

MODUL PRAKTIKUM

B I O T E K N O L O G I

P E R T A N I A N



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2011**

LEMBAR PENGESAHAN

Nama : _____

NIM : _____

Kelompok : _____

No	MATERI	ASISTEN	LAPORAN		KETERANGAN
			Tanggal Diserahkan	Tanggal Disetujui	

ABSENSI KEGIATAN PRAKTIKUM

No	Hari /Tgl	Kegiatan	Asisten

Catatan :

Nilai :

DAFTAR ISI

Hal

Daftar Isi	i
Kata Pengantar	ii
Tata Tertib Praktikum Bioteknologi Pertanian	iii
I. Pengenalan Alat Laboratorium Bioteknologi	1
II. Teknik Aseptik pada Kultur Jaringan	3
III. Pembuatan Media Kultur Jaringan	5
IV. Pengecambahan Biji Anggrek Secara <i>In Vitro</i>	8
V. Kultur Organ Tanaman	10
VI. Propagasi Klonal Anggrek secara <i>In Vitro</i>	12
VII. Kultur Anther	14
VIII. Isolasi DNA Tanaman	16
IX. Amplifikasi DNA dengan PCR	18

TATA TERTIB PRAKTIKUM BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

A. Ketentuan Sebelum Praktikum

- ☑ Praktikan datang tepat waktu, bagi yang terlambat lebih dari 10 menit tidak diperkenankan mengikuti praktikum pada hari itu.
- ☑ Setiap kali praktikum, praktikan membawa jas lab dan petunjuk praktikum.
- ☑ Sebelum masuk ruang praktikum, praktikan menyerahkan laporan praktikum sementara.

B. Ketentuan Selama Dan Sesudah Praktikum

- ✍ Setelah praktikum, setiap kelompok membereskan semua alat yang dipakai dan mengembalikannya pada laboran sesuai dengan jumlahnya.
- ✍ Setiap praktikan atau kelompok mengganti alat yang rusak atau hilang selama dipakai atau dipinjam sebelum ujian akhir praktikum (UAP).
- ✍ Post test/pre test diadakan sebelum atau sesudah praktikum
- ✍ Hasil pengamatan selama praktikum dilaporkan segera setelah praktikum selesai hari itu sebagai laporan sementara. Untuk pengamatan yang melibatkan kelompok lain (kolektif) setiap kelompok harus menempelkan hasil pengamatannya di papan pengumuman yang telah disediakan.

C. Laporan Praktikum dan Tugas

- 📄 Laporan praktikum dikerjakan di rumah dan dikumpulkan 1 (satu) minggu setelah pengamatan terakhir dilakukan, Dikumpulkan secara kolektif menurut asisten yang membimbing pada saat praktikum
- 📄 Laporan sementara praktikum boleh ditulis tangan dengan syarat tulisan harus rapi, dan asisten berhak mengembalikan laporan tsb jika laporan dianggap tidak layak untuk dikumpulkan dan dikoreksi.
- 📄 Laporan dan tugas yang diberikan dikumpulkan tepat waktu, keterlambatan dalam mengumpulkan akan dikenai sanksi pengurangan nilai.

D. Tidak Dapat Mengikuti Praktikum

- 👉 Praktikan yang dengan terpaksa tidak dapat mengikuti praktikum yang sudah dijadwalkan pada kelompoknya, harus melapor ke koordinator asisten untuk mendapatkan ijin mengikuti praktikum pada kelompok lain.
- 👉 Praktikan yang tidak dapat mengikuti praktikum sampai 2 (dua) kali tanpa keterangan dianggap mengundurkan diri dan praktikumnya dianggap gugur

E. Mengikuti Praktikum pada Kelompok Lain

1. Mahasiswa yang mengikuti praktikum pada kelompok lain harus sudah seijin asisten kelompok yang diikuti, setelah sebelumnya sudah melapor ke asisten kelompok asal, dan telah mengkonfirmasi pada koordinator asisten.
2. Praktikan yang sudah selesai mengikuti praktikum pada kelompok lain, melapor kembali pada asisten kelompok asal dan menyerahkan laporan pada asisten kelompok asal.

F. Mahasiswa Dilarang :

- ✘ Membawa buku laporan praktikum mahasiswa angkatan sebelumnya kedalam ruang praktikum.
- ✘ Makan, minum dan merokok didalam ruang praktikum.

G. Hal-hal lain yang belum tercantum dalam tata tertib ini diatur kemudian

Malang, September 2011

Koordinator Praktikum Bioteknologi Pertanian

I. PENGENALAN ALAT DI LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI

1. PENDAHULUAN

Seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, maka setiap bidang yang menyangkut ilmu pengetahuan dan teknologi pun akan mengalami perkembangan dan kemajuan. Salah satunya adalah bidang pertanian. Bioteknologi pertanian merupakan salah satu penerapan dari ilmu pengetahuan yang merupakan salah satu teknologi dalam bidang pertanian. Bioteknologi mempelajari pemanfaatan makhluk hidup (bakteri, fungi, virus, dan lain-lain) maupun produk dari makhluk hidup (enzim, alkohol) dalam proses produksi untuk menghasilkan barang dan jasa.

Bioteknologi secara sederhana sudah dikenal oleh manusia sejak ribuan tahun yang lalu. Pada masa ini, bioteknologi berkembang sangat pesat, terutama di negara-negara maju. Kemajuan ini ditandai dengan ditemukannya berbagai macam teknologi semisal rekayasa genetika, kultur jaringan, rekombinan DNA, pengembangbiakan sel induk, kloning, dan lain-lain. Di bidang pertanian dengan menggunakan teknologi rekayasa genetika, kultur jaringan dan rekombinan DNA, dapat dihasilkan tanaman dengan sifat dan produk unggul karena mengandung zat gizi yang lebih jika dibandingkan tanaman biasa, serta juga lebih tahan terhadap hama maupun tekanan lingkungan.

Bioteknologi pertanian memiliki laboratorium tempat dimana kegiatan pembiakan dan perakitan tanaman dilakukan. Dalam laboratorium tersebut terdapat berbagai macam alat yang memiliki fungsi cara penggunaan yang beraneka ragam.

Pada dasarnya setiap alat memiliki nama yang menunjukkan kegunaan alat, prinsip kerja atau proses yang berlangsung ketika alat digunakan. Beberapa kegunaan alat dapat dikenali berdasarkan namanya. Penamaan alat-alat yang berfungsi mengukur biasanya diakhiri dengan kata meter seperti termometer, hygrometer dan spektrofotometer, dll. Alat-alat pengukur yang disertai dengan informasi tertulis, biasanya diberi tambahan "graph" seperti thermograph, barograph (Moningka, 2008).

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Praktikum ini bertujuan untuk memperkenalkan alat-alat yang ada di laboratorium bioteknologi serta fungsi dan cara penggunaannya kepada mahasiswa sehingga tidak salah dalam penggunaan alat pada praktikum bioteknologi selanjutnya.

3. BAHAN DAN METODE

Peralatan yang digunakan di laboratorium bioteknologi meliputi :

1. Alat-alat gelas (erlenmeyer, labu takar, petridish, tabung reaksi, beaker glass, botol kultur)
2. Alat-alat non gelas (pinset, spatula, gunting, jarum ose)
 - a. Alat ukur (gelas ukur, pipet ukur+rubber bulb filler, Mikropipet)
3. Alat sterilisasi (oven, autoclave, incubator)
4. Alat pemanas (hot plate, Bunsen burner, water bath)
5. Alat sentrifus (centrifuge)
6. Alat ukur keasaman (pH meter, indikator lakmus)
7. Timbangan (timbangan, timbangan analitis)
8. Mortar dan pestle
9. Instrument : (mesin PCR, UV transilluminator, Spektrofotometer, Vortex, sentrifus, Shaker)
10. Laminar Air Flow cabinet (LAF)
11. Tabung nitrogen cair

4. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Setiap praktikan mencatat dan memperhatikan peralatan serta cara kerja dan fungsinya masing-masing yang terdapat di laboratorium Bioteknologi pertanian.

5. PENGAMATAN

1. Peralatan Gelas (glassware)

NO	JENIS ALAT	SPEKIFIKASI	FUNGSI	Gambar Alat	

2. Peralatan Bukan Gelas (Non Glass Equipment) Pendukung

Peralatan bukan gelas diperlukan untuk mendukung penggunaan peralatan lain seperti peralatan gelas, peralatan untuk Pemanas dan peralatan untuk menimbang

Table 2 . Peralatan Bukan Gelas

NO	JENIS ALAT	SPESIFIKASI	FUNGSI	Gambar Alat	

3. Peralatan Pemanas (Hettting Equipment)

Pemanas digunakan untuk kegiatan di dalam laboratorium seperti pemanas dan pendidihan solven membantu melarutkan bahan kimia

Table 3. Peralatan Pemanas

NO	JENIS ALAT	SPESIFIKASI	FUNGSI	Gambar Alat	

4. Neraca Untuk Menimbang

Secara garis besar timbang yang digunakan dibedakan menjadi timbang kasar, sedang dan halus. Timbang kasar dengan ketelitian kurang atau sama dengan 0,1 gr timbang sedang ketelitian antara 0,01 gr – 0,001 dan timbangan halus dengan ketelitian lebih besar atau sama dengan 0,0001 gr contoh peralatan untuk menimbang yang digunakan dilaboratorium.

Table 4. Peralatan untuk menimbang

NO	JENIS ALAT	SPESIFIKASI	FUNGSI	Gambar Alat	

II. TEKNIK ASEPTIK PADA KULTUR JARINGAN

1 PENDAHULUAN

Dalam teknik kultur jaringan, hal yang sangat penting dan sulit adalah semua kegiatan dilakukan dalam kondisi aseptik. Bakteri dan jamur merupakan kontaminasi yang sangat umum didapat dalam kultur jaringan. Apabila media kultur terkontaminasi oleh mikroba-mikroba ini, jaringan tanaman yang dikultur akan mati karena kontaminasi. Kontaminasi umumnya tumbuh lebih cepat dibandingkan jaringan, dan dapat menghasilkan sisa metabolik (metabolic waste) yang toksik bagi jaringan tanaman. Kontaminasi kultur jaringan dapat dicegah dengan melakukan sterilisasi peralatan kultur jaringan, bahan tanam, media kultur dan ruangan yang digunakan (ruang transfer dan ruang kultur).

Metode sterilisasi yang digunakan ada beberapa macam, yaitu : metode pemanasan (kering dan basah), dengan bahan kimia, dan ultrafikasi. Metode pemanasan kering dilakukan dengan oven pada suhu tinggi > 130°C - 160°C selama 2-3 jam. Metode pemanasan kering digunakan untuk peralatan berbahan gelas (glassware), peralatan berbahan logam atau material lain yang tidak hangus terbakar oleh temperatur tinggi. Skalpel dan pisau sebaiknya tidak disterilisasi metode ini karena suhu tinggi dapat menyebabkan tumpul. Metode pemanasan basah pada prinsipnya adalah pemanasan dengan uap air pada suhu dan tekanan tinggi. Sterilisasi pemanasan basah dapat dilakukan dengan autoclave. Sterilisasi umumnya dilakukan pada suhu 121°C tekanan 15 psi (1,5 atm) dengan waktu 15 menit – 1 jam tergantung jenis bahan yang disterilisasikan.

Ultrafikasi dilakukan terhadap komponen medium yang tidak tahan panas (thermolabil). Tetapi proses ini lebih lambat dan lebih mahal dibandingkan dengan sterilisasi menggunakan autoclave. Larutan yang akan disterilisasi dilewatkan melalui filter dengan ukuran pori tidak lebih dari 0.45-0,22 µm di dalam kontainer steril.

Lingkungan kerja (Laminar air flow/LAF) selain disterilisasi dengan penyinaran sinar UV, juga disterilisasi dengan penyemprotan alkohol 70%. Selama pengerjaan kultur, peralatan (skalpel, pinset, gunting) yang tidak sedang digunakan harus selalu direndam dalam larutan alkohol. Jika tidak digunakan wadah alkohol sebaiknya ditutup untuk mencegah penguapan.

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Mahasiswa mengetahui metode sterilisasi dan bahan sterilant yang digunakan untuk sterilisasi, serta dapat melakukan (praktek) sterilisasi pada peralatan, media kultur, bahan tanam dan ruangan yang dipergunakan selama kultur jaringan.

3. BAHAN DAN METODE

- Peralatan berbahan gelas (botol kultur, petri dish, dll)
- Peralatan berbahan non gelas (skalpel, pinset, gunting, spatula, dll)
- Media kultur
- Bahan tanam
- Alkohol 70% dan 96%
- Autoclave
- Oven

4. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

A. Sterilisasi peralatan

1. Sterilisasi peralatan (glassware dan logam) dan aquades dilakukan dengan sterilisasi kering (oven 130°C-170°C selama 2 – 4 jam). Semua peralatan ditutup sebelum sterilisasi.
2. Sterilisasi peralatan dengan autoclave dilakukan pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 1 jam. Peralatan yang akan disterilkan sebelumnya dibungkus dengan kertas. Setelah selesai di autoclave apabila peralatan tersebut belum akan digunakan, maka dapat disimpan di inkubator dengan suhu 60°C.
3. Sterilisasi peralatan logam (pinset, skalpel, gunting, jarum ose) yang digunakan pada saat melakukan kegiatan kultur di LAF dilakukan dengan merendam peralatan tersebut dalam alkohol (ethanol) 95% diikuti dengan pembakaran dan pendinginan. Teknik ini dinamakan flame sterilization.

B. Sterilisasi ruang kultur dan ruang transfer

Sterilisasi ruang kultur dan ruang transfer dilakukan dengan membersihkan area tersebut kemudian selanjutnya lantai ruangan di pel dengan desinfektan. Dinding dan rak kultur dapat disemprot dengan alkohol atau larutan sodium hipoklorit 2%. Proses sterilisasi ruang kultur dan ruang transfer dilakukan secara periodik.

C. Sterilisasi medium kultur

Sterilisasi medium kultur dapat menggunakan dua cara:

1. Metode autoclave, yaitu :
 - a. Medium dalam botol kultur ditutup dengan aluminium foil atau penutup plastik dan di autoclave pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15-40 menit dari waktu medium mencapai suhu yang diperlukan. Lamanya waktu sterilisasi tergantung pada volume medium yang disterilkan.
 - b. catatan: tekanan tidak boleh melebihi 20 psi karena akan menyebabkan dekomposisi karbohidrat dan komponen-komponen termolabil lain dalam medium

2. Metode filtrasi, yaitu:

Sterilisasi menggunakan membran filter berukuran 0.45-0,22 μm di dalam kontainer steril.

D. Sterilisasi bahan tanam

Prinsip dalam sterilisasi bahan tanam (eksplan) adalah jaringan tanaman (eksplan) tetap terjaga hidup tetapi mematikan kontaminan (bakteri atau jamur)

1. Bahan tanam dari lapang dicuci di bawah air mengalir selama 30 menit – 2 jam
2. Pencucian dan perendaman dalam air sabun juga diharapkan dapat mengurangi jumlah pathogen yang ada di eksplan atau membuat pathogen lebih accessible terhadap sterilan.
3. Perendaman dalam larutan fungisida atau bakterisida dapat dilakukan
4. Jenis sterilant yang sering digunakan dalam sterilisasi eksplan bermacam-macam : sodium hipoklorit (1-10%), calcium hipoklorit (4-10%), hidrogen peroksida (10-12.5%) dan lain-lain. Sterilant dapat digunakan secara tunggal maupun kombinasi.
5. Sebelum diletakan di medium pertumbuhan, ujung eksplan yang kontak dengan sterilan dibuang.

III. PEMBUATAN MEDIA KULTUR JARINGAN

1. PENDAHULUAN

Tipe kultur yang berbeda akan mempunyai satu atau lebih komposisi media yang unik. Keberhasilan metode kultur jaringan sangat tergantung jenis media yang digunakan. Beberapa media kultur jaringan antara lain medium Murashige & Skoog (MS) (Murashige dan Skoog, 1962), medium B5 (Gamborg *et. al.*, 1968), medium Schenk dan Hildebrandt, medium WPM (Woody Plant medium), medium N6 dan lain-lain. Elemen-elemen mineral sangat penting bagi hidup tanaman. Kebutuhan nutrisi mineral untuk tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* pada dasarnya sama dengan kebutuhan hara tanaman yang ditumbuhkan di lahan, meliputi hara makro dan mikro. Menurut rekomendasi International association for plant physiology, elemen yang diperlukan oleh tanaman dalam konsentrasi > 0,5 mmol/l dikenal dengan makroelemen, sedangkan elemen yang diperlukan < 0,5 mmol/l adalah mikroelemen. Hara makro : N, P, K, Ca, Mg dan S. Hara mikro meliputi : Fe, Cu, Mn, B, Mo dan Co.

Tanaman yang tumbuh dalam kondisi normal bersifat autotrof dan dapat mensintesa semua kebutuhan bahan organiknya. Meskipun tanaman *in vitro* dapat mensintesa senyawa ini, namun diperkirakan tidak menghasilkan vitamin dalam jumlah yang cukup untuk pertumbuhan yang sehat dan satu atau lebih vitamin mesti ditambahkan ke media. Thiamin merupakan vitamin yang penting, asam nikotin, piridoksin dan inositol biasanya ditambahkan. Bahan kompleks seringkali ditambahkan, termasuk ekstrak ragi, casein hydrolysate, air kelapa, jus jeruk, jaringan pisang, dan lain – lain. Penambahan bahan kompleks ini menghasilkan media yang tak terdefinisi.

Tanaman dalam kultur jaringan tumbuh secara heterotrof dan mempunyai laju fotosintesis yang rendah. Oleh karena itu mereka tidak cukup mensintesa kebutuhannya, Gula harus ditambahkan ke dalam media sebagai sumber energi bagi pertumbuhan tanaman dan juga sebagai bahan pembangun untuk memproduksi molekul yang lebih besar yang diperlukan untuk tumbuh. Gula yang paling sering digunakan adalah sukrosa, umumnya pada konsentrasi 1 – 5% digunakan sebagai sumber karbon. Namun sumber karbon lain seperti glukosa, maltosa, galaktosa dan laktosa juga digunakan. Gula pasir yang digunakan sehari-hari dapat dipakai karena mengandung 99,9% sukrosa.

Umumnya jaringan dikulturkan pada media padat yang dibuat seperti gel dengan menggunakan agar atau pengganti agar seperti, Gelrite atau Phytigel. Pada konsentrasi tinggi agar menjadi sangat keras, sedikit sekali air yang tersedia, sehingga difusi hara ke tanaman sangat buruk. Agar dengan kualitas tinggi mahal harganya tapi lebih murni, tidak mengandung bahan lain yang mungkin mengganggu pertumbuhan. Gel sintetis diketahui dapat menyebabkan hyperhidration (vitrikifikasi) yang merupakan problem fisiologis yang terjadi pada kultur. Untuk mengatasi masalah ini, produk baru bernama Agar gel telah diproduksi yang merupakan campuran agar dan gel sintetis dan menawarkan kelebihan kedua produk sekaligus mengurangi problem vitrikifikasi. Produk ini dapat dibuat di lab dengan mencampurkan 1 g Gelrite (Phytigel) dengan 4 g agar sebagai agen pengental untuk 1 L media.

pH media biasanya diatur pada kisaran 5.6 – 5.8 tapi tanaman yang berbeda mungkin memerlukan pH yang berbeda untuk pertumbuhan optimum. Jika pH lebih tinggi dari 6.0, media mungkin menjadi terlalu keras dan jika pH kurang dari 5.2, agar tidak dapat memadat.

Salah satu komponen media yang menentukan keberhasilan kultur jaringan adalah jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan. Jenis dan konsentrasi ZPT tergantung pada tujuan dan tahap pengkulturan. ZPT untuk menumbuhkan dan menggandakan tunas aksilar atau merangsang tumbuhnya tunas adventif adalah sitokinin atau kombinasi sitokinin dan auksin dalam konsentrasi rendah. ZPT untuk merangsang pembentukan akar pada tunas, biasanya menggunakan auksin. Apabila tujuan untuk pembentukan kalus, ZPT auksin dan sitokinin digunakan dengan konsentrasi tertentu yang akan menstimulasi pengkalusan..

Air distilata (aquades) biasanya digunakan dalam kultur jaringan, namun banyak lab menggunakan aquabides (air destilata ganda).

Pembuatan media pada prinsipnya dilakukan dengan melarutkan semua komponen media dalam air, sesuai dengan konsentrasi pada formulasi yang diinginkan. Penimbangan komponen media satu per satu untuk setiap pembuatan media kultur tidak praktis, dan hanya dapat dilakukan jika jumlah zatnya cukup besar. Masalah tersebut dapat diatasi dengan pembuatan larutan stok. Larutan stok adalah larutan berisi satu atau lebih komponen media yang konsentrasinya lebih tinggi (pekat) daripada konsentrasi komponen tersebut dalam formulasi yang sesuai dengan media yang dimaksud.

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Mahasiswa dapat mengetahui komponen penyusun dengan fungsinya masing-masing dalam media kultur jaringan dan mahasiswa mengetahui serta dapat mempraktekkan cara membuat larutan stok yang akan dipergunakan dalam membuat media kultur jaringan sesuai komposisi medium yang diinginkan.

3. BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam pembuatan larutan stok adalah hara makro, hara mikro, vitamin, zpt sesuai komposisi medium yang diinginkan, dalam hal ini media MS, NaOH 0.1N, HCl 0.1N, gula pasir, agar.

Peralatan yang digunakan dalam pembuatan larutan stok antara lain: Neraca analitik, pipet ukur, gelas ukur, labu takar, beaker glass, erlenmeyer, pH meter atau kertas lakmus, autoclave, botol kultur, plastik, karet, kertas label.

Tabel 5. Komponen Media MS (Murashige dan Skoog, 1962)

Nama Stok	Senyawa dalam larutan stok	Konsentrasi dalam media MS (mg/L)	Konsentrasi dalam larutan stok (mg/L)	Volume Larutan stok yang dibutuhkan per liter media (ml)
Makro (10x)	NH ₄ NO ₃	1650	16500	100
	KNO ₃	1900	19000	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3700	
	KH ₂ PO ₄	170	1700	
Ca (100x)	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	44000	10
Mikro A (100x)	H ₃ BO ₃	6.2	620	10
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	2230	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	860	
Mikro B (1000x)	KI	0.83	830	1
	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0.25	250	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	25	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	25	
Fe (100x)	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	2780	10
	Na ₂ EDTA	37.3	3730	
Vitamin (1000x)	Tiamin HCl	0.1	100	1
	Pridoksin HCl	0.5	500	
	Asam nikotinat	0.5	500	
	Glycine	2.0	2000	
Myo-inositol (50x)	Myo-inositol	100	5000	20
ZPT	BAP	1	100	1
	NAA	0.2	100	0.2
	Sukrosa		Tidak dibuat larutan stok	
	Agar-agar		Tidak dibuat larutan stok	

4. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Berikut adalah hal – hal penting yang mendasar dalam pembuatan media:

1. Sebelum memulai,

- Siapkan lembar media dan tentukan media apa dan berapa banyak yang akan anda buat. Tulis informasi ini pada lembar kerja dan periksa setiap langkah sambil anda bekerja.
 - Tanda tangani dan tulis tanggal pada lembar kerja dan letakkan pada logbook. Anda dapat menuliskan komentar tentang apa saja yang tidak biasa atau penting yang terjadi pada saat anda membuat media.
2. Bilas alat gelas (labu takar, pipet ukur, gelas ukur, erlenmeyer, beaker glass) dengan aquades sebelum mulai menyiapkan media.

Membuat media MS 1 liter

- a. dari larutan stok diambil dengan volume sesuai dengan tabel, masukkan dalam erlenmeyer 1 liter.
- b. Sukrosa sebanyak yang diperlukan serta zpt dengan konsentrasi sesuai perlakuan, kemudian aquades ditambahkan sampai volume 900 ml.
- c. Kemasaman media diukur (pH) dengan pH meter atau kertas lakmus. pH medium antara 5,5-5,8. Jika pH terlalu rendah ditambahkan NaOH sampai pH naik, apabila pH terlalu tinggi maka diturunkan dengan meneteskan HCl.
- d. Tambahkan agar sebanyak 7 g/l, masukan ke dalam labu takar dan larutan ditambahkan aquades sampai volume tepat 1 liter.
- e. Panaskan medium sambil diaduk sesekali untuk melarutkan gula dan agar sampai medium mendidih yang ditandai dengan larutan menjadi jernih. Kemudian masukan ke dalam botol kultur steril sebanyak 20-25 ml, tutup rapat dengan aluminium foil atau plastik. Beri label yan bertuliskan jenis media dan konsentrasi zpt yang ditambahkan.
- f. Sterilkan medium dengan autoclave pada suhu 121°C, tekanan 1.5 atm (15 lbs) selama 20 menit.
- g. Biarkan media mendingin hingga 55°C sebelum menambahkan bahan-bahan yang tidak tahan panas (acetosyringone, claforan, kanamycin) apabila bahan-bahan tersebut akan ditambahkan dalam media

Pengamatan

1. Amati ada tidaknya kontaminasi
2. Bila ada kontaminasi:
 - a. catat saat munculnya
 - b. jenis kontaminan (jamur atau bakteri)
 - c. persentase botol kultur yang terkontaminasi

IV. PENGECAMBAHAN BIJI ANGGREK SECARA *IN VITRO*

1. PENDAHULUAN

Perbanyakkan anggrek secara alami dapat dilakukan dengan cara perbanyakkan vegetatif dan generatif. Perbanyakkan vegetatif dilakukan dengan memisahkan rumpun (bulb) atau keiki. Sedangkan perbanyakkan generatif menggunakan biji.

Biji anggrek sangat kecil dan tidak mempunyai cadangan makanan sehingga sulit dikecambahkan. Satu buah (kapsul) anggrek mengandung 10.000 – 100.000 biji. Dalam biji anggrek dapat berkecambah karena bersimbiosis dengan jamur endomikoriza yang menyediakan makanan bagi biji anggrek yang sedang berkecambah. Biji anggrek dapat dikembangkan melalui teknik kultur jaringan/*in vitro*. Perkecambahan biji anggrek dalam kondisi *in vitro* menunjukkan daya kecambah dan daya tumbuh yang lebih tinggi dibandingkan dengan perkecambahan biji anggrek dalam kondisi *in vivo*.

Media yang seringkali digunakan untuk menumbuhkan biji anggrek antara lain Knudson dan Vacin & Went. Pada umumnya komposisi medium terdiri dari zat an-organik dalam bentuk garam, sumber energi dalam bentuk gula seperti sukrosa, persenyawaan organik kompleks seperti air kelapa, tomat dan pisang serta arang aktif.

Jika biji viable dan kondisi lingkungan serta nutrisi sesuai, biji akan berkecambah dalam beberapa hari atau minggu (kadang-kadang dalam beberapa bulan). Pada saat itu embrio membesar 2 kali lipat dari ukuran awal dan selaput biji akan pecah dan embrio akan berkembang menjadi protocorm. Pada awalnya perkembangan protocorm berbentuk bulat atau memanjang, kemudian menjadi berbentuk buah pear dengan bagian apek tumpul. Warna protocorm bervariasi dari putih susu pada permulaan perkecambahan sampai hijau terang pada beberapa hari berikutnya. Pada tahapan ini juga dihasilkan beberapa rambut epidermis.

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Mahasiswa dapat mengetahui cara mengecambahkan biji anggrek secara *in vitro* dan mengamati morfologi biji dan perkembangan protocorm dan kecambah *in vitro*.

3. BAHAN DAN METODE

Biji anggrek yang masih terdapat didalam buah masak yang masih utuh, medium Knudson C modifikasi
Cawan Petri, skalpel, erlenmeyer, pipet tetes, mikroskop stereo
Alkohol, spiritus. Aquadest steril

Medium :

Medium Knudson C + 0,2 mg/l NAA + 0,5mg/l BAP

Medium Knudson C + 0,5 mg/l NAA + 1 mg/l BAP

Tabel . Komposisi Medium Perkecambahan Anggrek (Modifikasi Knudson)

Senyawa dalam larutan stok	Konsentrasi dalam media MS (mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.500
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1221
KH ₂ PO ₄	0.250
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0.6944
Fe ₂ Zn SO ₄ .7H ₂ O	0.56
Na ₂ EDTA	0.75
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O (dilarutkan dengan Na ₂ EDTA)	27.8 37.3
Pisang	150
Agar	9.5
BAP	0.5 dan 1
NAA	0.2 dan 0.5
Sukrosa	20.00

4. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

A. Sebelum ditanam, biji anggrek disterilkan terlebih dahulu. Sterilisasi dapat dilakukan secara fisik maupun kimia.

1. Sterilisasi secara Fisik : Buah anggrek yang masih utuh dicuci dengan aquadest steril, kemudian dicelupkan dalam alkohol 96% dan dibakar dengan api bunsen dan diulang 3X
 2. Sterilisasi secara kimia : Buah anggrek yang masih utuh disterilisasi dengan 20% larutan NaOCl 5,25% selama 10 menit dan dibilas dengan aquadest 3 kali, masing-masing selama 5 menit.
- B. Buah anggrek yang telah steril diletakkan ke dalam petridish dan dibelah membujur menjadi dua dengan pisau skalpel. Penyebaran biji anggrek ke medium dapat dilakukan dengan menggunakan pinset atau pipet
- a. Penyebaran biji anggrek dengan menggunakan pinset dilakukan dengan cara biji anggrek yang terdapat dalam buah diambil dengan pinset kemudian ditaburkan secara merata ke seluruh permukaan media kultur.
 - b. Penyebaran biji anggrek dengan menggunakan pipet dilakukan dengan cara biji anggrek dicampur dengan sedikit aquades steril, kemudian disedot dengan pipet dan disemprotkan ke dalam media kultur
 - c. Biji anggrek yang telah ditaburkan dalam medium, diinkubasi didalam ruang inkubasi dengan suhu 24C selama 6 minggu. Setiap minggu diamati respon pertumbuhan dan perkembangan bij anggrek dibawah mikroskop stereo. Bandingkan dengan biji anggrek sebelum dikultur.

5. PENGAMATAN

Tabel ... Perkecambahian biji anggrek secara *in vitro*

Medium	Jumlah protocorm	Gambar morfologi protocorm	Kontaminasi (%)	Jenis kontaminan
Medium Knudson C + 0,2 mg/l NAA + 0,5mg/l BAP				
Medium Knudson C + 0,5 mg/l NAA + 1 mg/l BAP				

V. KULTUR ORGAN TANAMAN

1. PENDAHULUAN

Perbanyak mikro atau kultur organ dimulai dengan bagian yang terorganisir dari suatu tanaman, paling sering digunakan adalah tunas, dan proses pengkulturan ini menjaga keadaan terorganisir ini sambil mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan ke arah perbanyak dan regenerasi tanaman baru yang lengkap.

Diferensiasi yang utama terlihat pada kultur sel dan jaringan adalah pembentukan tunas dan akar yang secara keseluruhan disebut organogenesis. Organogenesis dipengaruhi oleh komponen medium kultur, senyawa-senyawa endogen yang timbul selama kultur dan substansi yang dibawa dari eksplan awal serta pengaturan konsentrasi hormon eksogen dalam medium. Arah perkembangan eksplan dalam kultur in vitro dikontrol oleh ratio zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. Ratio auksin : sitokinin yang relatif tinggi akan menginduksi pembentukan akar, sementara ratio yang rendah akan memacu pembentukan tunas.

Pembentukan tunas yang didahului dengan terbentuknya kalus disebut organogenesis tak langsung. Sedangkan bila pembentukan tanpa kalus disebut organogenesis langsung. Organogenesis dalam kalus diinisiasi dengan pembentukan kelompok sel-sel meristematik yang mampu merespon faktor-faktor yang dapat menghasilkan primordium. Tergantung pada sifat faktor internal, stimulus dapat menginisiasi akar, tunas atau embrioid.

Inisiasi tunas atau kaulogenesis dalam jaringan tanaman yang dikultur dapat di induksi dalam beberapa sistem dengan keseimbangan yang sesuai dari auksin dan sitokinin eksogen. Dalam beberapa kasus salah satu kelompok zpt tersebut harus dihilangkan.

Pada umumnya medium untuk induksi akar berbeda dengan medium untuk induksi tunas. Tetapi tidak jarang akar sudah terinduksi pada medium pertunasan. Beberapa faktor yang terlibat dalam rhizogenesis meliputi auksin, karbohidrat dan fotoperiodisme.

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Mahasiswa mengetahui dan dapat melakukan perbanyak tanaman Krisan dan mawar melalui teknik kultur organ.

3. BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah tunas pucuk dan ruas daun (nodus) batang tanaman krisan dan mawar, media yang digunakan adalah : (1) Medium MS + 0,1 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; dan (2) Medium MS + 0,3 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP, larutan clorox .

Alat yang digunakan antara lain : pinset, skalpel, cawan petri, botol kultur, alkohol 70% dan cloroks (Bayclin) 10% dan 30%.

4. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

1. Nodus batang dan pucuk tanaman krisan dan mawar dicuci dalam air mengalir selama 30 menit, buang bagian-bagian daun bawahnya.
2. Kemudian direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, bilas dengan aquades. Selanjutnya lakukan perendaman-kocok pada larutan 30% NaOCl (5,25%) selama 10 menit, kemudian dibilas dengan aquades steril dan diulang 2x.
3. Sterilisasi di LAF dengan melakukan perendaman-kocok 10% NaOCl (5,25%) selama 10 menit, bilas dengan aquades steril 3x.
4. Ambil nodus batang yang telah disterilkan dan letakkan di cawan petri.
5. Potong kedua bagian tepi batang yang telah terkena sterilan, kemudian ditanam dalam media kultur dengan posisi tegak.
6. Eksplan :
 - ✓ Untuk eksplan tunas pucuk, buang daun yang berlebih sehingga hanya bagian pucuk saja dengan ukuran 0.5-1 cm yang ditanam dalam media.
 - ✓ Eksplan ruas daun (nodus) hanya ditanam satu ruas tiap eksplan.
7. Tiap botol diisi 3 potong eksplan.

5. PENGAMATAN

Amati perubahan yang terjadi, yaitu :

- a. Kontaminasi yang terjadi (%) dan macam kontaminan
- b. Saat pertamakali muncul tunas dan akar serta (hari setelah tanam) → pengamatan dilakukan tiap hari
- c. Jumlah tunas dan akar per eksplan → pengamatan dilakukan tiap minggu

Tabel ... pertumbuhan tunas/akar nodus krisan dan mawar

Jenis Medium	Kontaminasi			Organ	Saat muncul tunas / akar (hari)	Jmlh tunas/akar pada minggu ke -
	Waktu munculnya kontaminan	Macam kontaminan	% kontaminan			
Medium MS0				Tunas Akar		
Medium MS + 0,1 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP				Tunas Akar		
Medium MS + 0,3 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP				Tunas Akar		

VI. PROPAGASI KLONAL ANGGREK SECARA *IN VITRO*

1. PENDAHULUAN

Anggrek merupakan tanaman hias anggota famili Orchidaceae yang sangat digemari konsumen di seluruh dunia dan mempunyai nilai ekonomi yang tinggi, baik sebagai bunga potong (cutting flower) maupun sebagai bunga pot (potted plant). Nilai ekonomi anggrek terletak pada keindahan, keunikan, bentuk dan warna bunga (sepal, petal labellum), ukuran bunga, seringnya berbunga, dan masa vase life yang lama untuk cutting flower, sehingga menjadikan anggrek menjadi salah satu bunga populer di dunia.

Perbanyak vegetatif tanaman akan menghasilkan keturunan yang mempunyai sifat sama (true to type) dengan induknya (mother plant). Perbanyak vegetatif tanaman anggrek secara konvensional dapat dilakukan, salah satunya dengan 'keiki' namun karena prosesnya dianggap sangat lambat oleh para produsen anggrek komersial sehingga tidak dapat memenuhi permintaan bibit dalam waktu yang cepat. Selain itu perbanyak vegetatif anggrek secara konvensional tidak dapat diandalkan untuk memproduksi bibit secara massal jika dibutuhkan klon anggrek tertentu dalam jumlah yang besar.

Alternatifnya adalah perbanyak (propagasi) menggunakan teknik kultur *in vitro* melalui cara meriklon, yaitu kloning *in vitro* dengan meristem tunas atau meristem tangkai bunga sebagai eksplan (Ernest, 1994) atau melalui jalur organogenesis *in vitro* dari eksplan ujung akar atau potongan daun *in vitro* (Chen dan Chang, 2000).

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Mahasiswa mengetahui dan mampu melakukan perbanyak tanaman anggrek dengan metode propagasi klonal tanaman anggrek dengan kultur *in vitro*, serta mengetahui pengaruh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda terhadap induksi tunas adventif dari eksplan daun anggrek

3. BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan adalah anggrek *Phalaenopsis amabilis*. Untuk sumber eksplan:

1. Menggunakan daun dari planlet steril dari bibit botol umur 3-4 bulan yang tumbuh normal dan sudah memiliki sedikitnya 2 (dua) daun membuka sempurna.
2. Menggunakan tangkai bunga yang masih tertutup seludang.

Media kultur *in vitro* yang digunakan adalah formulasi media MS yang garam-garam mineralnya dikurangi menjadi setengah dari formulasi MS asal. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah BA (Benzyladenine) dengan konsentrasi 5 mg/l dan 10 mg/l. Sukrosa 20 mg/l dan bubuk agar-agar 7 g/l media.

4. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

A. Sterilisasi

1. Sterilisasi eksplan potongan daun : potongan daun yang digunakan sebagai eksplan merupakan potongan daun dari bibit botol steril. Daun dipotong di bagian tengahnya sepanjang ± 1 cm, secara aseptik dalam Laminar Air Flow (LAF), dan ditanam diatas media yang telah disiapkan. Untuk daun yang berukuran kecil eksplan yang digunakan hampir seluruh ukuran daun.
2. Sterilisasi eksplan tangkai bunga : tunas tangkai bunga dipotong satu buku, masing-masing berisi mata tunas yang masih tertutup seludang. Sterilisasi permukaan eksplan dilakukan dengan cara eksplan dicuci bersih di bawah air mengalir, kemudian direndam dalam larutan detergen dan dikocok-kocok sebentar, kemudian dibilas dengan aquades. Setelah itu eksplan direndam dalam ethanol 70% selama 1 menit kemudian dibilas aquades steril 3x. Selanjutnya sterilisasi dilakukan di dalam LAF terdiri dari perendaman-kocokan dalam larutan NaOCl (Bayclin) konsentrasi 20% selama 15 menit, lalu bilas aquades steril. Kemudian seludang yang menutupi mata tunas dikupas dengan hati-hati, selanjutnya lakukan perendaman-kocokan dalam larutan NaOCl konsentrasi 15% selama 10 menit. Terakhir bilas dengan aquades steril 3x dan ditanam dalam media.
3. Masing-masing botol kultur ditanam 2 eksplan

5. PENGAMATAN

Tabel . Pengamatan praktikum perbanyakan anggrek secara klonal

Pengamatan Jenis eksplan		Kontaminasi (%)	Jenis kontaminan	Waktu terbentuk kalus (minggu setelah inokulasi)	Jumlah kalus yang terbentuk	Penampakan visual kultur anggrek

VII. KULTUR ANTHER

1. PENDAHULUAN

Kultur haploid adalah kultur yang berasal dari bagian reproduktif tanaman, yaitu mengkulturkan butiran tepung sari (dengan 1 set kromosom; haploid) diinduksi untuk membagi dan menggandakan jumlah kromosomnya sehingga tanaman menjadi memiliki 2 set kromosom yang sama. Semua langkah produksi tanaman double haploid ini dapat dicapai dalam 1 – 2 generasi. Karenanya, jika teknik kultur mikrospora dilakukan pada tanaman hibrida F1, akan menghasilkan tanaman homozygote dalam 1 generasi, sehingga mengurangi waktu yang diperlukan dalam membuat varietas yang uniform (true bred)., tepungsari/ pollen (kultur pollen), ovule (kultur ovule), sehingga dapat dihasilkan tanaman haploid.

Kultur anther dapat membantu program pemuliaan tanaman melalui dua keuntungan utama, yaitu: (a). teknik ini merupakan cara tercepat mendapatkan galur homozigot yang berasal dari galur heterozigot dengan cara menggandakan sifat haploid pollen yang ditumbuhkan; (b). Dapat menghasilkan dan memilih mutan unggul dengan cepat. Hal ini karena haploid hanya mempunyai satu seri alil dalam tiap lokus sehingga memungkinkan sifat mutan resesif dapat dideteksi secara mudah.

Variasi bahan dasar media (organik dan anorganik) akan diperoleh suatu komposisi medium yang sesuai bagi suatu varietas tanaman. Media kultur anther yang umumnya digunakan selalu mengandung unsur hara makro dan mikro, asam-asam amino, vitamin, hormon pertumbuhan dan karbohidrat. Komposisi media dasar yang sudah dikenal cocok digunakan sebagai media kultur anther adalah medium N6.

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Mahasiswa mengetahui komposisi bahan kimia media kultur anther dan mampu melakukan kultur anther untuk mendapatkan tanaman haploid pada tanaman padi

3. BAHAN DAN METODE

Bahan tanam yang digunakan adalah bunga padi, medium N6, zpt, aquades steril, alkohol 70% dan 95%, petri dish, botol kultur, pinset, gunting, skalpel, aluminium foil, kulkas.

4. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

A. Persiapan

1. Sampel tanaman padi dibungkus kertas merang atau tissue yang dibasahi air untuk menjaga kelembaban sehingga tidak kering.
2. Setelah itu dibungkus dengan aluminium foil dan diberi perlakuan dingin dengan meletakkan di kulkas suhu 10°C selama 7 hari.

B. Penanaman di kultur

1. Sterilisasi malai padi dilakukan menggunakan larutan 0,1% sublimat ($HgCl_2$) selama 15 menit, kemudian dicelup alkohol 70% selama 1-2 menit.
2. Malai kemudian dibilas dengan air steril 3-4 kali untuk menghilangkan sisa larutan sublimat.
3. Spikelet (bulir-bulir bunga padi) dipilih lagi untuk mendapatkan stadia yang paling tepat untuk dijadikan eksplan, dengan cara melihat letak anther tidak melebihi setengah panjang spikelet
4. Spikelet dipotong pangkalnya menggunakan gunting tepat dibawah kepala sarinya (anther).
5. Kemudian spikelet dijepit dengan pinset ujungnya dan diletakkan dipinggir petri dish berisi media agar sehingga anther jatuh ke atas media.
6. Masing-masing botol kultur/petri dish yang berisi media induksi kalus diinokulasikan sekitar 120 anther yang berasal dari 20 bulir spikelet
7. Botol kultur yang ditanami anther tersebut kemudian di letakkan dalam ruang gelap dengan suhu 26° sampai terbentuk kalus.
8. Kalus yang terbentuk kemudian dipindahkan ke media regenerasi dan diinkubasikan dalam ruang terang dengan pencahayaan 1000 lux dan suhu 27°C.

5. PENGAMATAN

Pengamatan Jenis eksplan	Jumlah anther diinokulasi	Kontaminasi (%)	Jenis kontaminan	Waktu terbentuk kalus (minggu setelah inokulasi)	Jumlah kalus yang terbentuk	Warna kalus

Tabel . Komposisi media induksi kalus pada kultur anther padi

Senyawa dalam larutan stok	Konsentrasi dalam media MS (mg/L)
NH ₄ NO ₃	231.50
KNO ₃	2830.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	185.00
KH ₂ PO ₄	400.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	166.00
MnSO ₄ .H ₂ O	4.40
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.50
H ₃ BO ₃	1.60
KI	0.80
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
Na ₂ EDTA	37.35
Tiamin HCl	1.00
Pridoksin HCl	0.50
Asam nikotinat	0.50
Glycine	2.0
L-Glutamin	265.00
Myo-inositol	100
Kinetin	1.00
NAA	2.00
Sukrosa	
Agar-agar	7 g
pH	5.80

VIII. ISOLASI DNA TANAMAN

1. PENDAHULUAN

Pada dasarnya sel mengandung dua asam nukleat, yaitu DNA dan RNA. DNA yang terdapat di inti sel adalah DNA kromosomal, DNA yang terdapat di luar inti sel atau sitoplasmik adalah DNA ekstrakromosomal, yaitu DNA mitokondria, DNA kloroplas, DNA plasmid. Proses denaturasi dan renaturasi molekul DNA tergantung pada banyaknya factor, beberapa diantaranya adalah suhu, pH, konsentrasi ion elektrolit dan rasio (GC:AT). Suhu, T-melting (T_m) yang tinggi menyebabkan untai ganda (double helix) DNA akan terurai menjadi untai tunggal (single helix). Apabila suhu ini diturunkan secara perlahan maka akan terjadi renaturasi menjadi untai ganda DNA kembali seperti semula. pH (derajat keasaman) yang ekstrim pun ($pH < 3$, atau $pH > 10$) dapat menyebabkan DNA terdenaturasi. Konsentrasi ion elektrolit seperti Na^+ dan K^+ , serta makin tinggi rasio kandungan basa nukleotida (GC:AT) maka akan memperlambat proses denaturasi DNA.

Untuk memperoleh isolate DNA dari sampel ada beberapa hal yang harus diperhatikan dan dilakukan secara benar (Fatchiyah dkk, 2008), yaitu

1. Pemecahan dinding sel atau jaringan yang DNA-nya akan di isolasi. Pemecahan dinding sel yang sering dilakukan adalah dengan menggunakan bahan kimia. Sel dirusak dengan buffer lisis yang mengandung senyawa kimia yang dapat merusak integritas barrier dinding sel. Senyawa kimia yang umumnya digunakan adalah lisosim, EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat), Tris-Cl, atau detergen, SDS (sodium dodecyle sulphate)
 2. Debris sel dipisahkan dari larutan DNA
 3. Presipitasi RNA dan protein agar diperoleh DNA yang murni
 4. Presipitasi DNA dengan ethanol dingin
 5. Pemurnian DNA dari ekstrak sel dengan menggunakan bahan kimia (fenol, fenol:kloroform, isopropanol, fenol:kloroform:isoamylalkohol)
 6. Pemurnian DNA dari kontaminan protein menggunakan enzim protease yaitu Pronase atau proteinase-K; dan kontaminan RNA dengan menggunakan RNase.
 7. Pemisahan DNA dari molekul RNA dan protein dapat dilakukan dengan menggunakan densitas gradient sentrifugasi CsCl, dengan cara ini DNA akan terpisah pada band yang berbeda dengan protein dan RNA, bahkan antara DNA linier dan DNA sirkuler. Selain itu menggunakan garam dengan konsentrasi tinggi, misalnya 0.25M sodium acetate atau 0.1M sodium chloride
 8. Presipitasi akhir DNA dapat dilakukan dengan menggunakan ethanol dingin dibawah kondisi ionic yang kuat. Dan dicuci dengan EtOH 70%
 9. Pellet DNA dilarutkan dengan buffer TE atau ddH₂O steril.
- ✓ Jaringan tanaman yang akan di preparasi DNA-nya, harus diperlakukan lebih dahulu dalam nitrogen cair (NO₂) dan segera dilakukan penggerusan agar diperoleh ekstrak sel yang halus. Kemudian ekstrak sel diperlakukan dengan ekstrak buffer yang dicampur dengan β -mercaptoethanol (fresh) dan selanjutnya seperti pada jaringan organism lain.

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Mahasiswa dapat mengetahui dan melakukan proses-proses yang berkaitan langsung untuk melakukan isolasi DNA. Serta mahasiswa dapat menginterpretasi data terkait hasil PCR.

3. BAHAN DAN METODE

Alat yang digunakan antara lain: mortar, pestle, tip, gelas ukur, tabung eppendorf, tissue, gunting, plastik pembungkus, mikropipet, spatula, erlenmeyer, microwave, mesin spektrofotometer, mesin PCR, oven, mesin vortex, timbangan analitik, stirer, pH meter, mesin elektroforesis, mesin centrifuge, autoclave, mesin UV transluminator dan lemari es.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah daun bawang merah yang tidak terlalu tua dan sehat (ujung daun tidak menguning).

Bahan kimia yang digunakan antara lain Buffer ekstraksi CTAB (NaCl, Tris HCl pH 8.0, EDTA dan Merkuptoethanol), nitrogen cair, PVP (polyvinilpirolidone), CHISAM (Chloroform, Isoamilalkohol), buffer pencuci, buffer TE, RNase, ethanol, isopropanol, DNA ladder, agarosa, buffer elektroforesis (TAE/TBE), loading dye, ethidium bromida, "PROMEGA " PCR reaction kit, dan primer mikrosatelit SSR.

4. PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Langkah kerja yang dilakukan mulai dari isolasi DNA dari daun bawang merah, uji kualitas, amplifikasi program PCR hingga analisa hasil ialah sebagai berikut:

Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan metode isolasi Karsinah *et al.*(2002) yang telah dimodifikasi dengan langkah kerja sebagai berikut :

1. Tabung eppendorf diisi dengan 1 ml buffer ekstraksi CTAB (CTAB 3%, NaCl 1,4 M, EDTA 0,002M dan Tris-HCl 0,1M) dan 5 μ l *mercaptoethanol*.
2. Daun Bawang merah disterilisasi dengan alkohol dan ditimbang 0,5 gram.
3. 0,5 gram daun bawang merah digerus dalam mortar dengan bantuan nitrogen cair dan ditambah PVP 10 mg, kemudian dimasukkan kedalam eppendorf yang sudah berisi 1 ml buffer ekstraksi CTAB dan 5 μ l *mercaptoethanol*. Setelah itu ekstrak daun divortex hingga homogen.
4. Ekstrak daun diinkubasi dalam suhu 65°C selama 30 menit sambil dibolak-balik tiap 10 menit. Kemudian ditambahkan 700 μ l Chloroform : Isoamylalcohol/CHISAM (24:1). Setelah itu ekstrak daun divortex hingga homogen.
5. Ekstrak daun kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan dimasukkan tabung baru dan ditambahkan 700 μ l CHISAM.
6. Larutan supernatan dan CHISAM disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Fase atas dimasukkan tabung baru ditambah isopropanol dingin. Larutan tersebut dibolak-balik perlahan hingga tampak benang-benang putih dalam larutan. Larutan diinkubasi dalam *freezer* selama 30 menit.
7. Setelah diinkubasi, larutan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm setelah itu supernatan dibuang dengan hati-hati agar endapan DNA pellet tidak ikut terbuang.
8. Endapan DNA pellet dicuci dengan buffer pencuci dengan cara menambahkan 200 μ l buffer pencuci ke dalam *tube*, kemudian cairan di buang. Pencucian ini dilakukan 2 kali. Setelah itu endapan DNA pellet dikering anginkan.
9. Endapan DNA kemudian diresuspensi dengan 500 μ l buffer TE lalu ditambah 1 μ l RNase.
10. Larutan DNA yang sudah ditambah RNase diinkubasi selama 30 menit pada Suhu 37°C.
11. Setelah larutan DNA diinkubasi, ditambahkan 1 ml ethanol absolute dingin dan dibolak-balik perlahan.
12. Larutan DNA lalu diinkubasi pada *freezer* selama 30 menit.
13. Setelah inkubasi selesai kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 6000 rpm. Pelet kemudian dikering anginkan.
14. Pelet diresuspensi dengan 100 μ l buffer TE dan disimpan dalam lemari es.

Pengujian Kualitas DNA

Uji kualitas DNA dilakukan dengan *elektroforesis*. Langkah kerja yang dilakukan dalam *elektroforesis* ialah sebagai berikut :

1. Campur bahan untuk membuat 0,8 % gel agarose, yaitu 0,32 mg agarose dan 40 ml buffer TBE dalam *erlenmeyer*.
2. Kemudian larutan gel dihomogenkan dengan cara dipanaskan dalam microwave hingga larutan gel benar-benar homogen.
3. Setelah tidak terlalu panas, larutan gel dituangkan pada cetakan dan didiamkan sampai memadat.
4. Gel yang sudah memadat dipindah ke dalam mesin elektroforesis. Kemudian tuangkan buffer TBE ke dalam mesin elektroforesis hingga seluruh bagian gel terendam.
5. DNA hasil amplifikasi (5 μ l) dicampur dengan *loading dye* (1 μ l) dengan cara pipeting, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran/*wells*.
6. Proses dilakukan selama 20 menit dengan tegangan listrik 100 V.
7. Setelah proses elektroforesis selesai dilakukan, hasil elektroforesis direndam dalam larutan Ethidium Bromide selama \pm 15 menit
8. Gel yang telah direndam dalam Ethidium Bromide diamati dengan UV transluminator dan didokumentasikan.

IX. AMPLIFIKASI DNA DENGAN POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR)

1. PENDAHULUAN

Reaksi polymerase berantai (Polimerase Chain REaksi=PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula (10^6 - 10^7). Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap *n* siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah bagaimana cara amplifikasi hanya pada DNA target dan meminimalisir amplifikasi urutan DNA yang bukan target.

Proses PCR merupakan proses siklus berulang meliputi denaturasi – annealing – ekstensi oleh enzim DNA polymerase. Taq DNA polymerase diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (Taq) yang dikembangkan tahun 1988. Enzim ini tahan sampai suhu mendidih 100°C , dan aktivitas maksimal pada suhu 70 - 72°C . Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hybrid dengan ujung 5' menuju ujung 3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang dikehendaki.

Dasar siklus PCR yang utama merupakan siklus berulang 30-35 siklus yang meliputi :

- 1) Denaturasi (95°C) selama 30 detik. Pada denaturasi dua untai DNA template menjadi untai tunggal
- 2) Annealing (55 - 60°C) selama 30 detik. Pada annealing terjadi pengenalan/penempelan primer DNA template. Suhu annealing ditentukan oleh susunan primer. Optimalisasi suhu annealing dimulai dengan menghitung melting temperature (T_m) dari ikatan primer dan DNA template
- 3) Ekstensi (extension) (72°C), waktu tergantung dari panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi

Pada reaksi PCR memerlukan cDNA/DNA sebagai DNA template, dNTP sebagai pemasok energy, nukleotida untuk sintesis DNA, Taq polymerase untuk pemanjangan primer, sepasang primer spesifik (terdiri dari forward primer dan reverse primer), PCR buffer, ion Mg^{2+} dan thermal cycler.

Primer spesifik terdiri dari 15-30 basanukleotida dengan jumlah (C+G)=40-60%. Pasangan primer tidak boleh mengandung urutan basa yang komplemen untuk menghindari terbentuknya primer-dimer atau primer-oligomer. Jika digunakan sepasang primer spesifik untuk cDNA target dan semua komponen sudah optimal, maka seharusnya cDNA target saja yang teramplifikasi. Keberhasilan sintesis cDNA melalui RT-PCR dimonitor menggunakan elektroforesis gel agarosa dan divisualisasi dengan UV-transilluminator.

Optimasi primer dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan primer yang menunjukkan hasil terbaik. Penanda mikrosatelit (SSR) menggunakan dua pasang primer yaitu primer *forward* dan *reverse*. Primer yang digunakan ialah primer yang memiliki keterkaitan dengan gen pertumbuhan tanaman. Terdapat 4 macam primer (produksi GeneWorks Pty Ltd.) yang digunakan dalam proses PCR. Optimasi primer dilakukan pada kombinasi gabungan 2 primer sebagai primer *forward* dan *reverse*, sehingga terdapat 6 kombinasi primer gabungan (P1P2, P1P3, P1P4, P2P3, P2P4, P3P4). Susunan basa keempat primer tersebut adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Susunan Basa Primer

No	Oligo Name	Primer Sequence 5'–3'
1	Primer 1 (P1)	TCA CCA CCG AAC AGA TTC AA
2	Primer 2 (P2)	TGA TTT GGC ATC TTC AGA CC
3	Primer 3 (P3)	TAG CAT CAC CAC CGA ACA GA
4	Primer 4 (P4)	TGA TTT GGC ATC TTC AGA CCT

2. TUJUAN PRAKTIKUM

Mahasiswa mengetahui cara kerja dalam amplifikasi DNA dengan PCR, mengetahui komponen dan peralatan yang dibutuhkan dan fungsinya dalam melakukan PCR, serta mampu melakukan amplifikasi DNA dengan PCR

3. BAHAN DAN METODE

Sampel DNA, Taq polymerase, PCR mix solution (aquades steril, PCR mix, primer 1 dan primer 2). Peralatan yang digunakan Thermal cycler

Proses PCR

Proses PCR dilakukan dengan menggunakan "PROMEGA" PCR reaction kit (produk USA) meliputi *Go Taq Green Master Mix*, *Up stream primer*, *Down stream primer*, *DNA template* dan *Nuclease free water* dengan ketentuan pelaksanaan sesuai dengan protokol penggunaan produk.

Program PCR yang digunakan adalah 5 menit pada suhu 95°C untuk pre-denaturasi, selanjutnya dilakukan 36 siklus dimana setiap siklus terdiri dari 45 detik pada suhu 94°C untuk denaturasi (*denaturation*), 45 detik pada suhu 55°C untuk penempelan primer (*annealing*), dan satu menit pada suhu 72°C untuk pemanjangan primer (*elongation/extension*). Perpanjangan primer terakhir (*final extension*) dilakukan pada suhu 72°C selama lima menit dengan satu siklus. Hasil PCR kemudian diamati dengan elektroforesis.

Elektroforesis dan Visualisasi hasil PCR

Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis. Langkah kerja elektroforesis untuk visualisasi hasil PCR sama dengan elektroforesis untuk uji kualitas DNA, yaitu :

1. Campur bahan untuk membuat 1 % gel agarose, yaitu 0,4 mg agarose dan 40 ml buffer TBE dalam *erlenmeyer*.
2. Kemudian larutan gel dihomogenkan dengan cara dipanaskan dalam microwave hingga larutan gel benar-benar homogen.
3. Setelah tidak terlalu panas, larutan gel dituangkan pada cetakan dan didiamkan sampai memadat.
4. Gel yang sudah memadat dipindah ke dalam mesin elektroforesis. Kemudian tuangkan buffer TBE ke dalam mesin elektroforesis hingga seluruh bagian gel terendam.
5. DNA hasil amplifikasi (5 µl) dicampur dengan *loading dye* (1 µl) dengan cara pipeting, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran/*wells*.
6. Proses dilakukan selama 20 menit dengan tegangan listrik 100 V.
7. Setelah proses elektroforesis selesai dilakukan, hasil elektroforesis direndam dalam larutan Ethidium Bromide selama ± 30 menit
8. Gel yang telah direndam dalam Ethidium Bromide diamati dengan UV transluminator dan didokumentasikan.

5. PENGAMATAN

Interpretasi Data

Data yang diperoleh dari pemotretan gel hasil SSRs berupa pita-pita DNA dengan ukuran tertentu dari masing-masing varietas lokal yang diuji. Jarak pita diukur dari batas bawah sumur sampai batas bawah pita yang masih tampak. Nomor pita diurutkan dari jarak pita terdekat dengan batas bawah sumur. Pengukuran potongan DNA genom dilakukan dengan membandingkannya dengan berat molekul standar 1 Kb DNA Ladder.

Analisis data didasarkan pada ada atau tidaknya pita. Profil pita DNA diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan 1 untuk adanya pita pada posisi yang sama dari individu-individu yang dibandingkan. Dari data tersebut, digunakan sebagai perbandingan antara tanaman masing-masing populasi tanaman dengan menggunakan program NTSys 2.0i.