Untuk membuat medium kultur jaringan, dibuat larutan stok, setiap larutan stok dapat dipergunakan untuk 40, 50 dan bahkan 100 liter medium. Larutan stok dibuat menjadi beberapa kelompok : stok besi (iron), stok mikronutrien, stok vitamin dan stok hormon. Untuk makronutrien tidak

dibuat stok, jadi harus ditimbang satu persatu, tetapi jika diperlukan dapat dibuat larutan stok secara tunggal, tidak dikelompokkan menjadi satu.

Pemeliharaan Peralatan dan Penanganan Bahan Kimia

Laboratorium harus menjaga semua inventaris peralatan dan bahan kimia yang dimilikinya secara akurat. Inventaris adalah catatan, biasanya dalam bentuk basis-data, bahan kimia dalam laboratorium dan informasi penting tentang pengelolaannya yang tepat. Inventaris yang dikelola dengan baik meliputi bahan kimia yang didapat dari sumber komersial dan yang dibuat di laboratorium, juga lokasi penyimpanan untuk setiap wadah masing-masing bahan kimia.

Semua peralatan dan mesin yang digunakan dalam kultur jaringan harus selalu dipelihara secara rutin. Pada umumnya pemeliharaan alat terdiri dari perencanaan pemeliharaan, pelaksanaan pemeliharaan, monitoring pemeliharaan peralatan dan tindak lanjut pemeliharaan peralatan.

Contoh perencanaan pemeliharaan pada perabot gelas (*glassware*) selalu langsung dibersihkan sesegera mungkin setelah pemakaian. Pemeliharaan mesin-mesin

besar seperti genset pada umumnya direncanakan setiap tiga atau enam bulan sekali.

Monitoring pemeliharaan harus dilakukan secara melekat sehingga semua operator alat mempunyai instruksi kerja alat yang bersangkutan dan umumnya sudah ada pada setiap pembelian alat. Monitoring pemeliharaan umumnya dilakukan secara periodik misalnya setiap bulan. Tindak lanjut dari pemeliharaan selalu dilakukan apabila terdapat alat dan mesin pembenihan yang rusak dan harus diperbaiki.

IV. TATA LAKSANA LABORATORIUM

Bekerja di laboratorium merupakan aktivitas yang melibatkan penggunaan alat-alat laboratorium, bahan-bahan fisik, kimiawi, biologis serta prosedur kerja yang beraneka ragam. Rangkaian kerja laboratorium berpotensi munculnya risiko kecelakaan kerja yang dapat memberi dampak bagi keselamatan dan kesehatan diri, baik secara fisik, mental dan sosial.

Umumnya penggunaan operasional di laboratorium perbanyak tanaman dengan kultur jaringan dapat dipelajari dengan mudah. Hal yang paling perlu diperhatikan adalah akurasi, kebersihan dan keamanan saat bekerja dengan teknik kultur jaringan.

Kondisi Lingkungan Laboratorium

Ruangan laboratorium harus memiliki sistem ventilasi yang baik, sehingga proses keluar masuk udara berjalan lancar. Semakin baik sirkulasi udara, maka kondisi laboratorium juga akan sehat. Laboratorium harus memiliki jalur evakuasi yang baik. Laboratorium setidaknya memiliki dua pintu keluar dengan jarak yang cukup jauh.

Ruangan laboratorium harus ditata dengan rapi. Penempatan bahan kimia dan peralatan percobaan harus ditata dengan rapi supaya memudahkan untuk mencarinya. Bila perlu, dibuat denah dan panduan penempatan bahan

kimia di raknya supaya semakin memudahkan untuk mencari bahan kimia tertentu. Bahan kimia yang berbahaya harus ditempatkan di rak khusus dan pisahkan dua bahan kimia yang dapat menimbulkan ledakan bila bereaksi.

Alat keselamatan kerja harus selalu tersedia dan dalam kondisi yang baik, terutama kotak P3K dan alat pemadam api. Nomor telepon penting seperti pemadam kebakaran dan petugas medis dicantumkan atau ditulis di dekat alat pemadam kebakaran, supaya saat terjadi kecelakaan yang cukup parah dapat ditangani dengan segera.

Prosedur Kerja Dasar

Penimbangan semua bahan yang ditimbang harus dilakukan dengan hati-hati meskipun untuk pembuatan media dalam skala komersial. Setiap penggunaan timbangan atau alat-alat lain harus memperhatikan instruksi dari pabrikannya. Jenis timbangan yang sering digunakan di lab antara lain top-loading balance dan analytical balance yang memungkinkan akurasi penimbangan hingga skala milligram. Beberapa persyaratan yang harus diperhatikan agar diperoleh penimbangan yang akurat adalah (i) timbangan harus ditempatkan pada tempat yang keras, stabil, permukaannya rata yang bebas getaran dan kebocoran, (ii)

daerah sekitar penimbangan harus terjaga kebersihannya, dan tidak terganggu oleh hembusan angin (iii) penimbangan jangan sampai pernah overload, (iv) penimbangan disarankan menggunakan wadah atau alas yang ringan atau kertas daripada menempatkan bahan yang ditimbang secara langsung di atas piring timbangan.

Pengukuran cairan/larutan Peralatan gelas yang mempunyai ukuran seperti gelas piala, erlenmeyer dan pipet diperlukan untuk pembuatan media. Gelas ukur kapasitas 10, 25, 100 dan 1000 ml banyak digunakan untuk mengukur volume, tetapi pengukuran yang lebih akurat diperlukan labu ukur dan pipet. Pengukuran larutan dengan menggunakan pipet dan labu ukur hanya akan akurat apabila bagian dasar dari cekungan antara air dan udara berada tepat pada tanda pengukuran.

Penggunaan pipet harus dibantu dengan alat penghisap larutan (pipetor). Jangan pernah menggunakan mulut untuk memipet. Jenis-jenis pipetor yang umum digunakan antara lain (i) tipe bola penghisap yang dilengkapi dengan beberapa katup pengontrol, (ii) pipet penghisap yang dioperasikan menggunakan roda kecil pada bagian atas alat penghisap, (iii) alat penghisap dengan bantuan pompa udara secara elektrik. Cairan dihisap kedalam pipet dengan menekan tombol bagian atas dan melepaskan cairan dengan menekan tombol bagian bawah,

(iv) pipet mikro, biasanya untuk pengambilan larutan dengan volume yang sangat kecil (mikro liter).

Sebelum memindahkan bahan kimia, hal yang harus dilakukan adalah mengetahui segala informasi tentang bahan kimia yang akan digunakan. Seperti cara membawa, bahaya yang ditimbulkan, dll. Pindahkanlah sesuai kebutuhan dan jangan berlebihan. Bila ada sisa bahan kimia, jangan dikembalikan ke tempatnya semula karena dapat menyebabkan kontaminasi pada bahan kimia.

Memindahkan bahan kimia yang berwujud cair, dilakukan dengan menggunakan batang pengaduk atau pipet tetes. Hindari percikan karena bisa menyebabkan iritasi pada kulit. Jangan menaruh tutup botol diatas meja supaya tutup botol tidak kotor oleh kotoran di atas meja. Untuk memindahkan bahan kimia yang berwujud padat, gunakan sendok atau alat lain yang tidak terbuat dari logam. Hindari menggunakan satu sendok untuk mengambil beberapa jenis zat kimia supaya terhindar dari kontaminasi.

Membersihkan peralatan gelas dilakukan dengan merendam gelas dalam larutan asam kromat yang diikuti pembilasan dengan air kran dan air destilasi. Karena asam kromat dapat menyebabkan korosif, maka cara ini banyak ditinggalkan kecuali untuk peralatan gelas yang terkontaminasi tinggi. Pencucian yang lebih aman adalah dengan air panas ($>70^{\circ}\text{C}$) + sabun, diikuti dengan

pembilasan dengan air panas dan air destilasi. Peralatan gelas yang telah dicuci, dikeringkan dalam oven pada suhu 150° C dibungkus dengan aluminium foil, kemudian disimpan dalam lemari tertutup.

Limbah laboratorium dapat berupa limbah kimia, limbah bahan organik dan bahan non organik. Limbah kimia dibuang di tempat khusus karena beberapa jenis zat kimia sangat berbahaya bagi lingkungan. Buang segera limbah sehabis melakukan percobaan. Sementara limbah lainnya seperti kertas, korek api, dan lainnya dibuang di tempat sampah. Sebaiknya dipisahkan limbah organik dan nonorganik supaya pengolahan sampahnya lebih mudah.

Tata Tertib Keselamatan Kerja

Aturan umum dalam tata tertib keselamatan kerja adalah sebagai berikut:

1. Dilarang mengambil atau membawa keluar alat-alat serta bahan dalam laboratorium tanpa seizin petugas laboratorium.
2. Orang yang tidak berkepentingan dilarang masuk ke laboratorium. Hal ini untuk mencegah hal-hal yang tidak diinginkan.
3. Menggunakan alat dan bahan sesuai dengan petunjuk kerja yang ada.

4. Dilarang melakukan eksperimen sebelum mengetahui informasi mengenai bahaya bahan kimia, alat-alat, dan cara pemakaiannya.
5. Mengenali semua jenis peralatan keselamatan kerja dan letaknya untuk memudahkan pertolongan saat terjadi kecelakaan kerja.
6. Mengenakan jas laboratorium saat bekerja di laboratorium.
7. Harus mengetahui cara pemakaian alat darurat seperti pemadam kebakaran, *eye shower*, respirator, dan alat keselamatan kerja yang lainnya.
8. Jika terjadi kerusakan atau kecelakaan, sebaiknya segera melaporkannya ke petugas laboratorium.
9. Berhati-hati bila bekerja dengan asam kuat reagen korosif, reagen-reagen yang volatil dan mudah terbakar.
10. Mengetahui cara memberi pertolongan pertama pada kecelakaan (P3K).
11. Membuang sampah pada tempatnya.
12. Usahakan untuk tidak sendirian di ruang laboratorium.
13. Jangan bermain-main di dalam ruangan laboratorium.
14. Lakukan latihan keselamatan kerja secara periodik.
15. Dilarang merokok, makan, dan minum di laboratorium.

V. STERILISASI

Sterilisasi merupakan kegiatan untuk menghilangkan kontaminan yang dapat menyebabkan kontaminasi dan kegagalan kultur jaringan. Sterilisasi dilakukan terhadap ruangan, peralatan, media tanam, bahan tanam, serta personil pelaksana.

Sterilisasi Ruang Kultur dan Transfer

Sterilisasi ruang kultur yang paling baik adalah dilakukan dengan penggunaan sinar ultraviolet (UV). Waktu sterilisasi bervariasi tergantung dari ukuran ruang transfer itu sendiri dan harus dilakukan apabila tidak ada kegiatan dalam ruang tersebut. Radiasi UV sangat berbahaya bagi mata dan kulit. Ruang transfer dapat juga disterilisasi dengan mencuci/mengepel 1-2 kali setiap bulan dengan bahan anti jamur (fungisida) komersial.

Ruang kerja dalam laminar flow biasanya sudah dilengkapi dengan lampu UV, sehingga sterilisasinya dilakukan dengan UV dan diikuti dengan membasuh/melap permukaan tempat bekerja dalam laminar. Langkah kerja penggunaan air flow cabinet adalah sebagai berikut:

- Satu malam sebelum lat digunakan, nyalakan lampu UV untuk mensterilkan bagian dalam air flow cabinet, dan minimalisasi kontaminasi yang disebabkan oleh mikroba.

- Pagi hari, lampu UV dimatikan (jangan lupa mematikan lampu UV, apabila lampu UV menyala pada saat bekerja maka operator dalam kondisi berbahaya karena dapat terkontaminasi radiasi UV yang dapat mengakibatkan iritasi kulit dan selaput mata serta gangguan reproduksi.
- Setelah lampu UV dimatikan, bagian dalam laminar didesinfeksi dengan alkohol 70% dan laminar siap digunakan.

Ruang kultur harus dibersihkan dengan sabun kemudian dilap dengan Na-hypoklorit 2% (merek komersial seperti Sunclin, Bayclin atau pembersih lantai lain yang mengandung disinfektan) atau alkohol 95%. Lantai ruangan dan dinding harus dibersihkan seminggu sekali dengan bahan yang sama.

Sterilisasi Alat-alat

Sebelum mengerjakan kegiatan semua peralatan dalam laboratorium harus disterilisasi. Cara untuk sterilisasi peralatan adalah alat-alat terbuat dari stainless steel dibungkus menggunakan kertas merang sedangkan untuk botol tidak perlu dibungkus kemudian masukkan dalam otoklaf. Temperature yang digunakan untuk sterilisasi adalah 121°C pada tekanan 17,5 psi selama total 1 jam. Penghitungan waktu sterilisasi dimulai setelah tekanan yang diinginkan tercapai. Sterilisasi dengan menggunakan

autoclave tidak disarankan untuk bahan yang terbuat dari metal karena akan menyebabkan karat.

Autoclave adalah metoda sterilisasi dengan menggunakan tekanan uap air. Bahan-bahan atau alat yang dapat disterilisasi dengan cara autoclave ini antara lain kapas penutup tabung, saringan dari nylon, pakaian lab, tutup plastik, peralatan gelas, pipet, air, dan media kultur. Hampir semua mikroba dapat mati bila diautoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15-20 menit

Macam-macam otoklaf berupa sederhana (manual) dan yang dapat deprogram (programmable). Otoklaf yang sederhana menggunakan sumber uap dari pemanasan air yang ditambahkan ke dalam otoklaf, pemanasan airnya menggunakan kompor. Otoklaf programmable menggunakan sumber energi dari listrik yang dilengkapi dengan timer dan thermostat.

Peralatan yang terbuat dari metal, gelas, aluminium foil, dll., dapat disterilisasi dengan cara pengeringan dalam oven pada suhu 130°C - 170°C selama 2-4 jam. Semua peralatan tersebut harus dibungkus sebelum di oven, tetapi jangan menggunakan kertas karena akan akan terdekomposisi pada suhu 170°C .

Untuk peralatan diseksi yang akan digunakan pada ruang transfer atau laminar, setelah disterilisasi dalam oven harus direndam dahulu dalam alkohol 96% kemudian

dibakar di atas lampu bunsen. Teknik ini disebut sterilisasi pembakaran (flame sterilization). Teknik ini harus dilakukan dengan ekstra hati-hati karena alkohol sangat mudah terbakar.

Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dapat dilakukan atau dilaksanakan dengan dua cara yaitu secara mekanik dan secara kimia.

a. Sterilisasi eksplan secara mekanis

Cara ini digunakan untuk eksplan yang keras atau berdaging, yaitu dengan membakar eksplan tersebut di atas lampu spiritus sebanyak tiga kali. Eksplan keras yang disterilkan dengan cara ini adalah tebu, biji salak, buah angrek, kapulaga dan sebagainya.

a. Sterilisasi eksplan dengan cara kimiawi

Sterilisasi secara kimiawi digunakan untuk eksplan yang lunak seperti daun, tangkai daun, dan sebagainya. Bahan kimia yang sering dipakai untuk disinfestasi adalah alkohol seperti etil, metil, atau isopropyl-alkohol dengan konsentrasi 70-80%, Ca-hipoklorit atau Na-hipoklorit (Tabel 5.1). Satu hal yang penting dalam sterilisasi permukaan eksplan adalah mengkompromikan antara usaha untuk mendapatkan eksplan yang steril dan menjaga agar jaringan eksplan tidak rusak akibat tingginya konsentrasi disinfektan.

Tahapan Sterilisasi Bahan Tanam

Mendapatkan bahan tanaman yang steril merupakan hal yang sulit. Meskipun bermacam tindakan pencegahan sudah dilakukan, 95% kultur akan mengalami kontaminasi apabila eksplan tidak didisinfeksi. Organ atau jaringan tanaman harus disterilisasi dengan larutan disinfektan, karena sebagai bahan biologis tidak dapat dilakukan dengan cara pemanasan yang ekstrim.

Tabel 5.1 Bahan untuk Sterilisasi dan Fungsinya

No.	Nama Bahan	Konsentrasi	Fungsi
1	Deterjen		Membersihkan kotoran / debu pada eksplan
2	Fungisida		Membersihkan jamur atau cendawan
3	Bakterisida		Membersihkan bakteri
4	Alkohol	70%; 90%	Desinfektan
5	Sodium hipoklorit (clorox atau bayclin)		Desinfektan
6	Mercury chlorit (sublima)	0,05%	Desinfektan
7	Tween-20		Agen pembasah
8	Antibiotik		Desinfektan
9	Iodine / Betadine		Antiseptik

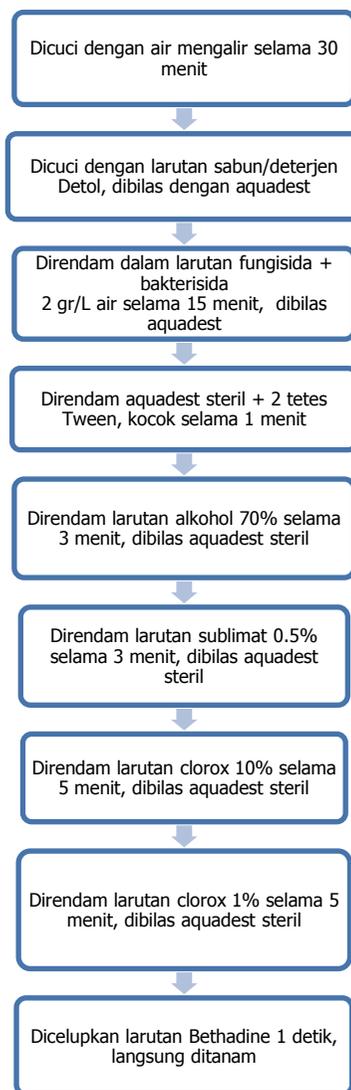
Tidak ada metoda yang baku untuk sterilisasi eksplan, sehingga waktu perendaman dalam larutan disinfektan merupakan kisaran karena tergantung pada

jenis bahan dan tanaman yang akan disterilisasi. Larutan yang digunakan harus yang aman bagi jaringan/eksplan tetapi bersifat dapat membunuh kontaminan baik bakteri maupun jamur. Untuk tanaman berkayu, umbi dll. biasanya sebelum disterilisasi dengan larutan disinfektan harus dibersihkan dahulu dengan sabun dan dibilas dengan air mengalir, tetapi tidak untuk tanaman jenis herbaceous. Semua permukaan eksplan yang disteriliasi harus terendam dalam sterilan, dan setelahnya harus dibilas dengan akuades steril sekurang-kurangnya tiga kali.

Setelah pengambilan eksplan, metode kultur jaringan dilakukan di laboratorium sehingga perlu adanya sterilisasi agar eksplan tidak terkontaminasi jamur atau bakteri dari lapangan. Langkah-langkah sterilisasi sebagai berikut :

- a. Mengambil eksplan krisan dari lapangan berupa ujung tanaman kira-kira 2-3 ruas, bersihkan dengan air mengalir selama 5-10 menit untuk membersihkan debu-debu dari lapangan.
- b. Memotong tiap ruas dengan sebagian daun dirompes kemudian mencuci dengan detergen cair untuk menghilangkan kotoran pada permukaan tetapi tidak merusak permukaan sel, kemudian bilas sampai bersih menggunakan aquades.

- c. Mengocok dalam larutan alkohol 10% selama 2-3 menit, kemudian membilasnya sampai bersih menggunakan aquades.
- d. Menyiapkan larutan fungisida dan bakterisida pada masing-masing 2-5 g/l yang sebelumnya distirer agar homogen.
- e. Setelah homogen, masukkan eksplan dalam larutan tersebut, "shaker" atau kocok dengan kecepatan ringan selama 30-45 menit kemudian membilasnya sampai bersih menggunakan aquades. Setelah tahap ini selesai, pekerjaan tahap berikutnya berada di dalam Laminar Air Flow (LAF).
- f. Mengocok eksplan dengan tween 20 sebanyak 2-3 tetes selama 2-3 menit. Tween merupakan surfaktan atau penurun tegangan permukaan sel sehingga bahan-bahan steril menjadi aktif mematikan penyebab kontaminasi, kemudian membilasnya sampai bersih menggunakan aquades.
- g. Mengocok dalam larutan chlorox 5% selama 3-5 menit, dilanjutkan dengan chlorox 10% selama 3-5 menit kemudian membilasnya sampai bersih.
- h. Meniriskan eksplan, kemudian eksplan siap ditanam.



Gambar 5.1 Bagan Tahapan Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi Media

Ada dua metoda untuk sterilisasi media yang umum digunakan, yaitu dengan autoclave dan filter membran. Media kultur, air destilasi dan campuran yang stabil dapat disterilisasi dalam autoclave dengan menggunakan wadah yang ditutup dengan kapas, aluminium foil atau plastik. Akan tetapi, larutan dari bahan-bahan yang bersifat tidak stabil (heat-labile) harus menggunakan filter. Umumnya media diautoclave pada tekanan 15 psi dengan suhu 121 °C. Untuk volume larutan per wadah yang sedikit (< 100 ml), waktu yang dibutuhkan adalah 15-20 menit, tetapi untuk jumlah yang besar (2-4 liter) selama 30-40 menit. Tekanan jangan melebihi dari 20 psi karena dapat mengakibatkan dekomposisi karbohidrat dan bahan lain dalam media yang bersifat thermolabile.

Beberapa senyawa yang tergolong dalam kelompok protein, vitamin, asam amino, ekstrak tanama, hormon dan karbohidrat ada yang bersifat thermolabile yang mungkin akan mengakibatkan dekomposisi bila disterilisasi dengan autoclave, sehingga harus disterilisasi dengan filter. Filter Millipore yang mempunyai porositas ± 0.2 mikron (μm) merupakan salah satu filter yang banyak digunakan untuk sterilisasi bahan yang bersifat thermolabile.

Media yang sebagian mengandung komponen thermolabile, dapat dibuat dengan cara: (i) larutan yang mengandung komponen heat-stable disterilisasi dengan

autoclave, kemudian didinginkan sampai suhu 50o-60oC pada kondisi steril (biasanya dalam laminar), (ii) pada bagian lain dalam kondisi yang steril, larutan yang mengandung komponen bersifat thermolabile disterilisasi dengan filter, (iii) kedua larutan yang sudah disterilisasi dengan metoda yang berbeda tersebut digabungkan dalam kondisi aseptik.



a. Perendaman di dalam larutan deterjen



b. Perendaman di dalam larutan pestisida

Gambar 5.2 Sterilisasi Eksplan

VI. MEDIA TANAM

Untuk membuat media kultur jaringan, biasanya menimbang setiap komponen bahan kimia yang terdapat pada resep media dasar. Pembuatan media pada prinsipnya juga dilakukan dengan melarutkan semua komponen media dalam air, sesuai dengan konsentrasinya pada formulasi yang diinginkan. Namun, penimbangan satu per satu komponen media untuk setiap pembuatan media kultur adalah tidak praktis, dan hanya dapat dilakukan jika jumlah zatnya cukup besar untuk ditimbang. Selain itu akan memakan banyak waktu dan mengurangi ketepatan. Kadang-kadang pula timbangan yang dibutuhkan untuk menimbang sejumlah kecil bahan tidak tersedia dalam laboratorium. Kendala ini dapat diatasi dengan membuat larutan stok terlebih dahulu.

Larutan stok adalah larutan yang berisi satu atau lebih komponen media yang konsentrasinya lebih tinggi daripada konsentrasi komponen tersebut dalam formulasi media yang akan dibuat. Larutan stok dalam media kultur jaringan dikelompokkan dalam: stok makro, stok mikro, stok Fe, stok vitamin dan stok hormon. Larutan stok bisa dibuat dengan konsentrasi 10, 100, atau bahkan 1000 kali lebih pekat. Larutan stok sebaiknya disimpan dalam ruang gelap dan bersuhu rendah, karena ada beberapa bahan yang tidak tahan suhu tinggi dan cahaya. Stok vitamin

tidak dapat disimpan terlalu lama, bisa dibuat untuk digunakan dalam 1 – 2 minggu. Stok hormon dapat disimpan antara 2 – 4 minggu, sedangkan stok hara dapat disimpan 4 – 3 minggu. Larutan stok yang sudah tersimpan lama biasanya mengendap dan ditumbuhi mikroorganisme. Larutan yang sudah terkontaminasi mikroorganisme ini sudah tidak dapat digunakan lagi. Oleh sebab itu kondisi tempat simpan dan wadah larutan harus diusahakan sesteril mungkin. Dengan adanya larutan stok, pembuatan media selanjutnya dilakukan hanya dengan teknik pengenceran dan pencampuran saja.

Jika seluruh larutan stok yang dibutuhkan sudah dibuat, gula dan pematat medianya ditimbang sesuai kebutuhan, kita dapat meracik dan membuat media. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat-alat dan bahan-bahan yang akan digunakan, yaitu: a) Alat : timbangan analitik, tabung erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala, pipet, ball pipet, pengaduk kaca, stirer, kompor gas atau hot plate, pH meter atau kertas pH, botol media. b) Bahan: komponen media dalam bentuk larutan stok, maupun bahan yang sudah ditimbang seperti gula dan pematat (agar), plastik tahan panas penutup botol, karet gelang, atau aluminium foil.

2. Mencampurkan larutan stok hara makro, mikro, Fe-chelat, vitamin dan hormon sesuai kebutuhan ke dalam erlenmeyer sambil digoyangkan agar larutan dapat homogen.
3. Menambahkan gula dalam larutan media tersebut kemudian menara larutan tersebut dengan aquades steril dengan menggunakan gelas ukur sesuai volume media yang dibutuhkan kemudian mengaduknya dengan stirer hingga semua bahan tercampur dengan sempurna
4. Melakukan pengukuran pH. (pastikan pH meter sudah dilakibrasi terlebih dahulu). Kadar pH yang dibutuhkan adalah 5,8. Bila pH masih dibawah 5,8 maka perlu ditambahkan beberapa tetes NaOH atau KOH sampai mencapai kadar pH yang diinginkan (pH 5,8). Tetapi jika kadar pH terlalu tinggi atau lebih dari 5,8 maka perlu ditambahkan beberapa tetes HCl sampai kadar pH 5,8.
5. Memasukkan pematat media (agar 7gr/L atau gelrite 2gr/L) ke dalam larutan media. Setelah itu media dapat langsung dipanaskan dengan menggunakan hotplate atau dipanaskan di atas kompor gas. Selama pemanasan berlangsung, hendaknya larutan media tersebut diaduk terus-menerus hinga pematat medianya terlarut seluruhnya. Pemanasan dihentikan sampai larutan

terlihat bening dan mulai terlihat gelembung-gelembung udara

6. Setelah larut, menuangkan media tersebut ke dalam botol-botol media yang telah dipersiapkan sesuai kebutuhan tergantung besar kecilnya botol. Kemudian menutup botol yang sudah terisi media dengan menggunakan plastik tahan panas atau aluminium foil. Diusahakan supaya botol benar-benar tertutup rapat.
7. Memasukkan botol-botol tersebut ke dalam autoclaf dan disterilisasi dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 kg/cm² selama 20-30 menit.
8. Menyimpan media yang sudah disterilisasi di dalam ruang penyimpanan media ber-AC (suhu 24 - 26°C) selama 3 hari sebelum digunakan untuk memastikan bahwa media tersebut tidak terkontaminasi.

Media Murashige & Skoog (Media MS)

Salah satu medium yang banyak dipakai, terutama untuk tanaman-tanaman herba adalah medium dasar Murashige dan Skoog (medium MS). Media MS mengandung konsentrasi garam mineral yang tinggi dan senyawa N dalam bentuk NO₃⁻ dan NH₄⁺. Konsentrasi sukrose dan agar yang ditambahkan di dalam media juga akan bervariasi tergantung kebutuhan eksplan. Untuk satu liter media MS biasanya digunakan 30 gram sukrose dan 8

gram agar. Konsentrasi agar dapat bervariasi tergantung media yang diinginkan berupa media padat (solid), semi-solid atau cair

Sebelum membuat media MS, terlebih dahulu disiapkan larutan stok : a. mikronutrient b. vitamin c. iron d. hormon e. makro

Larutan Stok Mikronutrient 500 ml (100 kali konsentrasi)

1. Timbang bahan-bahan kimia yang tersebut di bawah ini dengan timbangan analitik. $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2230 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 860 mg H_3BO_3 620 mg KI 83 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg a. Masukkan bahan-bahan kimia yang telah ditimbang satu per satu ke dalam Erlenmeyer 500 ml yang telah berisi akuadest steril 300 ml. Setiap kali memasukkan bahan kimia harus segera diaduk/dilarutkan. Setelah larut, bahan kimia berikutnya dimasukkan. Cara memasukkan seperti ini untuk menghindari terjadinya endapan. Pengadukan dapat dilakukan dengan menggunakan pengaduk magnetik
2. Setelah semua bahan kimia masuk, dan larut, tambahkan akuadest sampai volume larutan menjadi 500 ml. Tutup gelas Erlenmeyer yang berisi larutan mikronutrient. Beri label : MIKRO, MS 100 x, 5 ml / l Artinya untuk membuat 1 liter medium MS, diperlukan 5 ml larutan mikronutrient stok.

Larutan Stok Vitamin 200 ml (50 kali konsentrasi)

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

Larutan Stok Iron (besi) 200 ml (40 kali konsentrasi)

1. Timbang 1492 mg Na₂EDTA dan 1112 mg Fe₂SO₄.7H₂O
2. Larutkan masing-masing bahan tersebut di atas pada Erlenmeyer 200 ml yang terpisah, yang masing-masing berisi 75 ml.
3. Jika bahan-bahan tersebut sukar larut, tambahkan beberapa tetes HCl, lalu panaskan

4. Setelah larut, campur kedua macam larutan bahan tersebut ke dalam satu Erlenmeyer
5. Biarkan dingin pada suhu kamar
6. Tambahkan akuadest sampai volume menjadi 200 ml
7. Tutup rapat dan beri label : IRON, MS 40, x 5 ml / l (Artinya : untuk membuat 1 liter medium MS, diperlukan 5 ml stok).

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

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

Larutan Stok Makronutrien 200 ml (20 kali konsentrasi)

1. Timbang bahan-bahan kimia yang tersebut di bawah ini dengan timbangan analitik. NH_4NO_3 33000 mg KNO_3

38000 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8800 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7400 mg KH_2PO_4 3400 mg

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

Membuat Media Murashige & Skoog (Media MS)

1. Siapkan erlenmeyer 1000 ml yang telah diisi dengan 500 ml akuadest,
2. Tambahkan 10 ml larutan stok makronutrient, aduk merata menggunakan magnetic stirrer
3. Kemudian tambahkan satu per satu, larutan stok hara mikro, vitamin, iron (besi), vitamin, dan myo-inositol.

4. Masukkan ZPT jika dibutuhkan. Volume yang digunakan disesuaikan dengan kebutuhan dan stok ZPT yang telah dibuat
5. Masukkan sucrose atau dapat diganti dengan gula pasir sebanyak 30 gram per liter media MS
6. Ukur pH larutan dan sesuaikan pH nya sehingga berada pada pH 5.7-5.8. Jika terlalu basa ditambah dengan HCl dan jika terlalu asam maka ditambah larutan NaOH.
7. ukur lagi larutan tersebut sehingga mencapai 1 liter dan dikembalikan ke dalam beaker atau Erlenmeyer
8. Tambahkan agar 8 gram untuk 1 liter media (media solid) dan aduk serta panasi media hingga mendidih menggunakan magnetic stirrer.
9. Tuang ke dalam botol kultur secukupnya. Kemudian tutup dengan alumunium foil /plastic dan beri label (MS).
10. Sterilisasi dalam autoclaf dengan temperatur 121 °C selama 15 menit.

Preparasi Medium Agar Kosong

- a. Timbang agar sebanyak 4 gram, masukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi aquadest 500 ml
- b. Panaskan pada kompor sampai agar-agar larut dan larutan mendidih
- c. Masukkan dalam botol jam yang tinggi secukupnya, beri label pada masing-masing botol

d. Sterilisasi dalam autoclave dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

Perhitungan Pengambilan Zat Pengatur Tumbuh

Jika label pada botol ZPT adalah 1000 ppm tetapi diinginkan hanya 5 ppm dalam 250 ml media MS, maka perhitungan menggunakan rumus :

$$C1V1 = C2V2$$

dimana C1 = konsentrasi stok ZPT = 1000 ppm

V1= Volume perlu diambil = ?

C2 = Konsentrasi ZPT yang diinginkan = 5ppm

V2 = Volume media yang akan dibuat

$$\text{Maka } C1V1 = C2V2 \quad 1000 \times V1$$

$$= 5 \times 250 \quad V1 = 1250 / 1000 = 1.25 \text{ ml}$$

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



Gambar 6.1 Persiapan media

VII. BAHAN TANAM

Penanganan Tanaman Induk

Sebelum melakukan kultur jaringan untuk suatu tanaman, kegiatan yang pertama harus dilakukan adalah memilih bahan induk yang akan diperbanyak. Tanaman tersebut harus jelas jenis, spesies, dan varietasnya serta harus sehat dan bebas dari hama dan penyakit. Tanaman indukan sumber eksplan tersebut dikondisikan dan dipersiapkan secara khusus agar eksplan yang akan dikulturkan sehat dan dapat tumbuh baik serta bebas dari sumber kontaminan pada waktu dikulturkan secara in-vitro.

Lingkungan tanaman induk yang lebih higienis dan bersih dapat meningkatkan kualitas eksplan. Tanaman sumber eksplan sebaiknya dikondisikan di rumah kaca atau rumah plastik dengan pemeliharaan rutin yang harus dilakukan meliputi: pemangkasan, pemupukan, dan penyemprotan dengan pestisida (fungisida, bakterisida, dan insektisida), sehingga tunas baru yang tumbuh menjadi lebih sehat dan dan bersih dari kontaminan.

Pengaturan lingkungan tanaman yang bersih dan higienis, perubahan status fisiologi tanaman induk sumber eksplan kadang-kadang perlu dilakukan seperti memanipulasi parameter cahaya, suhu, dan zat pengatur tumbuh. Manipulasi tersebut bisa dilakukan dengan

mengondisikan tanaman induk dengan fotoperiodisitas dan temperatur tertentu untuk mengatasi dormansi serta penambahan ZPT seperti sitokinin untuk merangsang tumbuhnya mata tunas baru dan untuk meningkatkan reaktivitas eksplan pada tahap inisiasi kultur.

Untuk meminimalkan tingkat kontaminasi dan mendapatkan pertumbuhan eksplan yang cepat, beberapa perlakuan (treatment) terhadap tanaman induk sumber eksplan dapat diterapkan sebagai berikut:

1. Pemeliharaan tanaman induk di rumah kaca dengan pengendalian hama dan penyakit tanaman secara intensif.
2. Pemangkasan tanaman induk diikuti pemupukan yang seimbang. Flush atau trubusan baru yang tumbuh setelah pemangkasan digunakan sebagai eksplan. Flush yang tumbuh tersebut sebaiknya disemrot dengan fungisida sistemik (Benlate) dan bakterisida (Agrept) agar tumbuhnya lebih sehat.
3. Perlakuan tanaman induk dengan temperatur tertentu seperti suhu rendah (4°C) atau suhu tinggi (35°C).
4. Perlakuan tanaman induk dengan ZPT seperti sitokinin atau giberelin. Sitokinin untuk merangsang tumbuhnya tunas-tunas aksilar, sedangkan giberelin untuk merangsang pemanjangan tunas.
5. Isolasi tanaman induk

Pemeliharaan tanaman induk dalam keadaan yang lebih higienis yaitu dengan menumbuhkannya di dalam rumah kaca dengan pengendalian hama dan penyakit tanaman yang intensif membuktikan dapat mengurangi tingkat kontaminasi eksplan yang diambil dari tanaman tersebut, terutama yang disebabkan oleh cendawan. Namun, cara ini sulit diterapkan untuk kontaminasi yang disebabkan oleh mikroorganisme endofilik, terutama bakteri.

Pemilihan Bahan Tanam (Eksplan)

Eksplan adalah bagian kecil jaringan atau organ yang diambil atau dipisahkan dari tanaman induk yang akan dikulturkan. Tanaman yang dijadikan sumber eksplan harus dari tanaman yang sehat, tumbuh baik atau normal dan tentunya memiliki sifat-sifat unggul. Adanya perubahan suhu, cahaya, musim serta kelembaban terhadap induk sangat mempengaruhi keberhasilan perkembangan bahan eksplan. Selain itu tanaman induk harus cukup unsur hara, lama penyinaran dan intensitas cahaya serta hormon tumbuh atau dengan kata lain pertumbuhannya harus optimum.

Bagian tanaman yang dapat dijadikan bahan eksplan adalah ujung akar (kaliptra), pucuk, daun, bunga, buah muda dan tepung sari. Selain itu faktor yang dimiliki bahan eksplan itu sendiri yaitu ukuran eksplan, umur fisiologis,

sumber genotif dan sterilitas eksplan menentukan berhasil atau tidaknya kulturisasi eksplan. Ukuran eksplan yang kecil umumnya mempunyai daya tahan yang kurang baik dibandingkan dengan eksplan yang ukurannya lebih besar. Ukuran eksplan yang baik adalah antara 0,5 hingga 1 cm, kendatipun demikian, hal ini tidaklah mutlak pada semua eksplan, melainkan tergantung pada material tanaman yang dipakai serta jenis tanamannya.

Umur fisiologis eksplan terpengaruh terhadap kemampuannya untuk beregenerasi. Jaringan tanaman yang masih muda dan bersifat meristematik (sel-selnya masih aktif membelah) lebih mudah beregenerasi dibandingkan dengan jaringan yang sudah tua. Oleh karena itu bagian tanaman yang meristematik tingkat keberhasilan pengkulturannya lebih tinggi apabila dijadikan sebagai bahan eksplan. Bagian tanaman yang termasuk jaringan meristematik adalah pucuk apikal, pucuk lateral dan pucuk aksial. Pucuk aksial adalah pucuk dari tunas atau cabang aksial yang muncul pada ketiak daun, pucuk apikal adalah pucuk utama pada batang terminal yang mengarah ke atas dan pucuk lateral adalah pucuk yang muncul pada percabangan.

Bahan eksplan dapat diambil dari tanaman dewasa yaitu pada bagian pucuk tanaman, daun atau umbi bahkan bijinya. Bahan eksplan dari daun dipilih daun yang tidak terlalu muda dan juga tidak terlalu tua. Pematangan

eksplan dilakukan dengan mengikutkan ibu tulang daun karena pada bagian ini lebih cepat tumbuh menjadi kalus. Apabila bahan eksplan berasal dari umbi biasanya umbi ditumbuhkan terlebih dahulu tunasnya. Bagian tunas yang tumbuh dari umbi tersebut kemudian dijadikan sebagai bahan eksplan, contohnya umbi batang tanaman kentang, umbi batang tanaman talas dan umbi lapis bawang merah.

Biji dapat dijadikan sebagai eksplan dan sebaiknya dipilih biji yang bersertifikat atau dipetik langsung dari tanaman induknya yang sudah diketahui keunggulan fenotif dan genotifnya. Bagian-bagian biji, seperti embrio atau kotiledon dapat dijadikan sbagai bahan eksplan, misalnya pada tanaman jagung, kedelai, jarak, paprika dan lain-lain. Biji juga dapat langsung ditanam atau dikecambahkan pada media agar-agar, contohnya pada kasus biji anggrek yang tidak memiliki cadangan makanan.

Pemilihan suatu bagian tanaman sebagai bahan eksplan juga harus mempertimbangkan faktor kemudahan bahan eksplan tersebut untuk beregenerasi dan kemungkinan tingkat kontaminasinya. Bagian tanaman yang mengandung banyak persediaan makanan serta bahan-bahan lain untuk pertumbuhan, seperti umbi lebih mudah untuk beregenerasi dibandingkan dengan bagian tanaman yang kurang mengandung bahan makanan. Bagian tanaman yang berasal dari akar yang tumbuh di dalam tanah tingkat kontaminasinya lebih tinggi

dibandingkan dengan bagian-bagian tanaman yang ada di atas permukaan tanah seperti pucuk atau daun serta biji. Tanaman yang cenderung bergetah juga memiliki tingkat kontaminasi lebih tinggi daripada yang tidak memiliki getah.

Dalam perbanyakan tanaman secara kultur jaringan, ada beberapa faktor penting dalam persiapan eksplan yang dapat mempengaruhi keberhasilan, yaitu umur fisiologis (umur tanaman yang akan digunakan), ukuran eksplan, serta bagian tanaman yang diambil.

a. Umur tanaman yang digunakan (umur fisiologis).

Umumnya, bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah jaringan muda yang sedang tumbuh aktif. Jaringan tanaman yang masih muda mempunyai daya regenerasi lebih tinggi, sel-selnya masih aktif membelah diri, dan relatif lebih bersih (mengandung lebih sedikit kontaminan). Sementara itu jaringan tanaman yang sudah tua lebih sulit beregenerasi, dan biasanya mengandung lebih banyak kontaminan.

Bagian tanaman yang dapat dipergunakan sebagai eksplan adalah biji atau bagian-bagian biji (embrio atau kotiledon), tunas pucuk, potongan batang suatu buku, potongan akar, potongan daun, potongan umbi batang, umbi akar, empulur batang, bagian bunga. Contoh pada tanaman jati yang

diambil adalah trubusan tunas yang baru tumbuh, sedangkan pada pisang adalah bagian bonggol.

b. Ukuran eksplan yang digunakan.

Ukuran sangat berpengaruh terhadap kultur jaringan karena eksplan yang berukuran besar beresiko terkontaminasi lebih tinggi dibanding yang lebih kecil tetapi kemampuan hidupnya lebih besar dan tumbuhnya cepat dan sebaliknya. Selain itu ketika akan melakukan kultur jaringan ini diusahakan untuk seragam. Apabila kuncup bunga yang dipakai maka semua harus kuncup yang sama. Jika eksplan yang dipakai / digunakan jumlahnya terbatas dan terserang bakteri maka eksplan harus ditumbuhkan terlebih dahulu kemudian puncuknya dipotong dengan hati-hati sebagai eksplan baru. Jika kultur masih terkontaminasi maka ditumbuhkan lagi sampai tidak terkontaminasi.



Gambar 7.1 Pengambilan bahan tanam

Inisiasi

Inisiasi adalah pengambilan eksplan atau bahan tanam dari bagian tanaman indukan untuk kemudian dikulturkan. Bagian tanaman yang sering digunakan untuk kegiatan kultur jaringan adalah tunas, ujung akar, bunga, serbuk sari, batang.



Gambar 7.2 Eksplan atau bahan tanam



Gambar 7.3 Persiapan bahan tanam di dalam LAF

VIII. PENANAMAN

Penanaman / Induksi (tahap 1) (kultur aseptik)

Eksplan atau kultur dapat terkontaminasi oleh berbagai mikroorganisme seperti jamur, bakteri, serangga atau virus. Organisme tersebut secara universal terdapat pada jaringan tanaman. Kondisi *in vitro* yang disukai eksplan, yaitu mengandung sukrosa dan hara dalam konsentrasi tinggi, kelembaban tinggi dan suhu yang hangat, juga disukai mikroorganisme yang seringkali tumbuh dan berkembang sangat cepat, mengalahkan pertumbuhan eksplan.

Jika permukaan tanaman ditutupi oleh rambut atau sisik, perhatian mesti diberikan untuk memastikan penetrasi bahan kimia, karena kontak dengan organisme sangat penting untuk sterilisasi. Ini biasanya dicapai dengan menambahkan detergen, digoyang, atau membenamkan eksplan dengan sedikit tekanan untuk menghilangkan gelembung udara yang mungkin mengandung mikroorganisme.

Setelah tahap penanaman eksplan (gambar 3a), 1-1,5 bulan kemudian akan muncul tunas dari ketiak (gambar 3b). Tanaman yang tumbuh pada kondisi *in vitro* dikenal dengan istilah "planlet". Apabila sudah tunas tumbuh tinggi dengan 4-5 daun tiap nodus maka planlet siap untuk disubkultur.

Subkultur

Subkultur adalah proses pemotongan dan pemindahan planlet dari media lama ke media baru. Pada planlet krisan, subkultur menggunakan 1 daun tiap nodusnya (gambar 3c) subkultur hasil dari pertumbuhan tunas pertama dari eksplan merupakan subkultur pertama. Setelah 1-1,5 bulan kemudian tergantung dari genetik varietas krisan, planlet subkultur pertama akan tumbuh sekitar 5 nodus (gambar 3d), pada saat ini sudah siap untuk disubkultur menjadi subkultur kedua (gambar 3e) begitu selanjutnya sampai maksimal subkultur ke 5 untuk terakhir aklimatisasi. Pembatasan sampai subkultur ke 5 untuk menjaga kualitas dan degenerasi planlet.

Multiplikasi (tahap perbanyak tanaman)

Jika kultur aseptik telah berhasil diperoleh, tujuan berikutnya adalah untuk menginduksi multiplikasi. Pada beberapa spesies, eksplan mungkin akan membentuk akar pada tahap awal pertumbuhan di media yang sederhana. Spesies lain menghasilkan banyak tunas tanpa perlakuan khusus. Dalam hal ini, kebutuhan akan media yang lebih kompleks tergantung pada tingkat multiplikasi yang diperoleh atau diperlukan. Multiplikasi tunas dapat diperoleh dengan beberapa cara.

1. Ujung tunas yang sudah ada akan memanjang menghasilkan ruas dan buku baru yang nantinya dapat dipotong lagi
2. Tunas lateral yang ada pada eksplan akan menghasilkan tunas yang selanjutnya akan menghasilkan tunas baru. Seringkali tunas lateral ini sulit dilihat dengan mata telanjang, tapi sebagian besar titik tumbuh daun (leaf axil) mengandung banyak calon tunas
3. Perkembangan tunas adventif. Pada banyak spesies, organ tanaman seperti akar, tunas, atau umbi dapat diinduksi untuk membentuk jaringan yang biasanya tidak dihasilkan pada organ ini. Organogenesis adventif seperti ini lebih berpotensi dibandingkan induksi tunas aksilar untuk memperbanyak klonal tanaman.
4. Somatik embryogenesis. Potensi terbesar multiplikasi klon adalah melalui somatic embryogenesis, dimana 1 sel dapat menghasilkan 1 embrio dan menjadi tanaman lengkap. Somatic embryogenesis dapat terjadi pada kultur suspensi atau kadang terjadi pada kalus.

Media yang digunakan untuk memperbanyak krisan secara *in vitro* dalam skala penelitian menggunakan $\frac{1}{2}$ MS+0,1 mg/l IAA. IAA adalah golongan auksin yang berfungsi menstimulasi akar sehingga perakaran kuat saat diaklimatisasi. Penggunaan media MS dirasa mahal apalagi untuk skala rumah tangga, alternative penggunaan bahan lainnya menggunakan pupuk majemuk dengan N:P:K

seimbang 1-3 g/l atau penggunaan bahan kimia teknis yang dikombinasikan dengan bahan organik seperti air kelapa sampai 50%. Media yang digunakan selalu dibuat \pm 3 hari setelah disterilisasi untuk menyeleksi media yang bersih dari kontaminasi.

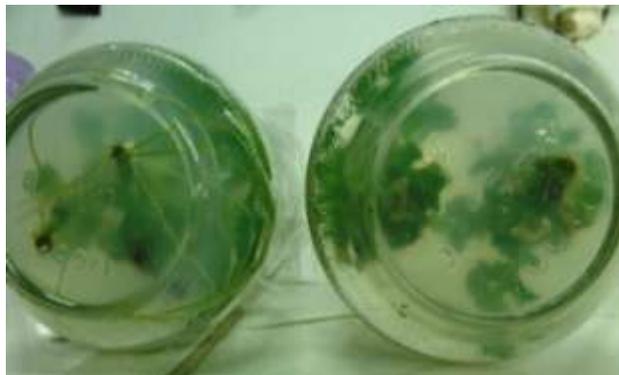
Pengakaran

Persiapan plantlet untuk ditanam di tanah, perakaran plantlet harus cukup mendukung. Jika banyak tunas sudah dihasilkan, tahap selanjutnya adalah inisiasi akar in vitro. Cara mudah dan praktis adalah dengan mengakarakan stek mikro di luar kultur, terutama untuk spesies yang mudah berakar. Ini tidak memerlukan media baru dan perlunya bekerja pada kondisi aseptik. Kelembaban tinggi diperlukan untuk menghindari kekeringan tunas baru yang masih lunak. Stek mikro dapat diberi perlakuan hormon (tepung auksin atau pencelupan pada larutan auksin) seperti pada stek biasa.



Gambar 8.1 Plantlet belum berakar

Keuntungan lain pengakaran di luar kultur adalah tipe akar yang dihasilkan lebih beradaptasi pada lingkungan luar/tanah. Stek mikro yang diakarkan pada media kultur biasanya memiliki morfologi yang beradaptasi pada air dan bukan pada tanah, sehingga kadang tidak berfungsi normal saat dipindah ke lapang. Jika mengakarkan pada media kultur, auksin diperlukan untuk menginduksi pembentukan akar. Sitokinin biasanya menghambat pembentukan akar.



Gambar 8.2 Plant telah berakar (kiri) dan plantlet belum berakar (kanan)

IX. AKLIMATISASI

Tahap terakhir dari kegiatan perbanyakan dalam kultur jaringan adalah aklimatisasi yaitu proses pemindahan dan penyesuaian dari "in vitro" (dalam botol) ke kondisi "in vivo" (lapangan). Planlet dikeluarkan dari dalam botol dengan cara mengalirkan air mengalir kemudian media digoyang-goyangkan sampai agar terlepas dari botol kemudian planlet dibersihkan dari media agar secara hati-hati agar akar tidak banyak yang terputus.

Setelah dikeluarkan dari botol kultur dan dibersihkan dari media agar, sebelum ditanam dilakukan pencelupan dengan menggunakan larutan fungisida dan bakterisida masing-masing 1 g/l selama kurang lebih 5 menit. Hal ini bertujuan agar saat ditanam, akar tidak mudah terinfeksi patogen yang terbawa oleh media tanam meskipun media tanam telah disterilisasi.



Gambar 9.1 Planlet siap diaklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan dengan tujuan untuk penyesuaian kondisi lingkungan secara bertahap dari laboratorium ke lapangan, oleh karena itu dikondisikan supaya iklim mikro di sekitar tanaman optimal dan tidak membuat tanaman stress.



Gambar 9.2 Persiapan Ruang Aklimatisasi

Modifikasi lingkungan tersebut dilakukan melalui pembuatan saung plastik yang dilapisi paranet 75% untuk mengurangi intensitas cahaya matahari yang diterima tanaman, akan tetapi proses fotosintesis tetap berlangsung. Membuat instalasi listrik untuk penambahan periode hari panjang pada malam hari selama 4 jam, karena tanaman krisan merupakan tanaman sub tropis membutuhkan pencahayaan yang berkisar antara 13,5-16 jam per hari. Media tanam menggunakan arang sekam

dalam baki persemaian dengan tinggi media 10-12 cm. siram media sampai jenuh dengan larutan fungisida Propamokarb hidroclorida 72 g/l dengan dosis 2-3 cc/l.



Gambar 9.3 Bibit yang diaklimatisasi

Buat larikan untuk mengatur jarak tanam, dengan ukuran 4x4 cm. Tinggi planlet yang akan ditanam berkisar antara 5-6 cm, kemudian tanam planlet dengan posisi tegak dengan cara menekan secara hati-hati media yang ada di sekitar perakaran, kemudian siram planlet dan media tanam dengan air bersih sampai rata. Untuk pemeliharaan dilakukan penyiraman pada pagi dan sore hari (tergantung kondisi cuaca pada hari itu) dengan cara menyemprotkan air bersih pada permukaan daun sampai rata setiap hari selama 2-3 minggu, sedangkan penyiraman media dilakukan sesuai kondisi media. Selanjutnya penyiraman dilakukan melalui media 2-3 kali per minggu.

Untuk pengendalian hama / penyakit dan pemupukan cair dapat dilakukan pada saat tanaman sudah berumur 2 minggu melalui penyemprotan daun. Tanaman sudah dapat dipindahkan ke lapangan pada umur 5-6 minggu setelah diaklimatisasi serta sudah dapat menghasilkan stek pertama setelah berumur 4 minggu setelah tanam.

X. PENANAMAN TANAMAN INDUK DI LAPANGAN

Penanaman tanaman induk dilakukan dengan tujuan untuk menghasilkan setek pucuk berkualitas secara berkelanjutan.

Media Tanam

Persiapan media tanam dilakukan dengan cara mencangkul tanah sedalam 30-40 cm, kemudian dibuat bedengan selebar 1 meter, dengan panjang sesuai kondisi lahan, sedangkan jarak antar bedengan selebar 50-75 cm. Taburkan humus bambu 0,5 m³/100 m² (untuk tanah kering), pupuk kandang sebanyak 1 m³/100 m², Urea 15 g/m², SP36. 20 g/m² dan KCl 35 g/m², sebagai pupuk dasar. Aduk pupuk dasar sampai rata dan rapihkan kembali bedengnya. Siram tanah (media tumbuh) sampai kapasitas lapang setiap hari selama 5-7 hari sebelum tanam. Pada saat hari tanam sebaiknya selokan antar bedengan diairi sampai mengenai permukaan akar, kemudian selokan dikeringkan kembali. Siapkan instalasi listrik sebelum tanam dan pastikan intensitas cahayanya berkisar antara 40-100 Lux pada titik terjauh tanaman, penambahan periode hari panjang tersebut dilakukan sejak tanam hingga akhir masa produksi tanaman induk.

Pemeliharaan Tanaman

Pemberian pupuk susulan dilakukan pada saat tanaman berumur 2 minggu setelah tanam menggunakan pupuk KNO₃ merah yang dilarutkan dengan dosis 2-3 gram/ liter air, dengan volume siram 3-5 liter/m². Sedangkan pengendalian hama dan penyakit dilakukan setiap minggu dengan menggunakan pestisida yang sistemik dan kontak secara bergantian, supaya tidak menimbulkan resistensi hama/penyakit terhadap pestisida. Penyiangan gulma dilakukan 2 minggu sekali atau disesuaikan dengan kondisi di lapangan, sedangkan penyiraman dilakukan 2-3 kali per minggu. Produktivitas tanaman induk berkisar antara 4-5 bulan dengan benih yang dihasilkan berkisar antara 24-32 setek.

Pembuangan Tunas Utama (toping)

Untuk merangsang pertumbuhan setek yang berkualitas perlu dilakukan pembuangan tunas utama (tunas apikal). Pembuangan tunas utama dilakukan pada saat tanaman berumur 2-3 minggu setelah tanam (tergantung genetik tanaman) dengan menyisakan 4-5 daun sempurna dengan harapan dapat menghasilkan setek yang berkualitas, selanjutnya dilakukan pembuangan tunas-tunas bagian bawah yang tidak produktif.

Panen Stek

Panen setek pertama dilakukan umur 2-3 minggu setelah toping/ pincing pertama, sedangkan panen ke-2 dan seterusnya dilakukan setiap minggu secara bergantian antar tunas atau antar tanaman, pilih tunas aksiler yang telah mempunyai 7-8 daun, panen setek sebaiknya dilakukan pada pukul 07.30-10.00, dengan gunting setek yang tajam dan bersih, sisakan 1-2 pasang daun dari tunas aksiler yang diambil pucuknya. Beri label pada setiap varietas yang dipanen, bawa setek segera ke ruang prosesing, kemudian buang beberapa daun pada setek dan sisakan 2-3 daun sempurna, rapikan dan potong celupkan pangkal setek ke dalam serbuk hormon pemacu perakaran segera setelah dipotong, lalu simpan setek di tempat yang teduh dalam keranjang sesaat sebelum diakarkan.

Persiapan Media dan Pengakaran setek

Setelah selesai proses perompesan dan pencelupan setek ke dalam hormone tumbuh, maka setek siap untuk diakarkan. Siapkan dan basahi media tanam, masukkan media ke bak pengakaran setinggi 7-10 cm, kemudian siram media dengan larutan fungisida Propamokarb hidroclorida 72 g/l sampai rata. Ratakan media, buat larikan dengan ukuran 2x2 cm, tanam setek pucuk sedalam 1-2 cm, siram setek dan media tanam dengan air bersih. Selama proses pengakaran perlu ada penambahan periode

hari panjang selama 4 jam per malam. Pengendalian hama dan penyakit serta aplikasi pupuk daun dilakukan pada saat setek sudah berumur 1 minggu di pengakaran.



Gambar 10.1 Media dan kegiatan perakaran stek pucuk

Panen Benih dan Pengemasan (Packing)

Panen benih berakar dapat dilakukan pada umur 2-3 minggu setelah setek diakarkan. Dilakukan sortasi benih yang berkualitas dan seragam pada saat panen. Setelah sortasi, benih dikemas serta diberi label sesuai dengan varietasnya, benih siap didistribusikan dan ditanam di lapangan.



Gambar 10.2 Hambaran dan Bibit Krisan telah siap didistribusikan ke lapang

XI. JENIS KRISAN DI INDONESIA

Salah satu daya tarik tanaman Krisan bagi konsumen adalah bentuk kelopak bunga dan warna yang sangat variatif, selain daya kesegaran bunga dalam ruangan yang relatif lama.

Jenis Krisan di Indonesia

Berdasarkan asal tanaman, jenis Krisan yang tumbuh di Indonesia adalah Krisan Lokal dan Hibrida.

1. Krisan lokal (krisan kuno)

Krisan ini telah lama beradaptasi di Indonesia, walaupun berasal dari luar negeri, namun telah dianggap sebagai krisan lokal. Jenis krisan ini bersifat hidup di hari netral dan memiliki siklus hidup antara 7-12 bulan dalam satu kali penanaman. Contohnya seperti *Chrysanthemum maximum* berwarna kuning dan putih.

2. Krisan introduksi (krisan modern atau krisan hibrida)

Krisan ini memiliki hidup berhari pendek dan bersifat sebagai tanaman annual, antara lain: *Chrysanthemum Indicum Hybrida Dark Flamingo*, *Indicum Hybrida Indianapolis Cossa* (Berbunga Kuning), *Indicum Hybrida Dolaroid*, *Clingo*, *Cossa*, *Fleyer* (Berbunga Putih), *Pink Pingpong* (Berbunga Pink), dan *Alexandra Van Zaal* (Berbunga Merah).

3. Krisan produk Indonesia

Krisan ini merupakan hasil budidaya Indonesia yang dibuat oleh Balai Penelitian Tanaman Hias Cipanas, yaitu varietas Balithi 27.108, 28.7, 27.177, 13.97 dan 30.13 A.

Selain itu, ada juga jenis Krisan yang ditanam dalam pot, diantaranya:

- Krisan mini, yaitu tanaman kecil yang berbunga lebat dengan diameter kecil dengan tinggi 20-40 cm. Contohnya: varietas *Pearl Cindy* (putih kemerah-merahan), *Lilac Cindy* (warna pink keungu-unguan), *White Cindy* (putih dengan tengahnya putih kehijauan), *Yellow Mandalay* dan *Applause* (kuning cerah).

- Krisan berbunga besar, antara lain varietas *Delano* (ungu), *Rage* (merah), dan *Time* (kuning)

Ada juga jenis bunga potong krisan, yaitu yang memiliki ciri-ciri tangkai bunga panjang dan bunga berukuran kecil, sedang dan besar, dan umumnya ditanam di lapangan terbuka. Contohnya seperti: *Improved Funshine*, *Green Peas*, *Brides*, *Inga*, *Great Verhagen*, *Puma*, *Cheetah*, *Reagon*, *Klondike*, dan lainnya.

Varietas Krisan Produksi Indonesia

Permintaan dan produksi krisan di Indonesia berimplikasi pada kebutuhan benih, teknologi budidaya dan keberagaman varietas. Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi) telah melepas 4 varietas baru krisan pada tahun

2008, yaitu: Mustika Kaniya, Swarna Kencana, Padma Buana dan Tirta Ayuni. Sedangkan pada tahun 2009, Balithi melepas sebanyak 12 varietas baru krisan, yaitu: Puspa Kayani, Dwina Kencana, Dwina Pelangi, Paras Ratu, Pasopati, Wastu Kania, Ratna Wisesa, Tiara Salila, Asmarandana, Raspati, Pamudita dan Permana. Tahun 2010, 14 varietas unggul baru dilepas.



Gambar 11.1 Krisan Pamudita dan Puspa Kayani
(Balithi, 2010)

Selain itu Litbang Pertanian melepas 21 Varietas Unggul hasil Inovasi Para Peneliti Litbang Pertanian serta menasionalkan 2 Varietas Unggul Lokal masing-masing Krisan Riri dan Kulo yang keragaanya meliputi : Sakuntala, Mustika Kaniya, Kusumaswasti, Kusumapatria, Cintamani, Swarna Kencana, Puspita Pelangi, Puspita Nusantara, Lokon Riri (kuning).



Gambar 11.2 Krisan Raspati dan Ratna Wisesa
(Balithi, 2010)



Gambar 11.3 Krisan Wastu Kania dan Krisan Swarna
Kencana (Balithi, 2010)

Berbagai varietas baru Krisan telah dihasilkan dengan pemuliaan tanaman. Pemuliaan tanaman Krisan dapat dilakukan secara konvensional melalui persilangan maupun induksi mutasi secara *in vitro*. Mutasi dapat dilakukan dengan mutagen fisik, biologi, maupun kimia. Beberapa hasil pemuliaan tanaman Krisan yang telah dilepas oleh Balithi pada tahun 2014 antara lain varietas Dahayu Agrihorti, Dwimahyani, Erika Agrihorti, Hartuti,

Jayani, Marina, Pinka Pinky, Pinkana, Sabiya, dan masih banyak lagi.



Gambar 11.4 Krisan Dwimahyani dan Krisan Erika Agrihorti (Balithi, 2014)

Krisan yang bernilai komersial pada umumnya adalah Krisan golongan "all year round" atau AYR Chrysan temum. Krisan jenis ini dapat berbunga sepanjang tahun dengan manipulasi panjang hari.

Hampir setiap tahun Badan Litbang Pertanian memperkenalkan varietas baru tanaman Krisan. Pada tahun 2015, delapan varietas krisan diperkenalkan pada gelar Teknologi Tanaman Hias, yakni Krisan Kineta, Pasopati, Arosuko Pelangi, Solinda Pelangi, Merah Hayani, Limeron, Elora dan Salziera. Kedelapan varietas ini melengkapi bunga lokal Krisan Kulo dan Krisan Riri yang telah di kenal di daerah Sumatra Utara.

Krisan Pot

Selain sebagai bunga potong, Krisan juga dapat dipergunakan sebagai tanaman hias dalam pot. Krisan Pot memiliki perbedaan dengan Krisan Bunga Potong dalam hal sosok tinggi tanaman. Tinggi Krisan Pot berkisar antara 15 – 30 cm, sedangkan tanaman Krisan bunga potong mencapai tinggi 100 – 125 cm.

Beberapa varietas tanaman Krisan hasil pemuliaan Balithi yang biasanya ditanaman sebagai Krisan Pot antara lain: Aiko Agrihorti, Anindita, Candrasmurti, dan Avanthé Agrihorti.



Gambar 11.5 Krisan Pot Aiko Agrihorti dan Avanthé Agrihorti



Gambar 11.6 Krisan Pot Anindhita dan Candrasmurti

DAFTAR PUSTAKA

- Basri, Z. Muslimin. 2001. Pengaruh Sitokinin terhadap Organogenesis Krisan secara In Vitro. Jurnal Agroland. 164-170.
- BPTP., 2006. Teknologi Budidaya Tanaman Hias Krisan. Badan Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta.
- BPTP., 2012. Peluang Bisnis Inovasi Krisan Badan Litbang Pertanian. Sinar Tani Edisi 7-14 Maret 2012 No.3447 Tahun XLII. Badan Litbang Pertanian Jakarta.
- Gunawan, LW. 1992. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Institut Pertanian Bogor.
- Hendaryono, D.P.S, dan A. Wijayani. 1997. Teknik Kultur Jaringan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 139 hal.
- Kasli. 2009. Upaya Perbanyak Krisan (*Chrysantemum* sp.) Secara In Vitro. Jerami 2(3): 121-125
- Rukmana R., 1997. Krisan. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Shintiavira, H, Rahmawati, I, dan Winarto, B., 2014. Aplikasi Modifikasi Media Generik Dalam Produksi Bibit Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) Berkualitas Melalui Kultur *In Vitro*. J. Hort. 24(3):220-229, J. Hort. 24(3):220-229,
- Soedarjo M, Shintiavira H, Supriyadi Y., Nasihin Y, 2012. Peluang Bisnis Inovasi Krisan Badan. Badan Litbang Pertanian Edisi 7-14 Maret 2012 No.3447 Tahun XLII
- Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N.A. Mattjik, dan A. Ernawati. 1991. Bioteknologi Tanaman. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor. 247 hal.
- Wetherell, DF. 1982. Pengantar Propagasi Tanaman Secara In Vitro. Avery Publishing Group INC. Wayne, New Jersey.
- Widiastoety, D. 1987. Percobaan Pendahuluan Kultur Jaringan pada Tanaman Seruni (*Chrysanthemum morifolium*). Bull. Penel. Hort. Vol. XV, No.2.
- Yusnita. 2004. Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien. Agromedia Pustaka. Jakarta
- www.balithi.litbang.pertanian.go.id.

ISSN 978-602-0856-37-7



PRODUKSI BIBIT KULTUR JARINGAN TANAMAN KRISAN