

BAB II

LABORATORIUM KULTUR JARINGAN

Kompetensi Dasar :

1. Mampu menggambarkan ruangan yang terdapat di dalam laboratorium kultur jaringan
2. Mampu menuliskan alat-alat yang terdapat dalam berbagai ruangan laboratorium kultur jaringan.
3. Mampu mendeskripsikan penggunaan alat pada teknik kultur jaringan

Laboratorium kultur jaringan menuntut aseptisitas yang sangat tinggi. Seluruh tahapan/ prosedur teknik kultur jaringan juga harus dalam kondisi aseptik. Oleh karena itu seluruh ruangan didalam laboratorium hendaknya dalam keadaan aseptik, terutama ruangan kultur atau inkubasi harus dalam kondisi benar-benar aseptik. Pada ruangan kultur seluruh tanaman hasil perbanyakan/ hasil perlakuan ditumbuhkan.

Laboratorium kultur jaringan sebaiknya dibangun pada daerah yang memiliki udara bersih, jauh dari debu dan polutan lainnya, hal ini untuk mengeliminir terjadinya kontaminasi. Oleh karena itu biasanya bangunan ini dibuat ditempat jauh dari keramaian. Bangunan laboratorium sebaiknya memiliki pembagian ruangan yang teratur sehingga setiap aktivitas yang berbeda dilakukan pada ruang yang berbeda, tetapi seluruh ruangan harus saling berhubungan.

Ruangan-ruangan pada laboratorium kultur jaringan menghendaki beberapa ruangan standart, namun dalam kenyataannya selalu dilakukan modifikasih dan hal ini sudah dilakukan oleh penulis dalam mendesain beberapa laboratorium kultur jaringan. Dibawah ini adalah beberapa ruangan yang harus ada dalam sebuah laboratorium kultur jaringan:

1. Ruangana Analisa

2. Ruangan Sterilisasi
3. Ruangan Preparasi
4. Ruangan Stok
5. Ruangan Isolasi/Transfer
6. Ruangan Kultur

1. Ruangan Analisa/ Ruangan Serba Guna

Ruangan ini biasanya digunakan untuk tempat menganalisis, mengamati mendiskusikan hasil perlakuan terhadap eksplan yang telah ditanam terdahulu. Hasil perlakuan yang telah dilakukan terhadap eksplan tertentu perlu diamati untuk melihat perbedaannya dan untuk membandingkannya dengan keadaan awal eksplan sewaktu ditanam. Oleh sebab itu dibutuhkan alat - alat dan ruangan untuk analisa lebih lanjut.

Alat - alat dan bahan yang ada diruangan analisa, antara lain adalah 1). Gambar - gambar informasi tentang kultur jaringan, 2). Bahan - bahan media: (di dalam lemari), 3). Alat - alat yang dibutuhkan untuk pengamatan hasil kultur jaringan (mili meter blok, jangka sorong, mistar) biasanya disimpan di lemari. Didalam ruangan ini umumnya terdapat :

- Mikroskop
- Object glass dan cover glass
- Microtome dan perlengkapannya
- Loupe

Untuk kebutuhan yang lebih tinggi/canggih, alat-alat yang berhubungan dengan pengamatan DNA juga diperlukan seperti : inkubator/water bath, lemari es, sentrifuge, elektroforesis, pipet mikro dengan berbagai ukuran, eppendorf 1,5 ml dan 25 μ l, ujung tip dengan berbagai ukuran dan perlengkapan pengamatan (larutan etidium bromide), kamera foto folaroid tipe tertentu atau komputer yang dilengkapi dengan kamera khusus untuk pengamatan DNA.

2. Ruangan Sterilisasi

Ruangan sterilisasi adalah ruangan tempat dimana seluruh alat kultur jaringan dibersihkan. Sebaiknya ruangan sterilisasi dibagi dua bagian, yaitu ruangan pertama digunakan untuk mensterilkan alat-alat yang tidak terkontaminasi, ruangan kedua digunakan untuk mensterilkan alat-alat yang terkontaminasi. Untuk mensterilkan alat yang tidak terkontaminasi alat yang dibutuhkan di dalam ruangan ini adalah westafel dan autoklaf.

Untuk mensterilkan alat-alat/ botol yang terkontaminasi haruslah dipisahkan ruangan dan peralatan yang digunakan. Pada laboratorium berskala besar, ruangan ini dilengkapi dengan autoklaf yang khusus digunakan untuk mensterilkan botol yang terkontaminasi, jadi botol-botol yang berisi tanaman yang terkontaminasi terlebih dahulu di autoklaf sebelum dicuci secara bersih di wastafel.

Pengalaman penulis selama melakukan penelitian, alat-alat yang digunakan untuk mencuci botol yang terkontaminasi haruslah dibedakan/dipisah dengan alat untuk mencuci botol yang tidak terkontaminasi, baik kain pencuci, batang kayu dan wadahnya.

Jika kita tidak memiliki autoklaf dalam jumlah banyak, kondisi ini dapat diatasi dengan cara memisahkan tempat dan alat pencucian botol terkontaminasi dengan botol yang tidak terkontaminasi. Pengalaman menunjukkan botol terkontaminasi harus dicuci 2 kali untuk memastikan botol benar-benar bersih sebelum dilanjutkan dengan mengautoklafnya.

Pembagian ruangan sterilisasi dapat juga dengan cara sebagai berikut:

- Kamar mandi, digunakan untuk tempat pencucian botol yang terkontaminasi.
- Ruangan yang memiliki wastafel, untuk tempat pencucian alat – alat yang bersih

Alat dan bahan yang harus ada pada ruangan ini antara lain: alat pencuci botol seperti kain/ sabut pencuci, sikat gigi, sikat panjang, batang kayu (untuk mencuci botol besar), autoclaf.

Autoclaf ada beberapa jenis, autoclaf sederhana dengan sumber listrik dan dengan kompor gas dan autoclaf *programmable*. Autoclaf jenis ini memiliki perangkat pengukur tekanan dan timer untuk mengukur waktu.

Gambar 1: Proses sterilisasi tahap pertama dengan mencuci menggunakan detergen dan air mengalir,



Gambar 2: Proses sterilisasi tahap kedua dengan mengautoklaf botol dan alat kultur jaringan

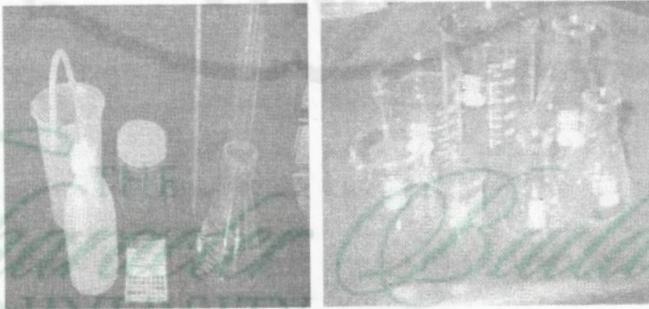
3. Ruangan Preparasi

Ruangan preparasi adalah ruangan yang digunakan untuk mempersiapkan eksplan, membuat media dan hal lainnya. Pada ruangan ini dibutuhkan fasilitas, seperti meja untuk mempersiapkan bahan tanaman, untuk meletakkan alat-alat. Ruang persiapan dibutuhkan untuk :

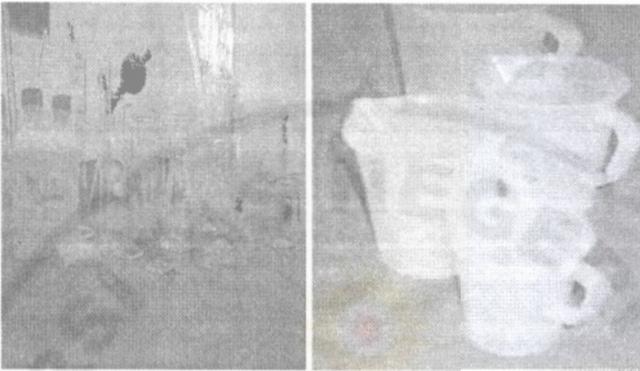
- Mempersiapkan/membuat media kultur jaringan Mempersiapkan dan mensterilisasi eksplan dari lapang yang akan digunakan
- Tempat mencuci alat pembuatan media
- Tempat penyimpanan alat –alat gelas.
- Tempat penyimpanan zat kimia, media kultur jaringan.



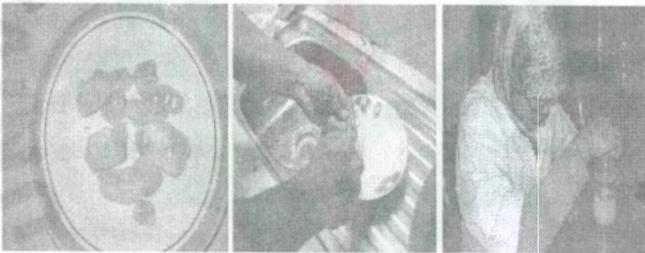
Gambar 3. Bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk pembuatan media kultur jaringan



Gambar 4. Alat-alat glass yang diperlukan untuk preparasi media, terdapat pada ruang preparasi



Gambar 5. Tempat membuat media, seluruh bahan dicampur ditempat ini



Gambar 6. Berturut-turut: a) Eksplan asam kandis yang sedang dipersiapkan untuk disterilisasi, b) Sterilisasi eksplan: mencuci eksplan dengan detergen, c). Tahapan lanjut sterilisasi dengan bakterisida dan fungisida. (seluruhnya dilakukan pada ruang preparasi)

Alat – alat kultur jaringan yang umumnya terdapat dalam ruangan preparasi ini adalah :

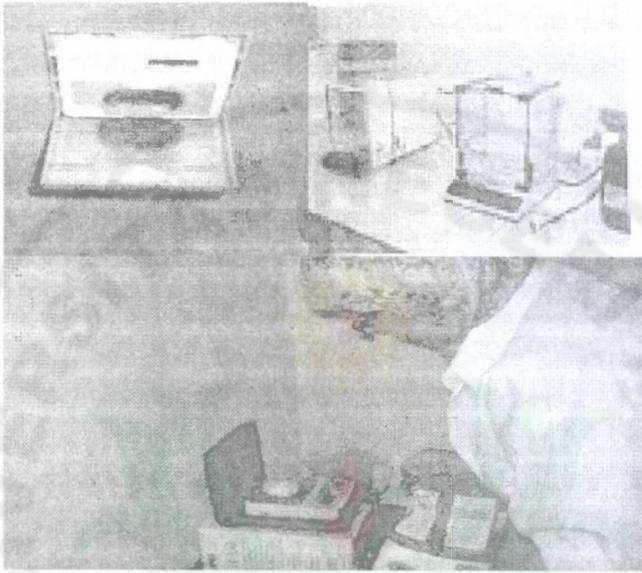
1. Alat gelas standard:

- Beaker glass dengan berbagai ukuran, misalnya: 100 ml, 500 ml
- Gelas ukur: 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml.
- Pipet tetes
- Pipet dengan berbagai ukuran
- Erlenmeyer: 100 ml, 500 ml, 1000 ml.
- Petridish.
- Pipet mikro
- Botol kultur kecil: tempat alat tanam pada saat penanaman
- Botol kultur besar : tempat media dan palnlet ditumbuhkan Batang pengaduk

2. Alat tanam yang telah bersih: gunting, pinset, pisau, spatula, petridish, skalpel dll.
3. Spatula
4. Timbangan analitik
5. Lemari es: untuk menyimpan larutan stok, vitamin dan zat pengatur tumbuh.
6. Hot plate dengan magnetik stirrer
7. Lampu bunsen
8. Oven/Incubator
9. pH meter (pH meter manual atau digital) atau kertas indikator.
10. Autoklaf
11. Panci
12. Alat pencuci
13. Rak piring kecil untuk pengeringan alat
14. Lemari, tempat alat-alat, bahan kimia dan alat lain seperti alumunim foil, karet, plastik.
15. Sentrifuse (untuk pengembangan laboratorium)
16. Shaker (untuk pengembangan laboratorium)
17. Lemari asam (jika diperlukan)
18. Kereta dorong atau troli, untuk mengangkat media dan alat setelah di autoklaf ke ruangan isolasi/transfer.



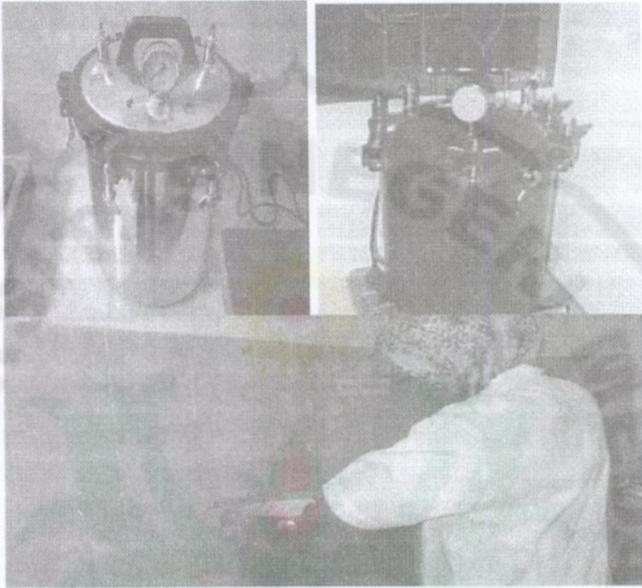
Gambar 7. Ruangan Preparasi



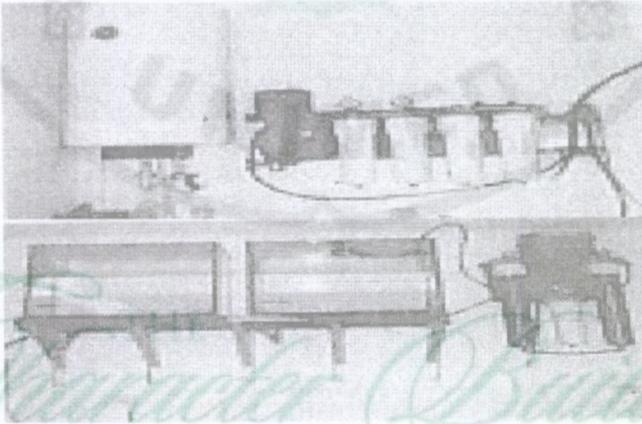
Gambar 8. Timbangan analitik, a) Timbangan analitik digital, b) Timbangan analitik manual, c) Proses penimbangan



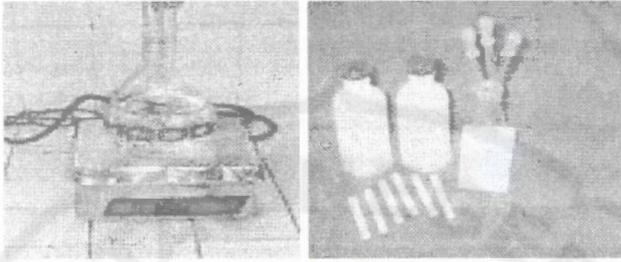
Gambar 9. a) Kulkas tempat menyimpan berbagai larutan stok media, zpt dan lainnya. b). Oven, tempat mengeringkan alat-alat



Gambar 10. a). Autoklaf listrik, b). Autoklaf dengan pemanasan kompor.
c) Proses sterilisasi media kultur jaringan



Gambar 11. Destilator; digunakan untuk menghasilkan air bebas ion dan steril



Gambr 12.a. Stiner dan magnetic stirrer, untuk melarutkan zat tertentu. b. Kerta pH meter beserta larutan penstabil KOH 1N dan HCl 1 N .



Cara mengukur pH media, yaitu dengan mencelup kertas pH, lalu disetarakan dengan kertas blanko

4. Ruang Transfer

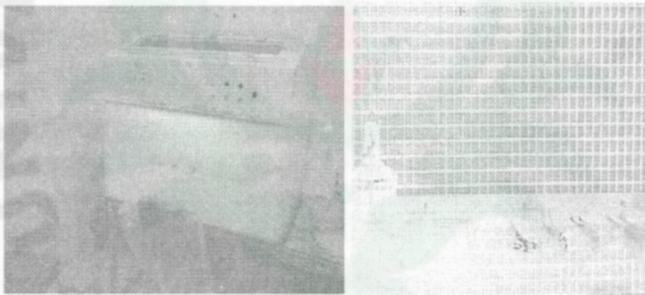
Pada ruangan transfer ini, kondisi harus benar - benar aseptik. Di dalam ruangan inilah dilakukan isolasi bagian tanaman yang hendak ditanam, sterilisasi eksplan tahap ke dua, dan penanaman eksplan ke media tanam. Pintu - pintu penghubung harus senantiasa tertutup rapat sehingga kemungkinan debu yang akan masuk sangat kecil.

Ruangan ini harus berhubungan dengan ruangan kultur, karena setelah penanaman, maka botol berisi tanaman dibawa ke ruang kultur. Juga harus berhubungan dengan ruang preparasi, untuk kemudahan pengangkatan botol berisi media, alat tanam dan yang lainnya. Ruangan ini juga harus berhubungan dengan ruang analisa, untuk keperluan pengamatan mikroskopis. Ruangan senantiasa dibersihkan dengan desinfektan seperti karbol. Idealnya ruangan-ruangan di dalam laboratorium hendaknya saling berhubungan.

Di dalam ruangan ini terdapat alat-alat antara lain:

- Laminar Air Flow Cabinet

- Mikroskop
- Meja dorong (jika dalam skala besar digunakan troli) untuk mengangkat media yang akan digunakan.
- Alat-alat tanam seperti: pisau, gunting, pinset, petridish, botol mini tempat alkohol, disposable filter atau milipore, yang berguna untuk sterilisasi bahan – bahan yang tidak tahan terhadap suhu tinggi.
- Hand sprayer yang diisi alkohol 70 %
- Lampu Bunsen beserta isinya yaitu spiritus.
- Lemari: tempat alat-alat dan alkohol.
- Timbangan digital



Gambar 13. a). Laminar Air Flow Cabinet (L AFC) dalam posisi tertutup dan lampu UV menyala untuk mensterilkan ruangan L AFC. b). Alat tanam yang digunakan, kondisi steril, pada Laminar Air Flow Cabinet yang terbuka, siap untuk digunakan



Gambar 14. Proses penanaman dengan berbagai sumber eksplan, dilakukan di L AFC.

5. Ruang Kultur

Ruangan ini merupakan ruangan terbesar dari seluruh ruangan yang diperlukan dan harus dimungkinkan untuk melakukan perluasan, karena kemungkinan senantiasa terjadi penambahan kultur setiap periode tertentu. Kultur yang tumbuh dan mampu memperbanyak diri, maka harus senantiasa di sub kultur setelah 2 - 3 bulan tergantung jenis tanamannya.

Tingkat aseptisitas ruangan ini harus lebih baik dari seluruh ruangan yang ada, hal ini dikarenakan di ruangan inilah seluruh tanaman botol diletakkan. Botol kultur berisi tanaman disusun pada rak - rak. Jarak antar rak harus diatur sedemikian rupa, sehingga memudahkan kita memeriksa tanaman di rak kultur.

Pada ruangan ini senantiasa AC hidup, yang berguna untuk penyaringan udara yang masuk dan juga untuk mempertahankan tanaman supaya tetap hidup dengan mempertahankan pada kondisi suhu tertentu.

Ruang kultur harus memiliki pengaturan terhadap suhu (dengan menggunakan AC) dan cahaya (dengan pemberian lampu). Walaupun diketahui bahwa proses pada tanaman yang ditanam pada kultur jaringan bukanlah fotosintesis murni, melainkan foto organogenesis melalui pemenuhan kebutuhan karbohidrat dari gula dan juga bahan hara lainnya didalam media, namun cahaya sangat diperlukan untuk mengendalikan perkembangan eksplan.

Kualitas cahaya yang baik untuk perkembangan tanaman harus diperhatikan. Lampu flourescens jauh lebih baik dibanding lampu pijar, karena panasnya relatif rendah. Intensitas cahaya yang dibutuhkan berkisar: 1000 - 4000 lux. Intensitas cahaya diatur dengan menempatkan lampu dengan kekuatan tertentu, dengan jarak 40 - 50 cm dari tabung kultur dan untuk luas tertentu. Umumnya tanaman kultur jaringan membutuhkan sekitar 14 - 16 jam untuk panjang penyinaran yang dibutuhkan. Untuk laboratorium berskala besar dan untuk akurasi penyinaran, timer otomatis digunakan untuk mengukur lamanya penyinaran.

Suhu di dalam ruang kultur juga merupakan aspek penting yang harus diperhatikan, umumnya suhu 18 - 25 °C selalu diterapkan, namun beberapa tanaman membutuhkan temperatur yang lebih rendah. Untuk penelitian dan perlakuan tertentu misalnya pengumbian kentang yang dilakukan di PPSHB Bioteknologi IPB, suhu 20 °C dan penggunaan ruang gelap mutlak diperlukan untuk proses mendapatkan umbi mikro kentang (Wattimena, 2005)

Alat yang harus tersedia di ruang kultur adalah:

- Rak kultur yang dilengkapi dengan lampu flourescens
- Timer, untuk pengukuran waktu

- AC, untuk pengaturan suhu dan penyaringan udara.
- Mikroskop, Loupe, penggaris, milimeter blok
- Shaker



Rak kultur berisi tanaman botol

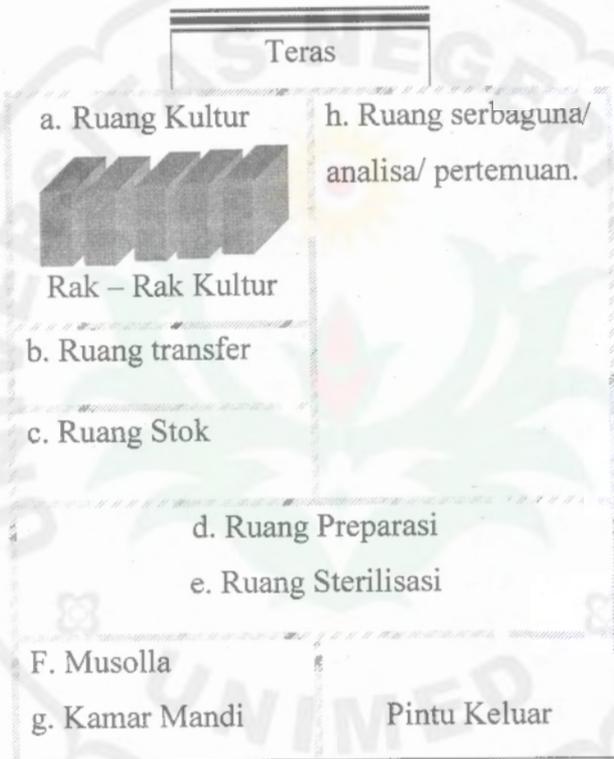
6. Ruang Stok.

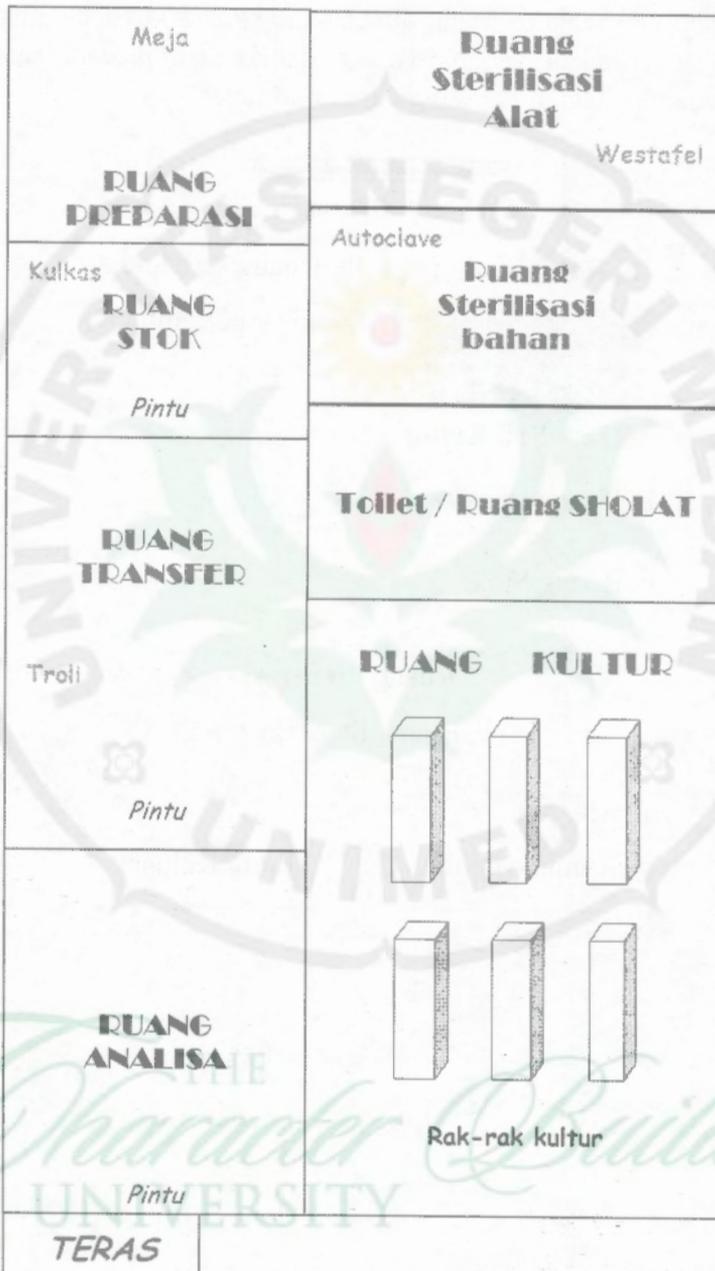
Untuk pembuatan media kultur jaringan, dibutuhkan zat hara makro, mikro dan trace element lainnya. Untuk kemudahan pembuatan media dan mengeliminir kesalahan, maka zat - zat hara yang hanya dibutuhkan dalam jumlah sangat sedikit tersebut, dibuat dalam bentuk stok larutan, artinya dilakukan pemekatan larutan, sehingga dalam pembuatan media, kita hanya melakukan pipetan dalam jumlah kecil sesuai dosis yang dibutuhkan. Oleh karena itu dibutuhkan ruangan yang berfungsi untuk menyimpan stok yang telah dibuat tersebut. Ruangan ini berhubungan dengan ruang preparasi dan ruang kultur. Umumnya alat yang ada di ruangan ini adalah lemari es, untuk menyimpan stok dalam bentuk larutan dan beberapa zat kimia lainnya.

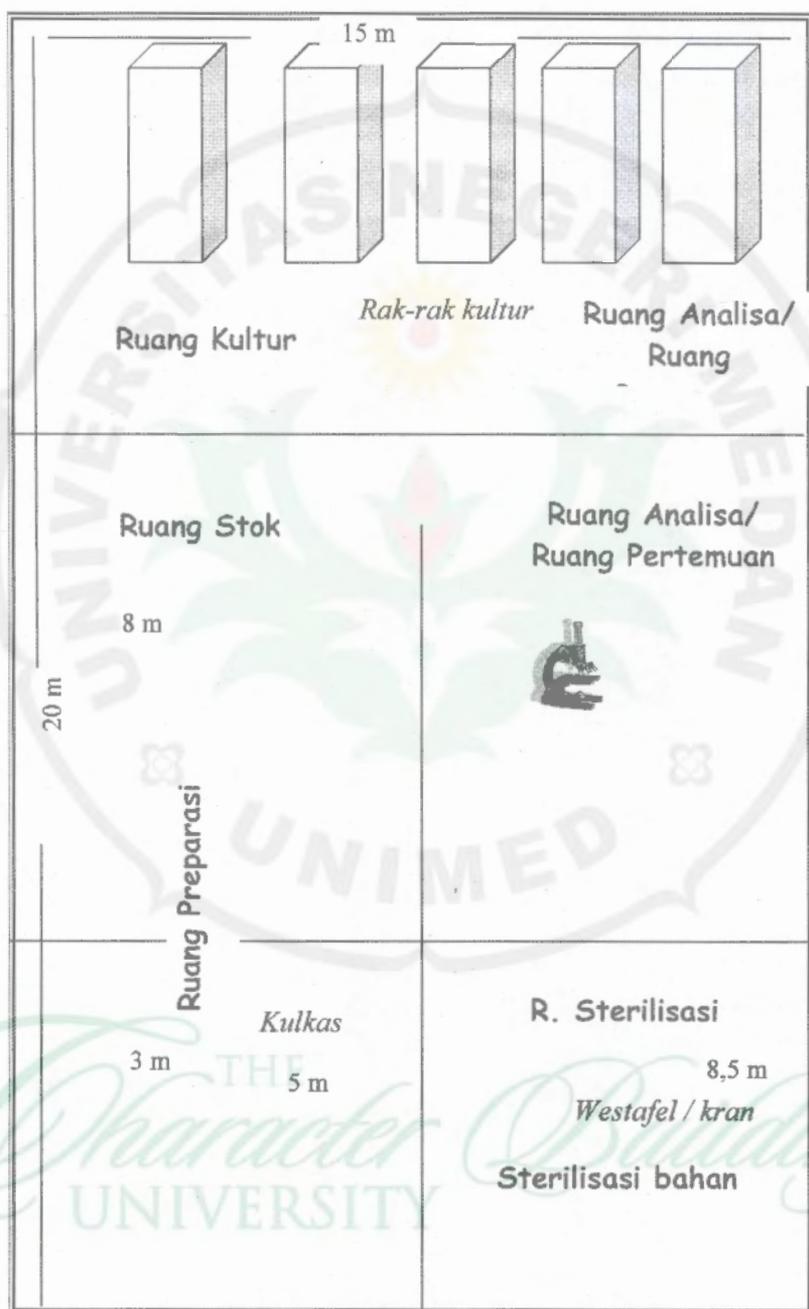
Desain laboratorium kultur Jaringan

1. Laboratorium skala kecil yang dimodifikasi (Harahap, 2007)
2. Laboratorium skala besar (Gunawan, 1992).

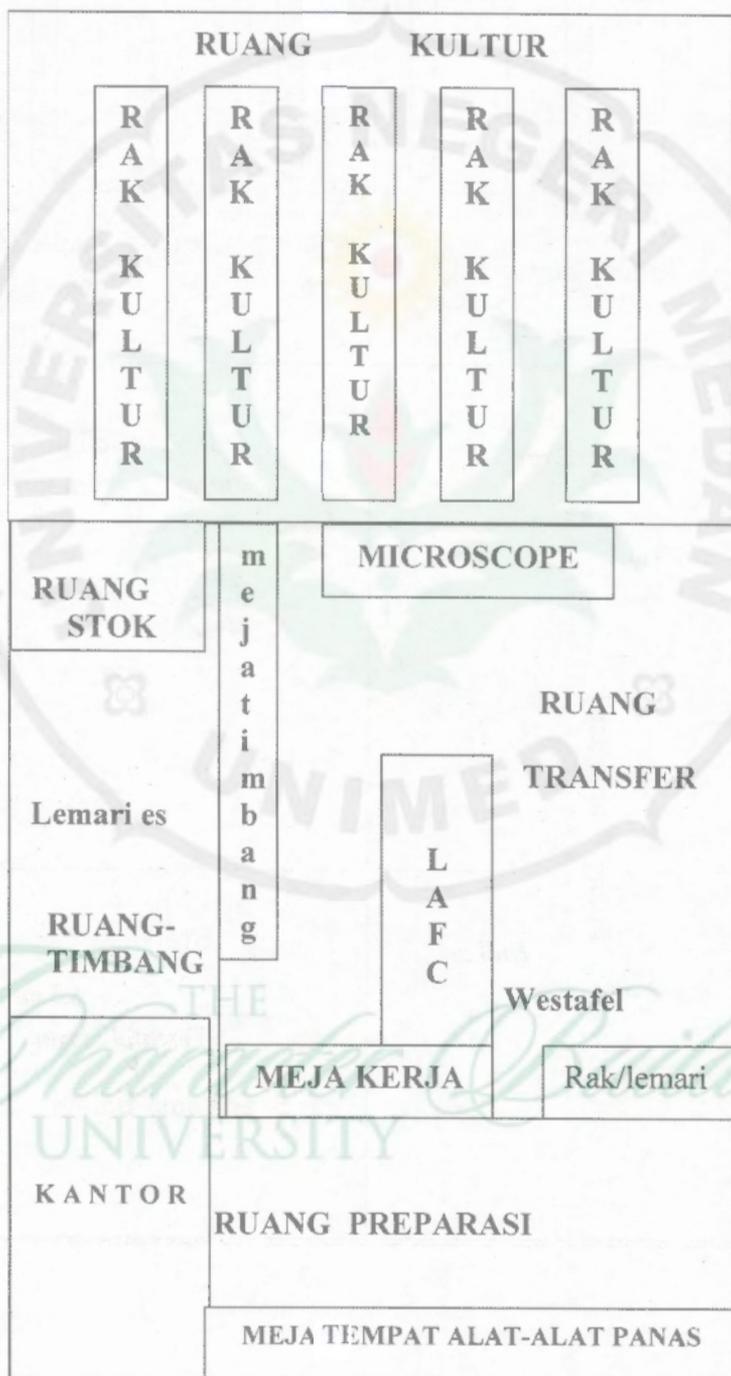
- 1. Laboratorium skala kecil yang dimodifikasi : Ruang kultur dimungkinkan diperluas dengan memindahkan ruang isolasi ke ruang preparasi seterusnya perluasan ke bagian belakang (sisa areal tanah)





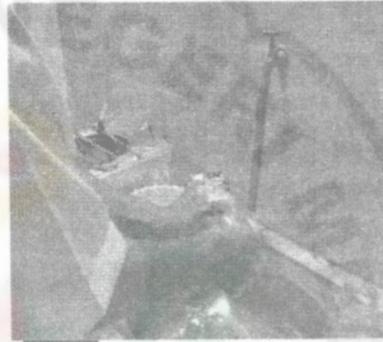
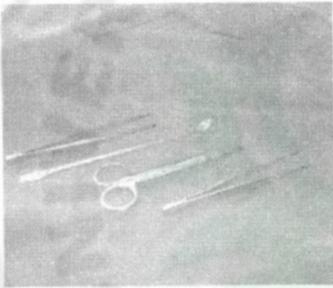


2. Laboratorium skala besar (modern)



PROSES STERILISASI ALAT

1. Alat yang hendak disterilisasi adalah : pinset, pisau, gunting, botol, petidish dan botol kecil tempat alkohol.

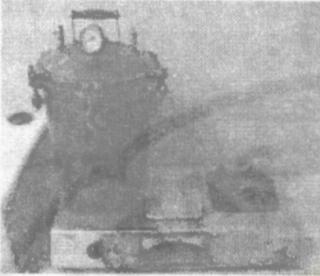


2. Tahapan :
Cuci alat - alat dan botol dengan menggunakan detergen hingga seluruh bagian botol bersih dengan cara menggosok bagian dalam dan luar botol secara merata kemudian bilas dengan air mengalir.



3. Alat berupa pinset, petidish, pisau dan gunting di bungkus dengan menggunakan Kertas/alumunium foil sebelum dimasukkan ke dalam Autoklaf





Botol disterilkan dengan menggunakan Autoklaf sampai mencapai suhu 121 C^0 pada tekanan 17.5 Psi selama 1 jam.

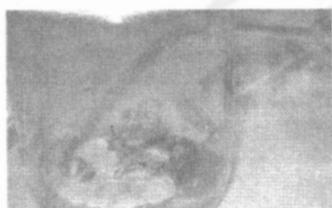
Buka klep autoklaf dan tunggu tekanan menjadi 0, buka autoklaf, angkat botol yang telah steril.



Botol dapat digunakan untuk pembuatan media atau disimpan dalam ruang kultur (maxs 4 hari)

Sterilisasi botol yang terkontaminasi

- Alternatif 1: botol kontam di autoklaf lalu dicuci bersih
- Alternatif 2: (pencucian 2 kali)



Botol – botol dan alat yang sudah terkontaminasi dicuci dengan terlebih dahulu mengeluarkan isi botol yaitu media yang telah terkontaminasi.



- Menggosok seluruh bagian botol dan alat hingga bersih dengan menggunakan detergen.
- Membilas botol dan alat dengan air mengalir, agar benar-benar bersih
- Meletakkan botol dan alat yang sudah dicuci bersih dalam wadah dan menunggu hingga kering

Pencucian pertama selesai. Botol – botol ini harus di cuci ulang jika hendak digunakan dalam pembuatan media

Botol hasil pencucian ulang, siap untuk di sterilisasi dengan autoklaf

Pertanyaan:

1. Ruang yang dibutuhkan untuk menjadi tempat pertambahan koleksi tanaman kultur yang juga merupakan ruang terbesar ialah :
 - a. Ruang kultur
 - b. Ruang transfer
 - c. Ruang preparasi
 - d. Ruang analisa(Kunci Jawaban : A, Tipe Soal C₂)
2. Dalam laboratorium kultur jaringan terdapat beberapa ruangan yang dibedakan berdasarkan fungsinya antara lain, kecuali :
 - a. Ruang Preparasi
 - b. Ruang transfer
 - c. Ruang kultur
 - d. Ruang kultivasi(Kunci Jawaban : D, tipe soal C₁)
3. Jelaskan mengapa ruang kultur lebih tinggi tingkat aseptisitasnya dibandingkan ruangan lainnya?

Jawab:

Karena pada ruangan inilah seluruh tanaman setelah diperbanyak dilketakkan, oleh karena itu ruang ini aseptisitasnya lebih tinggi di bandingkan dengan ruang yang lainnya, seperti: pada ruangan ini senantiasa AC hidup, yang berguna untuk penyaringan udara yang masuk dan juga untuk mempertahankan tanaman supaya tetap hidup dengan mempertahankan pada kondisi suhu tertentu. Ruang kultur jaringan juga harus memperhatikan suhu dan cahaya karena untuk mengendalikan perkembangan eksplan.

GLOSARIUM

Aseptik:

Bebas dari infeksi/ bersih, steril.

Sitologi:

Ilmu tentang susunan dan fungsi sel

Bioteknologi:

Cabang ilmu yang 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

Parenkim:

Jaringan dasar karena banyak dijumpai hampir ditiap bagian tumbuhan, dengan karakteristik sel berupa sel hidup, struktur dan fungsi sangat bervariasi, bervakuola besar, dinding sel tipis, terdapat kloroplas dan pigmen lainnya.

Suspensi:

Campuran heterogen dari zat cair dan zat padat yang dilarutkan dalam zat cair.

Sterilisasi:

Proses pemusnahan atau eliminasi semua mikroorganisme, termasuk spora bakteri, yang sangat resisten

Desinfektan:

Bahan kimia yang digunakan untuk mencegah terjadinya infeksi atau pencemaran jasad renik juga untuk membunuh atau menurunkan jumlah mikroorganisme atau kuman penyakit lainnya

Fotosintesis:

Suatu proses biokimia pembentukan zat makanan atau energi dengan menggunakan karbondioksida, dan air serta dibutuhkan bantuan energi cahaya matahari

Organogenesis:

Proses pembentukan organ (tunas, daun, akar)

Zat hara makro:

Unsur yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah besar, yaitu C, H, O, N, S, P, K, Ca, Mg, (pendapat sebagian ahli: Fe)

Zat hara mikro:

Unsur yang hanya dibutuhkan tanaman dalam jumlah sangat sedikit, dibutuhkan untuk kebutuhan kerja enzim esensial, yaitu B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, V, dan Zn

Elektroforesis:

Teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik

Ruang isolasi:

Ruang penanaman, ruang transfer, ruang tabur. Untuk skala laboratories biasanya tidak begitu luas karena biasanya berisi satu LAFK untuk seorang atau dua orang bekerja di dalamnya, akan tetapi untuk skala industri ruangan ini biasanya luas tergantung berapa kapasitas orang yang bekerja secara bersama-sama.