

**PENUNTUN DAN LEMBAR KERJA PRAKTIKUM**

**KULTUR JARINGAN TANAMAN**



Disusun oleh :

**Idha Susanti, M.Si**

**LABORATORIUM BIOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN, PERIKANAN, DAN BIOLOGI  
UNIVERSITAS BANGKA BELITUNG**

**2012**

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah robbil alamin, Buku Pedoman Praktikum bagi mata kuliah Kultur Jaringan Tanaman (BIO 341) telah terselesaikan. Buku Pedoman Praktikum ini disusun pertama kalinya bagi peserta mata kuliah Kultur Jaringan Tanaman (BIO 341) dari Program Studi Biologi, Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung tahun akademik 2007-2008.

Buku Panduan Praktikum ini berpedoman pada kurikulum dan silabus Program Studi Biologi. Panduan Praktikum ini diharapkan akan memudahkan mahasiswa dalam pelaksanaan kegiatan praktikum. Sebagaimana karya tulis lainnya, panduan praktikum ini masih tidak lepas dari segala kekurangan. Untuk itu masukan berupa sumbangan ide dan saran, maupun kritik yang membangun diperlukan bagi perbaikan Buku ini pada edisi berikutnya. Semoga diwaktu yang akan datang Buku ini dapat terus diperbaiki dan ditingkatkan kualitasnya.

Bangka, Juli 2008

Penyusun

## **TATA TERTIB PELAKSANAAN PRAKTIKUM**

### **A. Ketentuan Kedatangan dan Kuis**

1. Praktikan harus hadir tepat waktu.
2. Sebelum praktikum dimulai praktikan diwajibkan mengikuti kuis praktikum.
3. Kuis praktikum dilaksanakan selama 10-15 menit.
4. Materi kuis adalah sesuai dengan acara praktikum yang akan dilaksanakan pada hari itu.
5. Praktikan yang terlambat datang tidak ada dispensasi untuk memperpanjang waktu pengerjaan kuis.
6. Praktikan yang terlambat lebih dari 15 menit tidak diperkenankan mengikuti praktikum kecuali dengan alasan yang bisa diterima.

### **B. Ketentuan Pembuatan Laporan Praktikum**

1. Buku petunjuk praktikum berfungsi juga sebagai lembar kerja atau laporan praktikum.
2. Buku petunjuk dan lembar kerja praktikum dijilid dengan warna yang berbeda, sesuai kelompoknya masing-masing.
3. Buku petunjuk dan lembar kerja praktikum dikumpulkan setiap selesai praktikum, kecuali pada beberapa mata acara, laporan dapat dibuat di rumah.
4. Laporan praktikum dikerjakan dengan tulisan tangan.
5. Apabila lembar isian pada laporan kurang, praktikan dapat mengisinya pada lembar kosong dibelakangnya.
6. Kerapian laporan praktikum akan menambah point penilaian

### **C. Ketentuan Pelaksanaan Praktikum**

1. Praktikan diwajibkan membawa bahan/alat yang disepakati bersama dosen praktikum sebelum acara praktikum bersangkutan dimulai.
2. Praktikan harus berpakaian rapi dan tertib (memakai sepatu, baju/kaos berkerah, dll)
3. Praktikan dilarang menghidupkan suara HP, menerima telf/SMS ataupun merokok selama praktikum berlangsung demi ketenangan pelaksanaan praktikum.
4. Praktikan dilarang melakukan hal yang tidak pantas selama praktikum berlangsung.

### **D. Ketentuan Penilaian**

Nilai akhir Praktikum	
Kuis	= 15%
Laporan	= 35%
Responsi	= 20%
Ujian Praktikum	= 30%

## DAFTAR ISI

No.	Materi Praktikum	Halaman
1.	Aklimatisasi .....	1
2.	Sterilisasi Media .....	3
3.	Kultur Meristem .....	5
4.	Multiplikasi Tunas .....	8
5.	Pengamatan Kalus dan Embriogenesis somatis .....	10
6.	Daftar Pustaka .....	12

## I. AKLIMATISASI

### LANDASAN TEORI

Aklimatisasi adalah kegiatan memindahkan planled (tanaman kultur yang telah lengkap organ-organnya) keluar dari kondisi aseptik (*in vitro*) kepada kondisi luar (*in vivo*). Stress adalah kondisi yang pertama kali terjadi pada planled akibat perubahan kondisi tempat tumbuh yang semula serba terkendali, minim gangguan, dan kaya akan nutrisi.

Lingkungan luar mengharuskan tanaman beradaptasi secepatnya agar dapat mengatasi berbagai kondisi yang penuh gangguan dan unsur hara yang tidak ideal. Kondisi tersebut sangat sulit bagi tanaman, karena tanaman perlu waktu untuk belajar menghadapi kondisi luar yang kompleks. Selama kurun waktu belajar beradaptasi tersebut dilakukan aklimatisasi secara hati-hati dan bertahap. Tanaman yang stress umumnya diatasi dengan penambahan senyawa kimia anti stress seperti vitamin B1, pemberian sungkup, sterilisasi planled, dan sterilisasi media tanam.

Sungkup digunakan untuk melindungi bibit dari lingkungan luar dan serangan hama penyakit karena bibit hasil kultur jaringan sangat rentan terhadap serangan hama penyakit. Lama pemberian sungkup bergantung pada tingkat kerentanan tanaman. Ada tanaman yang hanya perlu disungkup selama satu minggu, namun tidak sedikit yang membutuhkan sungkup hingga satu bulan lebih.

Tempat aklimatisasi sebaiknya dilakukan di lingkungan yang relatif terkendali dari gangguan, seperti rumah kaca, rumah kasa/paranet, atau pesemaian yang kondisinya (terutama kelembaban) dapat dikendalikan. Planlet ditanam dalam wadah berisi media (tanah, pakis, pasir, dan pupuk kandang) yang telah disterilkan.

Umumnya sterilisasi media tanam dilakukan dengan cara perebusan, namun dapat juga dilakukan dengan bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dapat bervariasi bergantung sifat planled yang akan ditanam. Planled yang rentan umumnya diberi perlakuan fungisida, bakterisida, dan insektisida sekaligus. Pada tanaman lain pernah juga dilakukan sterilisasi media tanam dengan formalin 4%.

Aklimatisasi berlangsung selama 2-3 bulan. Setelah bibit mampu beradaptasi dengan lingkungan barunya maka secara bertahap sungkup dilepaskan dan pemeliharaan bibit dilakukan dengan cara yang sama dengan pemeliharaan bibit non kultur jaringan. Indikator keberhasilan suatu metode aklimatisasi dapat diketahui dari minimnya kematian tanaman hasil kultur.

### TUJUAN PRAKTIKUM

Praktikum ini bertujuan untuk melakukan aklimatisasi dengan menggunakan planled ubi kayu.

### METODOLOGI PRAKTIKUM

#### *Waktu dan Tempat*

Praktikum ini dilaksanakan pada hari \_\_\_\_\_, tanggal \_\_\_\_\_, pukul \_\_\_\_\_ sampai dengan selesai. Bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan, Program Studi Biologi Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi Universitas Bangka Belitung.

### *Alat dan Bahan*

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah pinset, panci, ember, pipet, kawat, dan sprayer.

Bahan-bahan yang digunakan adalah aquadest, planled anggrek, fungisida, bakterisida, pakis, arang, vitamin B1, Atonik, fungisida Dithane, Gandasil atau Grow Quick, dan kotak plastik kue.

### *Cara Kerja*

Botol yang akan diaklimatisasi di buka beberapa jam sebelumnya. Satu persatu planled dikeluarkan dari botol dengan menggunakan pinset atau kawat yang dibengkokkan secara hati-hati. Tanaman dicuci dan dibilas sampai agar-agar yang melekat hilang. Setelah itu jaringan tanaman yang rusak dibuang agar tidak terjadi pembusukan. Tanaman kemudian direndam dalam larutan B1 dan fungisida selama 10 menit.

Media pakis yang telah direbus dikeringanginkan hingga dingin dan diletakkan sebagian pada wadah. Setelah itu media disemprot dengan fungisida. Tanaman yang telah siap ditanam pada media secara hati-hati. Sungkup ditutup selama seminggu. Setiap media kering dilakukan penyiraman dengan air. Penyiraman dengan air yang mengandung vitamin B1 dan fungisida dilakukan masing-masing seminggu sekali. Setelah 2 minggu tanaman dapat diberi pupuk majemuk setiap minggu.

### *Metode Praktikum*

Pengamatan dilakukan setiap minggu terhadap seluruh tanaman. Hasil pengamatan dimasukkan ke dalam tabel.

No.	Jumlah Tanaman Mati	Minggu ke									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Anggrek 1										
2.	Anggrek 2										
3.	Anggrek 3										
4.	Anggrek 4										

Hal-hal yang harus dibahas:

- Seberapa besar prosentase kematian pada hari pengamatan terakhir.
- Jelaskan pada minggu keberapa tanaman paling banyak mati, jenis tanamannya, dan sebab-sebab kematian tanaman.

## II. STERILISASI MEDIA

### LANDASAN TEORI

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.

Teknik ini dicirikan oleh kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan dengan kandungan nutrisi dan zat pengatur tumbuh serta kondisi ruang kultur yang pencahayaannya terkontrol. Karena media kultur jaringan yang kaya akan nutrisi tersebut merupakan sumber makanan yang baik untuk bakteri dan fungi, semua prosedur *in vitro* harus memuat pencegahan terhadap kontaminasi mikroorganisme. Problema yang sering mengganggu dalam pekerjaan *in vitro* adalah membuat dan menjaga kondisi aseptik. Spora dari bakteri dan fungi ada dimana-mana dan dapat mengkontaminasi media (Wetherell 1982).

Ada beberapa macam cara sterilisasi yaitu: sterilisasi dengan pemanasan, pembakaran, uap air panas, zat kimia, filter, dan radiasi. Adapun sarana yang diperlukan untuk proses sterilisasi adalah sebagai berikut:

1. Laminar air flow cabinet (LAF) atau ruang steril buatan seperti enkas.
2. Autoclaf.
3. Oven untuk sterilisasi kering.
4. Perlengkapan glass ware untuk sterilisasi

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tanaman secara kultur jaringan. Berbagai komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan. Beberapa komposisi yang sudah baku dan sering digunakan antara lain media Knudson C, Heller, Nitsch dan Nitsch, B5, Linsmaier dan Skoog-LS, Murashige dan Skoog (MS), Vacin dan Went (VW), Woody Plant Medium (WPM), dan sebagainya. Media kultur tersebut fisiknya dapat berbentuk cair atau padat. Media berbentuk padat menggunakan pematat media, seperti agar atau gel (Gunawan 1994; Wetter & Constabel 1991).

Menurut Gunawan (1994), komponen media kultur yang lengkap adalah sebagai berikut:

1. Air destilata (aquades)
2. Hara-hara makro dan mikro
3. Vitamin, asam amino dan bahan organik lainnya
4. Gula (sukrosa) sebagai sumber energi
5. Zat pengatur tumbuh
6. Suplemen berupa bahan-bahan alami, jika diperlukan
7. Agar atau gel sebagai pematat media

Salah satu komponen media yang menentukan keberhasilan kultur jaringan adalah jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan. Jenis dan konsentrasi ZPT tergantung kepada tujuan dan tahap dari pengkulturan. Dewasa ini beberapa media kultur jaringan dapat dibeli dalam bentuk bubuk yang telah lengkap. Formula ini memang memudahkan pekerjaan, namun penelitian atau pembuatan media untuk komoditas

jenis tanaman memerlukan perubahan komposisi dalam satu atau beberapa komponen, maka pemisahan komponen-komponen penyusun media perlu untuk dilakukan.

### TUJUAN PRAKTIKUM

Praktikum ini bertujuan untuk membuat media Murashige dan Skoog (MS), dan mensterilisasi alat dan media yang digunakan dalam praktikum kultur jaringan.

### METODOLOGI PRAKTIKUM

#### *Waktu dan Tempat*

Praktikum ini dilaksanakan pada hari \_\_\_\_\_, tanggal \_\_\_\_\_, pukul \_\_\_\_\_ sampai dengan selesai. Bertempat di Laboratorium Program Studi Biologi Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung.

#### *Alat dan Bahan*

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah beberapa jenis botol kultur, erlemeyer, timbangan analitik, gelas ukur, pipet, tip eppendorf, cawan petri, erlemeyer, gunting, pinset, autoklaf, dan skapel. Bahan-bahan yang digunakan adalah aquadest, alkohol 70%, HCl 1 N, KOH 1 N, bahan kimia untuk media MS, gula pasir, air kelapa, plastic tahan panas, karet, kertas saring, dan pH universal.

Komposisi media MS per liter media adalah sebagai berikut:

No	Bahan Kimia	Nama Bahan	Stok	Berat/gr	Pipetting
1	KNO <sub>3</sub>	Potassium nitrat	A/1000ml	19 gr	100 ml
2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potassium fosfat	A	1,7 gr	
3	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Kalsium klorit	A	4,4 gr	
4	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Magnesium sulfat	A	3,7 gr	
5	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Amonium nitrat	A	16,5 gr	
6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Asam borak	B/100ml	0,63 gr	1 ml
7	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	Mangan sulfat	B	1,69 gr	
8	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Zinc sulfat	B	0,86 gr	
9	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	Kupro sulfat	B	0,0025 gr	
10	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	Sodium molibdat	B	0,025 gr	
11	CoCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Kobald worit	B	0,0025 gr	
12	KI	Potassium iodine	C/100ml	0,083 gr	1 ml
13	Thiamin HCl		D/100ml	0,02 gr	0,5 ml
14	As. Nicotinat		D	0,1gr	
15	Prydoksi HCl		D	0,1 gr	
16	Na <sub>2</sub> EDTA	Besi kelat	E/100ml	0,373 gr	10 ml
17	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Fero sulfat	F/100ml	0,287 gr	10 ml
18	Sukrosa			20 gr	
19	Mio inositol			0,1gr	
20	Kasein hidrolisat			3 gr	
21	Agar			7-10 gr	

### III. KULTUR MERISTEM

#### LANDASAN TEORI

Inisiasi kultur *in vitro* sangat dipengaruhi oleh respon tanaman, yaitu kemampuan regenerasi, tingkat fisiologi serta kesehatan dari eksplan tanaman. Berdasarkan kemampuan regenerasinya umumnya eksplan diambil dari daerah meristematis suatu tanaman, baik dari pucuk, bagian tangkal, atau tangkai utama. Eksplan tersebut harus dipisahkan secara aseptik.

Jenis tanaman yang diperbanyak dengan kultur jaringan terutama dilakukan terhadap tanaman yang menghadapi masalah budidaya seperti daya perkecambahan bijinya rendah, tanaman hibrida yang tertua jantannya tidak steril, tanaman langka, dan tanaman yang selalu diperbanyak dengan cara vegetatif (Gunawan 1991). Alasan lain penggunaan teknik kultur jaringan adalah nilai ekonomi suatu tanaman yang relatif tinggi, baik sebagai tanaman konsumsi, obat, atau hias.

Bahan tanaman yang dikulturkan lazim disebut dengan eksplan. Eksplan merupakan faktor penting penentu keberhasilan suatu kultur jaringan. Umur fisiologis, umur ontogenik, ukuran eksplan, serta bagian tanaman yang diambil merupakan hal-hal yang harus diperhatikan dalam memilih eksplan yang akan digunakan sebagai bahan awal kultur (Gunawan 1994).

Kadang terjadi hambatan untuk sterilisasi eksplan *in vivo*. Hal ini disebabkan oleh banyaknya mikroorganisme pada eksplan *in vivo*, karena berasal dari alam atau di tempat yang tidak steril. Disamping itu, terdapat kesulitan mendapatkan eksplan yang kaya akan jaringan meristem seperti tunas, daun muda, dan batang muda, terutama pada tanaman keras (berkayu). Faktor efisiensi waktu (semakin cepat waktu pengambilan dan penanaman semakin baik) dan letak (tempat eksplan yang jauh dan kemungkinan sulitnya medan) serta kemungkinan kecenderungan kandungan fenol yang tinggi pada tanaman berkayu di alam menjadi pertimbangan lain (Tim Kultur Jaringan 2004). Kesulitan sumber jaringan meristem ini umumnya diatasi dengan mengkultur embrio atau kecambah.

#### TUJUAN PRAKTIKUM

Praktikum ini bertujuan untuk melakukan inisiasi tunas (dan atau akar) dengan menggunakan jaringan meristem tanaman lada.

#### METODOLOGI PRAKTIKUM

##### *Waktu dan Tempat*

Praktikum ini dilaksanakan pada hari \_\_\_\_\_, tanggal \_\_\_\_\_, pukul \_\_\_\_\_ sampai dengan selesai. Bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan, Program Studi Biologi Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung.

##### *Alat dan Bahan*

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah botol kultur, botol kultur, bunsen, cawan petri, erlemeyer, gunting, enkas, pinset dan skapel.

Bahan-bahan yang digunakan adalah aquadest, karet, kertas saring, aluminium foil, alkohol 70% dan 95%, jaringan meristem hoya (*Hoya sp*), gaharu (*Aquilaria sp*), dan dan *Sansiviera* (*Sansiviera sp*), akuadest dan media MS steril dan klorox 10 %.

### Cara Kerja

Jaringan meristem lada disterilisasi dengan alkohol dan klorok sesuai seri sterilisasi eksplan pada tabel. Hasil sterilisasi eksplan dibuang bagian terluarnya dan dipotong-potong kecil pada cawan petri berisi kertas saring steril. Potongan jaringan diletakkan secara aseptis pada media steril. Hasil kultur diinkubasi dan diamati selama 4 minggu.

Seri sterilisasi eksplan adalah sebagai berikut:

No.	Eksplan	Metode sterilisasi eksplan		
		1	2	3
1.	Lada	Klorok 10% 10 menit	Alkohol 70% 3 menit	Aguadest steril 3 kali

### Metode Praktikum

Metode praktikum yang digunakan adalah metode analisa kualitatif dan kuantitatif. Parameter yang diamati adalah sebagai berikut:

1. Pertambahan berat tunas = Berat akhir – Berat awal
2. Jumlah daun
3. Jumlah tunas
4. Pertambahan berat basah
5. % Kontaminan =  $\frac{\sum \text{kontaminan}}{\sum \text{yang ditanam}} \times 100\%$
6. % Kematian =  $\frac{\sum \text{tanaman mati}}{\sum \text{yang ditanam}} \times 100\%$

Pengamatan Induksi kalus kotiledon dan hipokotil kecambah steril kedelai dan kacang panjang dimasukkan dalam tabel. Dari seluruh seri botol kultur amati seluruhnya dan tentukan 3 botol terbaik untuk dimasukkan ke dalam tabel.

No.	Eksplan	Minggu ke – (jumlah botol)					
		1	2	3	4	5	6
1.	Waktu muncul tunas						
2.	Jumlah daun						
3.	Ada/tidak akar						
4.	Pertambahan berat basah						
5.	Total % kontaminan						
6.	Total % kematian						

Hal-hal yang harus dibahas:

- Seberapa besar prosentase kontaminan dan kematian, dan analisis mengapa angka tersebut yang terjadi selama praktikum.

- Apabila terjadi kontaminasi, jelaskan mengapa hal tersebut dapat terjadi, dan tergolong mikroorganisme jenis apa yang mengkontaminasi kultur (bakteri/cendawan).
- Jelaskan mengenai pertambahan berat yang terjadi, pada eksplan apa terjadi pertambahan berat paling besar.
- Jelaskan mengenai warna tunas dan daun yang dihasilkan dari hasil perbanyakan, analisis apakah warna tersebut tergolong kultur yang tumbuh baik atau tidak.
- Jelaskan apa pembentukan akar atau kalus yang mengalami selama masa inkubasi.

## IV. MULTIPLIKASI TUNAS

### LANDASAN TEORI

Multiplikasi memiliki pengertian yang berbeda pada beberapa sumber referensi. Sebagian ahli menganggap multiplikasi adalah kegiatan memperbanyak calon tanaman dengan menanam eksplan pada media hingga tercapai jumlah yang dibutuhkan. Sebagian ahli lainnya mengasumsikan bahwa multiplikasi identik dengan sub kultur, yaitu kegiatan memindahkan hasil kultur yang sudah ada sebelumnya (*in vitro*) kepada media steril lainnya yang masih baru. Sub kultur ini memiliki beberapa tujuan seperti:

1. Memperpanjang masa tumbuh tanaman pada saat nutrisi pada media sebelumnya hampir habis.
2. Mengubah arah pertumbuhan tanaman, misalnya dari media inisiasi tunas menjadi media inisiasi akar.
3. Memperbanyak jumlah tanaman dengan memindahkan sebagian jaringan tanaman sebelumnya.
4. Menjarangkan tanaman apabila pada wadah steril sebelumnya dianggap terlalu padat.
5. Memberikan perlakuan baru.

Pada multiplikasi dengan tujuan perbanyak tanaman, dilakukan sub kultur secara berulang sampai diperoleh jumlah tanaman yang dikehendaki, sesuai dengan kapasitas laboratorium. Setiap siklus multiplikasi berlangsung selama 2–3 bulan. Untuk tunas yang telah responsif stater kultur dalam periode tersebut, dari 1 tunas dapat dihasilkan 10-20 tunas baru. Setelah tunas mencapai jumlah yang diinginkan, biakan dipindahkan (dikulturkan) pada media perakaran.

Pada beberapa tumbuhan sub kultur yang terlalu sering dapat menimbulkan dampak negatif berupa terjadinya mutasi pada tanaman. Mutasi ini dapat bersifat merugikan apabila menghasilkan sifat yang tidak diinginkan, namun mutasi juga dapat bersifat menguntungkan apabila menghasilkan variasi sifat baru yang lebih baik atau komersil.

### TUJUAN PRAKTIKUM

Praktikum bertujuan untuk melakukan multiplikasi tanaman anggrek ke media baru.

### METODOLOGI PRAKTIKUM

#### *Waktu dan Tempat*

Praktikum ini dilaksanakan pada hari \_\_\_\_\_, tanggal \_\_\_\_\_, pukul \_\_\_\_\_ sampai dengan selesai. Bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan, Program Studi Biologi Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi Universitas Bangka Belitung.

#### *Alat dan Bahan*

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah aluminium foil, botol kultur, botol selai, bunsen, cawan petri, erlemeyer, gunting, enkas, pinset dan skapel. Bahan-bahan yang digunakan adalah aquadest, alkohol 70%, kultur anggrek usia 5 bulan yang padat, media MS steril, kapas, karet, dan kertas saring.

### *Cara Kerja*

Botol anggrek yang steril dibuka dan sebagian bibit anggrek dipindahkan ke media baru secara aseptis. Bila diperlukan, tunas yang masih bersatu dipisahkan terlebih dahulu pada cawan petri steril. Hasil kultur diinkubasi selama 4 minggu untuk kemudian diamati.

### *Metode Praktikum*

Metode praktikum yang digunakan adalah pengamatan secara umum sebagaimana pada tabel.

No.	Parameter Pengamatan	Anggrek Dendrobium	Anggrek Gramatophillum	Anggrek Catleya
1.	% kontaminan			
2.	% kematian			

Hal-hal yang harus dibahas:

- Seberapa besar prosentase kontaminan dan kematian, dan analisis mengapa angka tersebut yang terjadi selama praktikum.
- Apabila terjadi kontaminasi, jelaskan mengapa hal tersebut dapat terjadi, dan tergolong mikroorganisme jenis apa yang mengkontaminasi kultur.
- Jelaskan mengenai warna tunas dan daun yang dihasilkan, analisis apakah warna tersebut tergolong kultur yang tumbuh baik atau tidak.

## V. PENGAMATAN KALUS & EMBRIOGENESIS SOMATIS

### LANDASAN TEORI

Kerap kali dijumpai bahwa kulit batang yang masih muda jika dilukai terjadi jaringan penutup luka. Jaringan yang meristematis ini dikenal dengan nama kalus. Kalus merupakan salah satu wujud dari diferensiasi. Diferensiasi merupakan reversi (proses pembalikan arah pertumbuhan) dari sel-sel hidup yang telah terdiferensiasi menjadi tidak terdiferensiasi lagi, atau dengan kata lain menjadi meristematis kembali.

Salah satu tujuan dalam budidaya kultur jaringan atau kultur *in vitro* adalah menginduksi terbentuknya kalus. Hal ini merupakan salah satu langkah penting. Setelah itu, diusahakan suatu rangsangan agar kalus mengalami diferensiasi, membentuk akar dan tunas. Proses pembentukan kalus sampai diferensiasi berbeda-beda tergantung macam dan bagian tanaman yang dipakai untuk eksplan, metode budidaya *in vitro* yang digunakan, dan zat-zat yang terkandung pada medium tumbuh (Suiyowinoto 1998).

Selama perkembangan dari zigot ke perkecambahan biji dan perkembangan tumbuhan secara vegetatif dan reproduktif, zat pengatur tumbuh memainkan peranan penting terhadap proses pembelahan sel, pembesaran sel, dan diferensiasi sel. Eksplan yang ditanam pada suatu media yang cocok serta nutrisi yang tersedia dalam waktu yang relatif lama akan terbentuk kalus. Kalus ini biasanya ditumbuhkan pada media padat, sedangkan pada media cair disebut protokormus kultur kalus (induksi kalus) (Suryowinoto 1982).

Berdasarkan jenis bahan yang digunakan, eksplan kultur jaringan dibagi menjadi:

1. Kultur sel  
Kultur sel pada media cair yang steril dalam tabung yang aerasinya dilakukan dalam pengocokan.
2. Kultur organ  
Kultur aseptik dengan eksplan embrio, anther (mikrospora), ovarium, akar, batang dan organ-organ tanaman lainnya.
3. Kultur meristem dan morfogenesis  
Yaitu kultur aseptik batang atau eksplan lain pada media dengan menumbuhkan menjadi tanaman yang lengkap.
4. Kultur kalus  
Kultur massa sel pada media agar yang dihasilkan dari eksplan yang berupa seedling atau bagian tanaman lain.
5. Kultur protoplas  
Merupakan isolasi aseptik dan budidaya yang berasal dari kultur sel atau jaringan lainnya.

ZPT digunakan untuk menginduksi pembelahan sel. Senyawa yang paling sering digunakan adalah asam 2,4 diklorofenoksiasetat (2,4 D) dan asam naftalen asetat (NAA). Kedua senyawa ini amat lambat diuraikan oleh sel tumbuhan dan stabil dengan pemanasan menggunakan autoklaf. Untuk merangsang pertumbuhan kalus, senyawa organik lainnya juga ditambahkan pada media, misalnya ekstrak ragi, santan kelapa, jus tomat dan malt ekstrak.

Setelah terbentuk kalus, kalus akan melakukan proliferasi. Proliferasi terjadi jika suatu jaringan, dalam hal ini kalus tumbuh dengan sangat cepat. Pada proliferasi ini, sebagian kelompok sel meristem menjadi embrionik. Embrionik adalah suatu sel atau kelompok sel yang bersifat seperti embrio, yaitu mampu berkembang dari satu sel menjadi satu individu. Kelompok sel ini berkutub atau polar, kerap kali bentuknya seperti jantung. Sebuah kutub akan tumbuh menjadi tunas dan dari kutub yang lain akan tumbuh menjadi akar. Proses mulai terjadinya kalus sampai diferensiasi berbeda-beda tergantung macam dan bagian tanaman yang dipakai untuk eksplan, metode budidaya *in vitro* yang digunakan, dan zat-zat yang ditambahkan dalam media tanam (Suryowinoto 1996).

## **TUJUAN PRAKTIKUM**

Praktikum bertujuan untuk mengamati struktur kalus dan tahapan embriogenesis terhadap sediaan kalus.

## **METODOLOGI PRAKTIKUM**

### *Waktu dan Tempat*

Praktikum ini dilaksanakan pada hari \_\_\_\_\_, tanggal \_\_\_\_\_, pukul \_\_\_\_\_ sampai dengan selesai. Bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan, Program Studi Biologi Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi Universitas Bangka Belitung.

### *Alat dan Bahan*

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini mikroskop dan alat perekam preparat. Bahan-bahan yang digunakan adalah sediaan koleksi kalus.

### *Cara Kerja*

Di bawah mikroskop struktur kalus diamati dan struktur yang ada didokumentasi dengan foto.

### *Metode Praktikum*

Hal-hal yang harus dibahas:

- Bagaimana struktur/karakter (warna, keremahan, kering/tidak, banyak/sedikit dll) kalus yang diamati.
- Sertakan gambar pendukung pengamatan kalus.
- Apakah pada sediaan ditemukan struktur yang mencirikan embriogenesis somatis? Tahapan struktur apa saja yang diperoleh pada pengamatan?
- Sertakan gambar pendukung pengamatan embriogenesis.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Bhojwani SS, Razdan MK. 1983. Plant Tissue Culture, Theory ad Practice. Elsevier, Amsterdam.
2. Gunawan LW. 1994. Teknik Kultur In Vitro dalam Hortikultura. Penebar Swadaya. Jakarta.
3. Hartman, Kester. 1995. Plant Propagation, Principles and Practices. John Wiley and Sons, Inc. New York.
4. Hendaryono DPS. 2000. Pembibitan Anggrek dalam Botol. Kanisius. Jakarta.
5. Nugroho A & Sugito H. 2004. Pedoman Pelaksanaan Teknik Kultur Jaringan. Penebar Swadaya. Jakarta.
6. Pierik, RLM. 1987. In Vitro of Higher Plants. Martinus nijhoff Publishers. Lancaster.
7. Rahardja PC. 1988. Kultur Jaringan, Teknik Perbanyakan Tanaman Secara Modern. Penebar Swadaya. Jakarta.
8. Sarwono B. 2002. Mengenal dan Membuat Anggrek Hibrida. Agromedia Pustaka. Jakarta.